



FUNKČNÍ VZOREK

**Nastavení podmínek kultivace bakterií
Salmonella enterica subsp. *enterica* sérovar
Typhimurium pro specifickou
expresi antigenních proteinů**

**Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
Hana Kudláčková
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.**

**5549
2018**

Funkční vzorek
5549/2018

**Nastavení podmínek kultivace bakterií *Salmonella enterica*
subsp. *enterica* sérovar Typhimurium pro specifickou
expresi antigenních proteinů**

Autoři

Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
Hana Kudláčková
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Technologické agentury České republiky, programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací GAMA TG03010038 s názvem Rozvoj systému podpory „Proof – of – concept“ na VÚVeL.

ISBN 978-80-88233-52-7

2018

Obsah

Úvod.....	3
I. Cíl metodiky	4
II. Vlastní popis metodiky	4
II.1. Kultivační média a aditiva	4
II.2. Analýza exprimovaných proteinů hmotnostní spektrometrií	5
III. Srovnání „novosti postupů“	8
IV. Popis uplatnění funkčního vzorku	9
V. Ekonomické aspekty.....	9
VI. Patentová ochrana	9
VII. Seznam citované literatury.....	9
Dedikace	11

Úvod

Infekce způsobené netyfoidními sérovary salmonel mají velký zoonotický potenciál a jsou tak ve veterinární i humánní medicíně stále nevyřešený dlouhotrvající problém. Nejčastějšími hostiteli a tedy i přenašeči na člověka jsou v Evropě prasata a drůbež (EFSA 2009). Jedním ze způsobů, jak snížit počet salmonela-pozitivních zvířat je, kromě dodržování hygienicko-technických opatření, vakcinace. V současné době je v Evropě registrovaná pouze jediná vakcína pro prasata s názvem Salmoporc® (Selke a kol. 2007). Jedná se o živou vakcínu založenou na kultuře *Salmonella* Typhimurium, která však není mezi chovateli příliš rozšířená. Dále je v registraci na pracovišti autorů vyvinutá inaktivovaná vakcína pro prasnice před porodem určená k ochraně jejich sajících selat před infekcí kmeny *Salmonella* Typhimurium, *S. Derby* a *S. Infantis* (Kosina a kol. 2016). Tato vakcína však nevykazuje dlouhodobou protektivitu při podání odstaveným selatům.

Místem interakce bakterií salmonel s hostitelem je v největší míře epitel střeva. Za účasti tzv. M buněk často dochází k prostupu přes epiteliální bariéru a dále se pomocí imunitních buněk, hlavně makrofágů, mohou bakterie rozšířit i do jiných částí těla (Jones a kol. 1994). V závislosti na fázi infekce a okolním prostředí využívají bakterie salmonel proteiny několika ostrovů patogenity. Pro invazi salmonel přes střevní stěnu a vyvolání lokálního zánětu, který vede k atrakci buněk imunity, využívají proteinů ze SPI-1 lokusu. Několik hlavních SPI-1 proteinů (SipB, SipC, SipD, PrgI a další) utváří povrchovou strukturu, která zajišťuje transport efektorových proteinů do buněk hostitele nebo do okolního prostředí (Marcus a kol. 2000). Zesílení inflamatorní odpovědi je způsobeno i zvýšenou expresí Toll-like receptorů hostitele, hlavně TLR4 a TLR5, které specificky vážou bakteriální lipopolysacharid, respektive flagelární proteiny bakterie (Cario a Podolsky 2000, Gewirtz a kol. 2001). Po fagocytóze salmonel makrofágy se bakterie nachází v tzv. vakuole obsahující salmonely (SCV) a ve větší míře exprimují proteiny ze SPI-2 lokusu. Ty umožňují bakterii eliminovat destruktivní mechanismy makrofágů – modifikují složení membrány vakuoly a zabráňují splynutí SCV s lysozomy (LaRock a kol. 2015); vážou se na mikrotubulární systém buňky a regulují pohyb SCV ke středu buňky k replikaci nebo naopak na periferii a diseminaci do okolních buněk (Guignot a kol. 2004, Szeto a kol. 2009). Makrofágy se dále snaží zabránit růstu intracelulárních bakterií i tím, že svými proteiny (např. ferroportin) aktivně transportují ionty železa ven z buňky (Paradkar a kol. 2008). Za velmi nízkých koncentrací železa salmonela ve zvýšené míře exprimuje siderophory IroN a CirA, které

zachytávají zbytky iontů železa z okolního prostředí a transportují jej dovnitř bakterie (Barat a kol. 2012).

Tvorba protilátek a specifických T lymfocytů hostitele při infekci je závislá na nabídce antigenů patogena. Bakteriální proteiny, jejichž exprese se snižuje po prostupu přes bariéru do těla hostitele tak nevyvolají imunitní odpověď, která by vedla k ochraně před patogenem už při prvotním kontaktu. Naopak proteiny bakterie, které se tvoří až v pozdější fázi infekce za specifických podmínek, nejsou často dostupné ve vakcinačním kmeni, pokud se aplikuje inaktivovaná vakcína založená na bakteriální kultuře pěstované za podmínek extracelulárního prostředí. Naopak napodobení podmínek prostředí různých dostupných habitatů bakterie při infekci a tvorba protilátek proti takto indukovaným proteinům salmonel zvyšuje šanci na odpověď imunitních složek v různých fázích infekčního procesu.

I. Cíl metodiky

Cílem následující metodiky je popis kultivačních podmínek bakterií kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium, které vedou ke specifické expresi proteinů účastnících se infekčního procesu v hostitelském organismu, konkrétně proteinů ostrovů patogenity SPI-1 a SPI-2, některých siderophorů a proteinů bičíku. Indukce exprese těchto proteinů by mohla vést ke tvorbě protektivních protilátek u zvířat po imunizaci vakcínou připravenou z kultury *Salmonella* Typhimurium.

II. Vlastní popis metodiky

II. 1. Kultivační média a aditiva

Pro kultivaci byl použit kmen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium DT104 z interní sbírky Výzkumného ústavu veterinárního lékařství. Bakterie byly kultivovány ve třech různých médiích:

- 1) LB bujón (Lennox L Broth Base, Invitrogen, USA)
- 2) LPM médium (low phosphate, low magnesium) - 5 mM KCl, 7,5 mM (NH₄)₂SO₄, 0,5 mM K₂SO₄, 1 mM KH₂PO₄, 8 μM MgCl₂·6H₂O, 0,3 % glycerol, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 80 mM MES, pH upraveno na 4,8

3) Minca médium (minimal casein) - 8 mM KH_2PO_4 , 28,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 % kaseinový hydrolyzát, 200 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 μM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,6 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 9 μM $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4

K některým kultivacím bylo z důvodu zvýšení exprese salmonelových siderophorů přidána EDTA v konečné koncentraci 10 mM.

10 μl bakteriální kultury *S. Typhimurium* zamražené na -80°C v LB médiu s 25 % glycerolu bylo inokulováno 10 ml LB média, LPM média nebo Minca média. Kultivace probíhala 16 hodin při 37°C za stálého třepání. Poté byly bakterie centrifugovány 10 minut při 4000 x g. Stočené buňky byly promyty 20 ml PBS a opět centrifugovány. Následně byly resuspendovány ve 2 ml PBS a se zirkonium/křemíkovými kuličkami (0,1 mm) sonikovány na přístroji Sonopuls HD 3100 (Bandelin, Německo) s 80% amplitudou po dobu 2 minut na ledu. Poté byl sonikát centrifugován 10 min při 4°C při 20000 x g. Supernatant byl odebrán a peleta byla dále resuspendována ve 100 μl resuspendačního pufru (8 M močovina, 25 mM triethylammonium bikarbonátový pufr (TEAB), 0,2 % Triton X-100 a 0,1 % SDS). Po hodinové inkubaci za stálého třepání při 20°C byly vzorky centrifugovány 10 minut při 4°C při 20000 x g. Supernatant byl odebrán a smíchán se sonikátem (supernatant po sonikaci a centrifugaci) a použit na proteomickou analýzu.

Pokud se do bakteriální kultury přidávala EDTA, pak se po prvotní 16 hodinové kultivaci v LB, LPM nebo Minca odebralo 100 μl kultury a tou se inokulovalo 10 ml čerstvého LB, LPM nebo Minca média. Po 2,5 hodinách kultivace došlo k přidavku EDTA do finální koncentrace 10 mM. Po dalších 2 hodinách došlo k odběru části vzorku a zbytek kultury byl dále kultivován dalších 20 hodin. Rozbití buněk probíhalo výše zmíněným způsobem.

II. 2. Analýza exprimovaných proteinů hmotnostní spektrometrií

Na proteomickou analýzu bylo odebráno 50 μg celkového proteinu (měřeno pomocí Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA). Vzorky pro hmotnostní spektrometrii byly připraveny metodou FASP (filter-aided sample preparation, Wisniewski a kol. 2009). Každý vzorek byl 6x promyt 8 M močovinou na centrifugačních kolonkách Vivacon 500 s 10.000 MWCO membránovým filtrem (Sartorius Stedim, Německo). Jako redukční a alkylační činidlo bylo použito 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, USA), respektive 50 mM iodacetamid (Serva, Německo) ve 25 mM TEAB pufru. Proteiny byly poté naštěpeny trypsinem (Promega, USA) v poměru 1:50, po dobu jedné hodiny při 37°C , poté

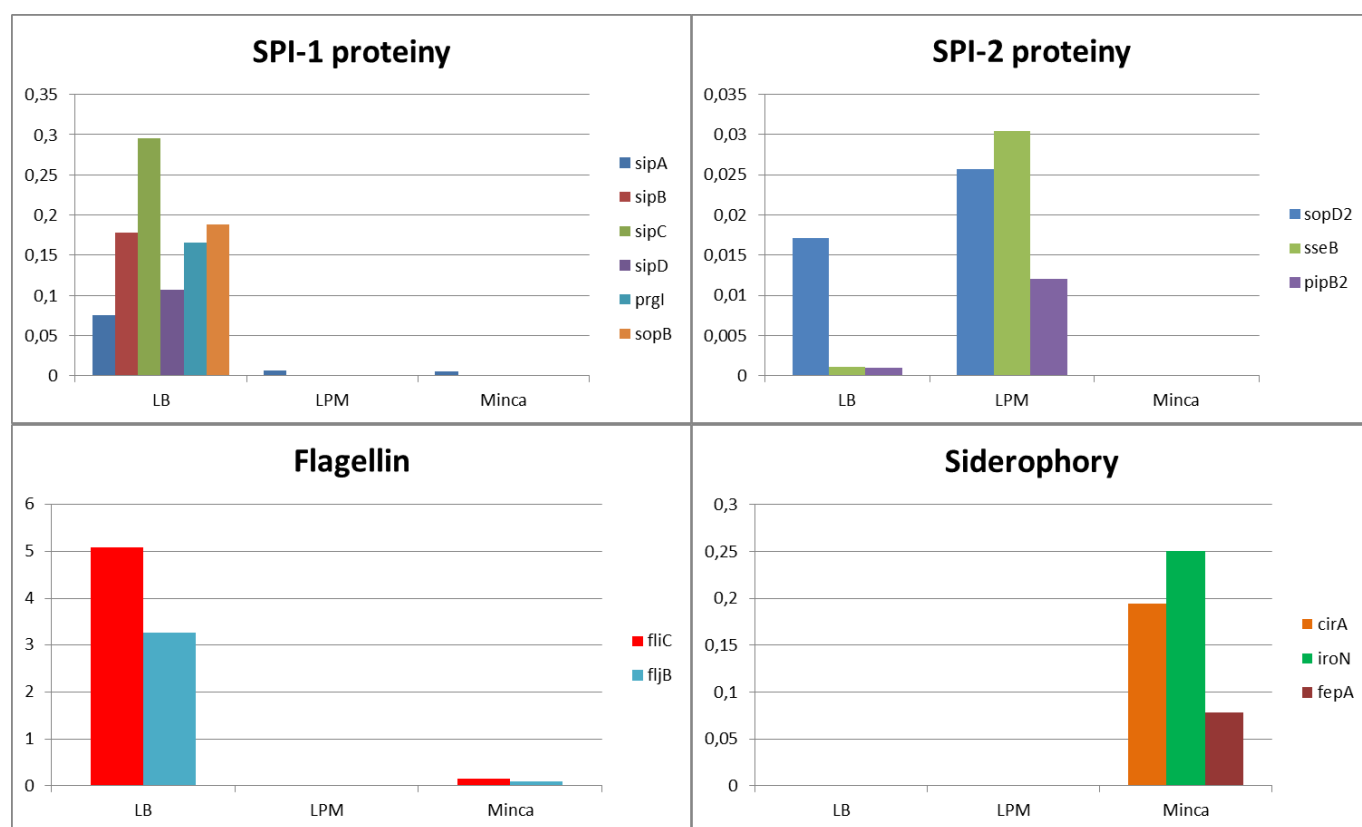
přes noc při 25°C. Po centrifugaci byl eluát naštěpených peptidů odpařen na vakuové odparce (DNA120 SpeedVac, Thermo Savant, USA) a peleta peptidů resuspendována v 0,1 % vodném roztoku kyseliny mravenčí. Separace peptidů probíhala na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RSLCnano (Dionex -Thermo Scientific, USA), na dvouhodinovém gradientu se zvyšující se koncentrací acetonitrilu (0 min - 4 %, 4 min - 4 %, 98 min - 45 %, 98.5 min - 90 %, 112 min - 90 %, 112.5 min - 4 %, 120 min - 4 %). Peptidy byly separovány v průtoku 300 nl/min na 25 cm koloně Acclaim PepMap RSLC C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm I.D. (Thermo Scientific, USA). uHPLC byl připojen na elektrosprej EASY-Spray, který je součástí hmotnostního spektrometru Orbitrap Velos Pro (Thermo Scientific, USA). Plný sken probíhal v rozsahu m/z 390-1700 k identifikaci protonovaných peptidů s nábojem 2 a vyšším, které byly automaticky podrobeny data-dependentní MS/MS analýze a fragmentaci kolizemi s molekulami helia. Naměřená spektra byla poté prohledána pomocí softwaru Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Scientific, USA) s algoritmem Sequest HT. Oxidace metioninů a deamidace Asn a Gln byly nastaveny jako dynamické modifikace. Jako statická modifikace byla použita karbamidometylace cysteinů. Hmotnostní tolerance byly nastaveny na 10 ppm pro prekurzorové a 0,5 Da pro fragmentové ionty. Pro identifikaci naměřených peptidů byla použita proteinová databáze Uniprot pro kmen *Salmonella* Typhimurium. Pouze peptidy identifikované s FDR (false discovery rate) 0,01 byly použity pro následné vyhodnocení.

Pro relativní kvantifikaci vybraných proteinů byl použit součet ploch pod křivkou (AUC) tří nejabundantnějších peptidů daného proteinu. Tyto hodnoty byly normalizovány na kvantitu (AUC) proteinu Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (Uniprot accession P0A1P0). V rámci jednotlivých skupin salmonelových proteinů byly sledovány tyto proteiny:

	Uniprot Accession number		Uniprot Accession number
SPI-1		SPI-2	
SipA	E1WAC6	SopD2	Q8ZQC8
SipB	Q56019	SseB	Q7BVH7
SipC	P0CL47	PipB2	Q8ZMM8
SipD	Q56026		
PrgI	P41784	Siderophory	
SopB	O30916	CirA	Q8ZNL0
		IroN	Q8ZMN0
Flagelliny		FepA	Q8ZR40

FliC	Q9R4Q7	
FljB	P52616	

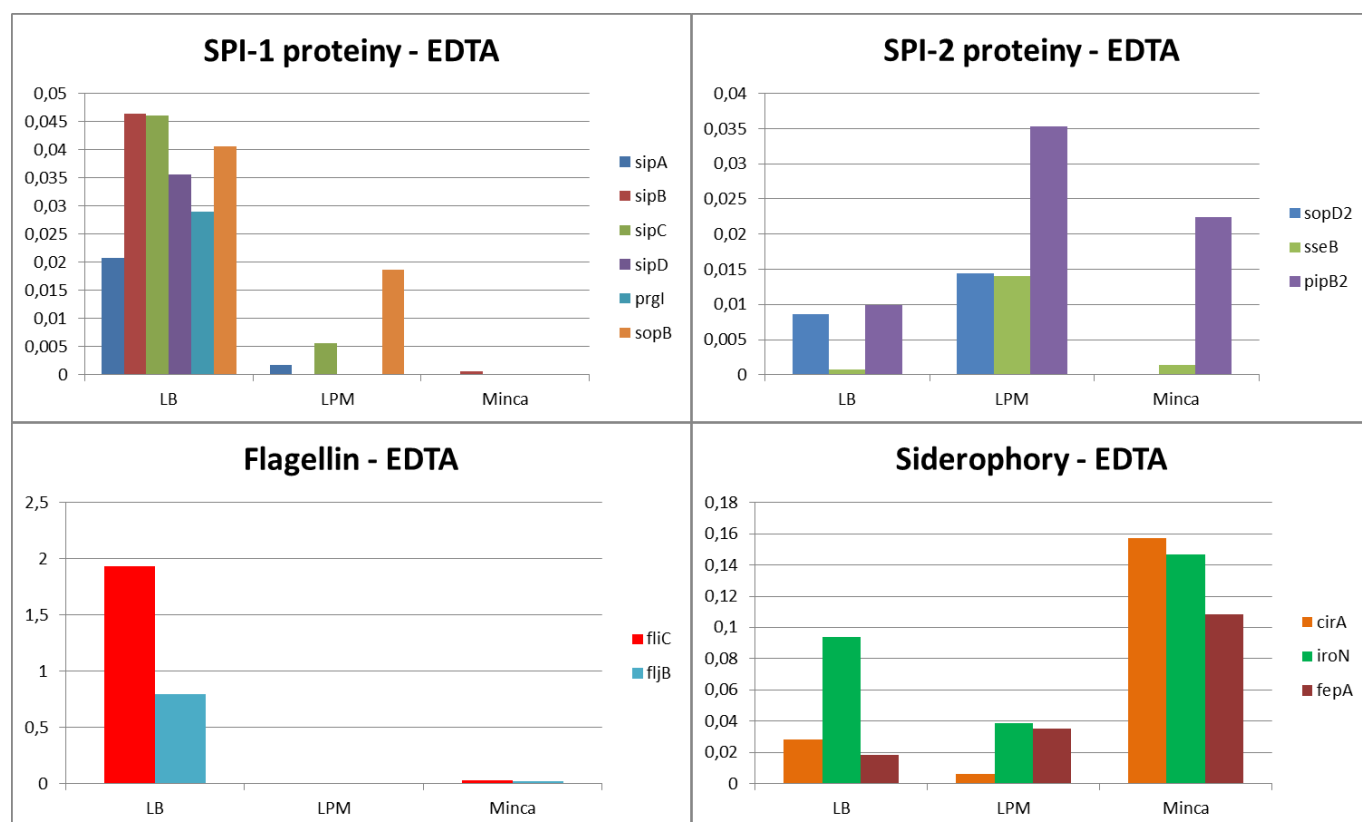
Základní bakteriální médium bohaté na živiny - LB médium - ve velké míře indukuje expresi proteinů z lokusu SPI-1 (obr. 1). Zároveň se produkuje velké množství flagelárních proteinů. Bakterie v prvních fázích infekce aktivně migruje právě za pomoci bičíku a zároveň využívá proteiny SPI-1 pro aktivní invazi do epitelálních buněk hostitele. LPM médium oproti tomu simuluje podmínky uvnitř makrofágů - snížené pH, nízká koncentrace živin i iontů (hlavně fosfátů a hořečnatých iontů). Za těchto podmínek se ve větší míře exprimují proteiny SPI-2, jak je také vidět z grafu. Zároveň bakterie snižuje expresi flagelárních proteinů FliC a FljB v tomto médiu. Bakteriální siderophory se produkují v prostředí s nízkou koncentrací iontů železa. Toho bylo dosaženo kultivací salmonel v Minca médiu.



Obrázek 1: Grafy relativní kvantifikace vybraných salmonelových proteinů vztažených na normalizační protein GapA (osa y = poměr *protein/GapA*), po expresi v různých kultivačních médiích

Zvýšení exprese siderophorů lze dosáhnout také kultivací salmonel v bohatém médiu po přidavku soli kyseliny etylendiaminotetraoctové (EDTA). Toto chelatační činidlo z média vyvazuje ionty kovů a stimuluje tak bakterii ke zvýšenému transportu iontů z prostředí dovnitř

buňky za pomoci indukce exprese siderophorů (obr. 2). Jak je vidět z grafu na obr. 2 (porovnáním se stejným grafem na obr. 1), tyto podmínky zároveň vedou ke snížení produkce SPI-1 proteinů, stejně tak jako proteinů bičíku. Snížení koncentrace iontů v médiu tak zřejmě způsobuje celkovou změnu metabolismu bakterií salmonel. Přidání chelatačního činidla do kultivačního LB média tak umožňuje využívat přítomnosti jak SPI-1 proteinů a flagelinů, tak salmonelových siderophorů v jedné bakteriální kultuře. Exprese většího spektra virulentních proteinů bakterie při kultivaci potenciálně zvyšuje pravděpodobnost imunitní odpovědi hostitele při podání takto připraveného antigenu ve formě vakcíny při následné infekci.



Obrázek 2: Grafy relativní kvantifikace vybraných salmonelových proteinů vztahených na normalizační protein GapA (osa y = poměr *protein/GapA*), po expresi v různých kultivačních médiích a přidavku 10 mM EDTA

III. Srovnání „novosti postupů“

Jediná komerčně dostupná salmonelová vakcína v Evropě pro prasata je na bázi živého kmene *Salmonella* Typhimurium (Salmoporc, IDT), kde exprese proteinů bakterie nelze ovlivnit. Jiné experimentální vakcíny jsou založeny na delečních mutantech *S. Typhimurium* (Leyman a kol. 2011), supernatantu bakteriální kultury *S. Typhimurium* (Ferreira a kol. 2015), případně na rekombinantních proteinech – povrchových antigenech a siderophorech (Barat a

kol. 2012). Cílené využití exprese specifických proteinů bakteriální kultury se při přípravě inaktivované salmonelové vakcíny nevyužívá.

IV. Popis uplatnění funkčního vzorku

Postup přípravy bakteriální kultury za účelem specifické exprese salmonelových virulentních proteinů může být využit při přípravě inaktivované vakcíny proti salmonelovým infekcím.

V. Ekonomické aspekty

Předkládaný funkční vzorek může být nabídnut firmám, zabývajícím se vývojem a prodejem veterinárních vakcín, případně může sloužit jako podklad k získání navazujících projektů, které se budou zabývat vývojem takové vakcíny.

VI. Patentová ochrana

Patentová ochrana tohoto postupu není řešena.

VII. Seznam citované literatury

Barat S, Willer Y, Rizos K, Claudi B, Mazé A, et al.: Immunity to intracellular *Salmonella* depends on surface-associated antigens. PLoS Pathog 2012; 8(10):e1002966

Cario E, Podolsky DK: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. Infect Immun 2000; 68(12):7010-7

EFSA: Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: *Salmonella* prevalence estimates. EFSA Journal 2009; 7(12): [93 pp.]

Ferreira RBR, Valdez Y, Coombes BK, Sad S, Gouw JW, Brown EM, Li Y, Grassl GA, Antunes LCM, Gill N, Truong M, Scholz R, Reynolds LA, Krishnan L, Zafer AA, Sal-Man

N, Lowden MJ, Auweter SD, Foster LJ, Finlay BB: A highly effective component vaccine against nontyphoidal *Salmonella enterica* infections. *mBio* 2015; 6(5):e01421-15

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167:1882–1885

Guignot J, Caron E, Beuzón C, Bucci C, Kagan J, Roy C, Holden DW: Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *J Cell Sci* 2004; 117:1033-45

Jones BD, Gori N, Falkow S: *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *The Journal of Experimental Medicine* 1994; 180:15-23

LaRock DL, Chaudhary A, Miller SI: *Salmonellae* interactions with host processes. *Nature Reviews Microbiology* 2015; 13:191-205

Leyman B, Boyen F, Van Parys A, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F: *Salmonella* Typhimurium LPS mutations for use in vaccines allowing differentiation of infected and vaccinated pigs. *Vaccine* 2011; 29(20):3679-3685

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer ChG, Finlay BB: *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection* 2000; Vol. 2, 145 – 156

Kosina M, Gebauer J, Kudláčková H, Levá L, Havlíčková H, Vrzal V, Šišák F, Matiašovic J: Vakcinační postup vedoucí k ochraně sajících selat před infekcí *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium, Derby a Infantis. *VÚVeL* 2016; Léčebný postup

Paradkar PN, De Domenico I, Durchfort N, Zohn I, Kaplan J and McVey Ward D: Iron depletion limits intracellular bacterial growth in macrophages. *Blood* 2008; 112:866-874

Selke M, Meens J, Springer S, Frank R, Gerlach GF: Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine. Infect Immun 2007; 75(5):2476-83

Szeto J, Namolovan A, Osborne SE, Coombes BK, Brumell JH: *Salmonella*-containing vacuoles display centrifugal movement associated with cell-to-cell transfer in epithelial cells. Infect Immun 2009; 77(3):996-1007

Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M: Universal sample preparation method for proteome analysis. Nat Methods 2009; 6(5):359–62

Dedikace

Funkční vzorek „Nastavení podmínek kultivace bakterií *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium pro specifickou expresi antigenních proteinů“ byl vytvořen v rámci projektu Technologické agentury České republiky, programu aplikovaného výzkumu, experimentálního vývoje a inovací GAMA TG03010038 s názvem Rozvoj systému podpory „Proof – of – concept“ na VÚVeL.

Vydal: Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
Hudcova 70, 62100 Brno

Název: **Nastavení podmínek kultivace bakterií *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhimurium pro specifickou expresi antigenních proteinů**

Autoři: Mgr. Jan Gebauer, Ph.D.
Mgr. Radek Tesařík, Ph.D.
Hana Kudláčková
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

- 2018 -



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic

Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz