

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
katedra biologických a lékařských věd

Detekce protilátek reagujících s *F. tularensis* v časně fázi infekce

(diplomová práce)

Hradec Králové, 2010

Kristina Straková

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji.

30. 4. 2010

Ráda bych poděkovala RNDr. Zuzaně Kročové, Ph.D. za její trpělivost a konkrétní cenné rady, Mgr. Kláře Konečné a celému kolektivu pracovníků Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové za pomoc při osvojování laboratorních metod.

Dále děkuji MUDr. Martinovi Jaklovi za kritické připomínky a pomoc při zpracovávání dat.

Souhrn

Na základě vysoké virulence a mortality se *Francisella tularensis* řadí mezi vojensky a teroristicky zneužitelná etiologická agens a proto je vhodným předmětem základního výzkumu. Problematika protilátkové odpovědi organismu na infekci intracelulárních patogenů v současné době nabývá na významu. Názory a výsledky vědeckých skupin nejsou jednotné a jedná se tedy o aktuální téma.

Cílem naší práce bylo zjistit, zda je *F. tularensis* schopná vyvolat protilátkovou odpověď již velmi časně po infekci a to do 48 hodin. Testován byl virulentní kmen *F. tularensis*. Zároveň jsme chtěli ověřit, zda je námi použitá metodika vhodně zvolená a poskytuje dostatečně reprodukovatelné výsledky.

Metody: Připravili jsme celobuněčný lyzát *F. tularensis holarctica* FSC200, který jsme podrobili separaci pomocí 2D elektroforézy. Po Western blotu následovala imunodetekce s použitím sér myší BALB/c odebraných 24 a 48 hodin po infekci a kontrolních sér myší, které nebyly infikovány. Srovnávací analýzou jsme hledali proteiny, které reagují pouze s imunizovanými séry a nikoli s kontrolní skupinou.

Výsledky: Realizovali jsme šest nezávislých pokusů. Na všech čitelných filmech se vyskytovaly tři proteiny, které nebyly na žádné z kontrol. Vybrané proteiny budou analyzovány hmotnostní spektrometrií v další práci.

Závěr: Podařilo se nám potvrdit, že intracelulární bakterie *F. tularensis* je schopna vyvolat časnou protilátkovou odpověď. Detekované proteinové struktury *F. tularensis* pravděpodobně dokážou spustit tvorbu nízkoafinitních protilátek bez přímé podpory lymfocytů T, tedy bez tzv. druhého signálu.

Summary

Because of its high virulence and mortality *Francisella tularensis* is considered to be a dangerous potential biological weapon and therefore this etiological agent is a suitable object of the primary research. Problems of an antibody response to the infection with intracellular pathogens are currently gaining in importance. Opinions and conclusions of various research teams differ, so this topic is up-to-date.

The aim of this study was to find whether *F. tularensis* induces the antibody immune reaction in an early phase of infection (after 24 and 48 hours). The virulent strain of *F. tularensis* was used. We also intended to validate a feasibility of chosen methodology.

Methods: We prepared a whole-cell bacteria lysate of *F. tularensis holarctica* FSC200. This lysate was separated by 2D electrophoresis with subsequent Western blotting. Proteins were marked by immunodetection using serum of BALB/c mice. Mice sera were collected 24 and 48 hours post challenge with *F. tularensis*. The serum of uninfected mice was utilized as control. Using comparative analysis, we tried to find proteins reacting only with the immunized sera, not with the control sera.

Results: Six independent experiments were realized. There are three proteins in all legible films that were not found in any of the controls. These proteins will be analyzed by mass spectrometry in another study.

Conclusion: We proved that the intracellular infection with *F. tularensis* is capable to induce early specific antibody-mediated response. Detected bacterial proteins can possibly initiate the synthesis of low-affinity antibodies without the direct T-cell help, i. e. without the second signal. These bacterial protein structures are called T-cell independent antigens.

Použité zkratky

2D	dvourozměrný
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CFU	colony forming units, počet živých bakterií schopných proliferace
DTT	dithiothreitol
ECL	zesílená chemiluminiscence
ELFO	elektroforéza
FSC 200	virulentní kmen <i>F. tularensis holarctica</i>
IEF	izoelektrická fokusace
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
IPG	imobilizovaný pH gradient
LVS	vakcinační kmen <i>F. tularensis holarctica</i>
O.D.	optická densita
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
PDA	1, 4-bis(akryloyl)piperazin
pI	izoelektrický bod
PVDF	polyvinylidenfluorid
SDS	dodecylsírán sodný
ssp.	subspecies, poddruh
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
TI	na thymu nezávislé
TNF	tumor nekrotizující faktor
Tris base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu

Obsah

Souhrn.....	4
Summary.....	5
Použité zkratky	6
Obsah	7
1 Úvod	9
2 Teoretická část	10
2.1 <i>Francisella tularensis</i>	10
2.1.1 <i>F. tularensis</i> - historie, taxonomie.....	10
2.1.2 <i>F. tularensis</i> - etiologické agens tularémie	11
2.1.3 <i>F. tularensis</i> a B lymfocyty.....	13
2.1.4 <i>F. tularensis</i> a protilátky.....	15
2.2 Western blot	17
2.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza.....	17
2.2.2 Blotování	19
2.2.3 Imunodetekce.....	20
2.3 Srovnávací analýza	21
3 Experimentální část	22
3.1 Materiál.....	22
3.1.1 Zvířata, biologický materiál.....	22
3.1.2 Roztoky, činidla, média.....	22
3.1.3 Pomůcky a přístroje.....	26
3.1.4 Software	27
3.2 Pracovní postup.....	28
3.2.1 Infekce myší a příprava séra pro detekci.....	28
3.2.2 Příprava proteinů <i>F. tularensis</i>	28
3.2.3 Stanovení bílkoviny	29
3.2.4 Dvourozměrná gelová elektroforéza.....	30
3.2.5 Blotování	32
3.2.6 Imnodetekce.....	33
3.2.7 Srovnávací analýza	34
4 Výsledky.....	35

5	Diskuze	41
6	Závěr	46
	Literatura	47

1 Úvod

Intracelulární bakterie *F. tularensis* byla zařazena do Kategorie A bojově zneužitelných patogenů. Důvodem je nízká infekční dávka, snadné šíření, virulence, mortalita, dlouhodobá rekonvalescence a omezené možnosti vakcinace. Proto význam studia původce tularémie v současné době narůstá, ačkoli je tularémie jinak poměrně vzácnou antropozoonózou a nepatří mezi zásadní klinické problémy současné medicíny.

Zajímavým tématem je rozkrývání mechanismů imunitní obrany organismu ve velmi časně fázi infekce *F. tularensis*. Tato bakterie je schopná přežívání a množení uvnitř makrofágů a imunitní reakce proti ní je buňkami zprostředkovaná. Předpokládalo se, že B lymfocyty se do časně odpovědi imunitního systému příliš nezapojují. V současné době se podařilo tuto teorii vyvrátit. Je tedy patrná snaha popsat úlohu B lymfocytů v reakci na infekci *F. tularensis*. My jsme se zaměřili na možnost existence časně specifické protilátkové odpovědi.

Cílem naší práce bylo zjistit zda u myší infikovaných *F. tularensis* nalezneme v séru specifické protilátky již 24 a 48 hodin po infekci. Zajímaly nás i proteiny, které by případně takovou reakci spouštěly. Zvolili jsme metodu, při které se celobuněčný lyzát *F. tularensis* promývá sérem infikovaných a zdravých myší. Navázané protilátky z imunizovaného a neimunizovaného séra se poté zviditelní chemiluminiscencí a porovná se jejich výskyt u zdravých a infikovaných myší. Aby naše výsledky maximálně odpovídaly reálné infekci, použili jsme virulentní kmen *F. tularensis holarctica* FSC 200.

2 Teoretická část

2.1 *Francisella tularensis*

2.1.1 *F. tularensis* – historie, taxonomie

Bakterie *F. tularensis* způsobuje zoonotické onemocnění tularémií. První zmínky o této infekční nemoci jsou již z devatenáctého století. V roce 1912 v Kalifornském Tulare byl McCoyem a Chapinem původce poprvé izolován a pojmenován podle místa objevu *Bacterium tularense*. Terminologie rodu byla zpočátku nejednotná a prodělala vývoj přes *Pasteurella* a *Brucella* až k současnému *Francisella*. Rodový název byl vytvořen na počest E. Francise, který bakterii poprvé identifikoval ve vzorku lidské krve a hnisu v roce 1921.

Taxonomie této bakterie je:

Kmen: *Proteobacteria*

Třída: *Gammaproteobacteria*

Řád: *Thiotrichales*

Čeleď: *Francisellaceae*

Rod: *Francisella*

Druh: *Francisella tularensis* (Sedláček, 2007)

Rod *Francisella* zahrnuje ještě dva druhy: *novicida* a *philomiragia*. Poddruhy *F. tularensis* dělíme podle místa geografického výskytu a virulence, tedy míry patogenity pro člověka (Tab. 1). *F. tularensis ssp. tularensis* je rozšířená hlavně v USA, Kanadě a Mexiku a je nejvirulentnější. *F. tularensis ssp. mediasiatica* se nejčastěji vyskytuje ve středoasijských republikách bývalého SSSR. *F. tularensis ssp. holarctica* způsobuje tularémii v Evropě, na Sibiři, Blízkém východě a Severní Americe a *F. tularensis ssp. japonica* – podobná evropské variantě, v Japonsku.

Tabulka č. 1: Klasifikace poddruhů *F. tularensis*

Poddruh <i>F. tularensis</i>	Další členění	Geografický výskyt	virulence
<i>tularensis</i>	Typ A. I	středo západ USA, Kalifornie a Massachusetts	nejvyšší
	Typ A. II	Kalifornie a horské americké státy	velmi vysoká
<i>Mediaasiatica</i>		Kazachstán, Uzbekistán	vysoká
<i>holarctica</i>	Biovar	Evropa, Kazachstán, Sibiř, Severní Amerika	vysoká
	Biovar II	Evropa a Asie Japonsko	vysoká
	japonica	vzácně- Austrálie, S. Amerika	vysoká

(Olsufjev a Meshcheryakova, 1983; Ellis a kol., 2002; Salomonsson, 2008)

2.1.2 *F. tularensis* - etiologické agens tularémie

Jedná se o gramnegativní aerobní nepohyblivé ovoidní mikroorganismy. Jejich velikost je zhruba 0,3-1,0 x 0,2-0,5 µm (Hubálek, 2000). Jsou nepohyblivé, nesporulující a povrch je pokryt pouze jemnou mukózní vrstvou (Sedláček, 2007). Bakterie je poměrně náročná na kultivaci a jako růstový faktor vyžaduje cystein nebo cystin, na rozdíl od ostatních dvou druhů *F. tularensis* (Nano a Elkins, 2005). Nejčastěji používaným chemicky definovaným růstovým tekutým médiem je Chamberlainovo médium (Chamberlain, 1965; Ellis a kol., 2002). Z pevných půd je to McLeod agar.

F. tularensis způsobuje onemocnění divokých hlodavců, zejména zajíců, králíků, křečků, hrabošů, syslů, hryzců a myší, které se mezi nimi udržuje jakožto typická ohnisková nákaza (Jírovec a kol., 1954). Infekci, označovanou též jako zaječí nemoc, udržují i méně vnímavá zvířata, jako jsou ondatry, srnci, lišky a divoce žijící ptáci, která zpravidla onemocní jen latentně (Bednář a kol., 1996).

Způsoby přenosu tularémie na člověka jsou různé. Jedná se o transmisivní přenos prostřednictvím hematofágních členovců, zejména klíšťat, ale také pakomárů a ovádů. Dále je přenos uskutečňován bezprostředním kontaktem s krví infikovaného

zvířete např. při stahování kůže zvířat. Je znám také přenos alimentární a aerogenní, tedy vdechnutím infikovaného prachu (Hubálek, 2000). Přenos z člověka na člověka je velmi řídký.

U zvířat se tularémie klinicky projevuje zduřením všech mízních uzlin a nekrotickými ložisky v játrech, slezině a v plicích. U člověka probíhá tularémie pod různým klinickým obrazem v závislosti na způsobu přenosu a vstupní bráně infekce. Rozlišujeme tedy několik rozdílných forem tularémie.

2.1.2.1 Formy tularémie

Onemocnění obvykle u všech forem začíná jako chřipka celkovou zchváceností, bolestmi po celém těle, zvracením, třesavkou, horečkou až 40°C a pocením. Horečky trvají 2-3 týdny, pak následuje pomalá rekonvalescence (Jírovec a kol., 1954).

Podle brány vstupu bakterie do hostitele a jejich projevů rozeznáváme několik forem tularémie: ulceroglandulární, okuloglandulární, glandulární, orofaryngeální, gastrointestinální, tyfosní, acinózní a plicní (Votava a kol., 2003).

Nejčastější forma je ulceroglandulární, která se vyskytuje až v 85 % případů. *F. tularensis* proniká do těla oděrkou či po kousnutí klíštětem nebo jiným infikovaným členovcem. Bakterie se šíří lymfatickým systémem a projevuje se vznikem bolestivého vřídka v místě vstupu a zduřením spádových mízních uzlin. Tato forma tularémie může vyústit v pneumonii (Votava a kol., 2003; Hayes, 2005).

Glandulární forma se objevuje v menší míře, cca v 10 až 25% případů. Původce tularémie i v tomto případě proniká do hostitelského organismu přes kožní oděrky, ale na rozdíl od ulceroglandulární formy vředy nevznikají. Nákaza také zasahuje lymfatický systém nebo krevní oběh (Votava a kol., 2003).

Okuloglandulární forma, dříve poměrně častá, se dnes vyskytuje asi v 1 % případů. Vstupní branou infekce jsou oční spojivky, například po kontaktu s kontaminovanou vodou, či znečištěnými rukama. Projevuje se bolestivou konjunktivitidou, hnisavým zánětem očních víček, vznikem nažloutlých vřidků na spojivce a regionální lymfadenitidou (Votava a kol., 2003; Hayes, 2005).

Orofaryngeální a gastrointestinální varianty onemocnění se vyskytují s četností pod 5%. Vznikají po požití nedostatečně tepelně zpracovaného masa infikovaného zvířete, kontaminované potravy či vody. Při průniku infekce přes tonsily vzniká forma anginózní (Hayes, 2005).

Tyfoidní forma, vyskytující se v 10 až 15 % případů, vzniká také po ingesci *F. tularensis*, kromě vředu a krvácení v gastrointestinálním traktu je navíc doprovázena příznaky sepse a multiorgánovým postižením. Pacienti často trpí těžkými průjmy, hypotenzí a celkovým vyčerpáním organismu. Tyfoidní tularémie navíc bývá doprovázena sekundární pneumonií (Hayes, 2005; Nano a Elkins, 2005).

Plicní formu rozlišujeme primární a sekundární. Při inhalaci infekčního prachu nebo aerosolu, například při zpracovávání hospodářských plodin či kontaktem s kontaminovanou močí infikovaných zvířat propuká primární tularémická pneumonie. Sekundární pneumonie vzniká následkem onemocnění jinou formou tularémie poté, co se bakterie krevním nebo lymfatickým řečištěm rozšíří do plic z jiné infikované tkáně. Diagnostiku plicní tularémie výrazně znesnadňuje nespolehlivost nálezu na rentgenovém snímku. Až u 30 % pacientů s pneumonickou formou tularémie totiž radiologické vyšetření nepoukazuje na žádné klinické příznaky nebo symptomy pneumonie (Hayes, 2005).

Byly popsány i další vzácně se vyskytující klinické formy tularémie, jedná se o meningitidu, perikarditidu, endokarditidu a septickou artritidu (Hayes, 2005). Původce se dá kultivovat ze sekretu vředů, časté pro diagnostiku jsou také sérologické metody. Nejspolehlivější je kožní test s tularinem.

Lékem první volby při léčbě tularémie jsou aminoglykosidová antibiotika streptomycin či gentamycin, provádí se také chirurgické odstranění zduřelých lymfatických uzlin (Hubálek, 2000).

F. tularensis byla zařazena do kategorie A, tedy mezi šest nejnebezpečnějších potenciálně vojensky a teroristicky zneužitelných patogenů zejména z důvodu vysoké virulence, mortality, nesnadné diagnostiky a dlouhodobé rekonvalescence (Dennis a kol., 2001; Rotz a kol., 2002). Dalším závažným důvodem pro studium *F. tularensis*, je nedostupnost vakcíny, kterou by bylo možné použít plošně k imunoprolaxi tularémie. Použití živého vakcinačního kmene odvozeného ze subtypu *F. tularensis holarctica*, je indikováno jen ve zvláštních případech a navíc nechrání proti inhalačním infekcím subtypem *tularensis* (Titball a Sjöstedt, 2003).

2.1.3 *F. tularensis* a B lymfocyty

Základní časná imunitní odpověď organismu napadeného *F. tularensis* je buňkami zprostředkovaná. Makrofágy, které bakterii pohltní, musí být aktivovány cytokiny od pomocných T lymfocytů (T_H1), jinak by nebyly schopné bakterie zničit.

Jedná se zejména o interferon- γ (IFN- γ). Aktivované makrofágy disponují širším spektrem baktericidních mechanismů, např. produkcí oxidu dusnatého a proti intracelulární bakterii tak působí účinněji, navíc produkují další cytokiny jako jsou interleukin-1 (IL-1), tumor nekrotizující faktor (TNF) a další. Přispívají tak k aktivaci T lymfocytů a obecně stimulují lokální zánět (Hořejší a Bartůňková, 2002).

Role B lymfocytů v časně fázi imunitní reakce proti infekci *F. tularensis* byla donedávna považována za nevýznamnou. Od počátku devadesátých let minulého století však byla publikována řada experimentů, které prokazovaly podstatnou úlohu B lymfocytů v časně imunitní odpovědi proti infekci *F. tularensis*. Testy byly prováděny na myších BALB/c, které jsou citlivé k infekcím intracelulárními patogeny a tento model se ustálil jako vhodný pro studium imunitních reakcí při infekci *F. tularensis*.

V roce 1993 byla publikována práce amerického týmu, která popisovala časnou imunitní odpověď na infekci *F. tularensis*. Myším s deficitem T lymfocytů byla podána subletální dávka LVS a dva dny poté intradermálně dávka letální, kterou myši přežily. Naopak myši, kterým byla po dvou dnech aplikována *Salmonella typhimurium*, chráněné nebyly. Byla tak prokázána jistá specifita takto velmi časně získané projektivní imunity a její nezávislost na lymfocytech T. Navíc bylo poukázáno na potřebu IFN- γ . Dlouhodobé přežití však již podmíněno přítomností T lymfocytů je (Elkins a kol., 1993).

I v další studii bylo zdokumentováno přežití myší po podání letální dávky *F. tularensis*, kterému o 3 dny předcházela aplikace dávky subletální. Pokus byl realizován i na athymických myších, kde byla reakce stejná a následně byl vyvozen závěr, že o tento časný protektivní efekt se významně zasloužily B lymfocyty, pravděpodobně však ne tvorbou specifických protilátek. Dále byla potvrzena důležitá role IFN- γ (Culkin a kol., 1997).

I výsledky dalších pokusů poukazují na nedoceněnou roli lymfocytů B zejména při ochraně proti sekundární infekci. Myši bez B lymfocytů i protilátek jsou při primární infekci *F. tularensis* oproti geneticky nemodifikovaným myším v mírné nevýhodě, avšak u sekundární infekce je již rozdíl zásadní. Po podání B lymfocytů se schopnost obrany myší narozených bez B lymfocytů radikálně zvýšila. Autoři navíc tvrdí, že pouhý transfer protilátek vykazoval slabší ochranný efekt (Elkins a kol., 1999).

Lze tedy říci, že existuje teorie, že B lymfocyty hrají významnou úlohu při ochraně zejména proti reinfekci *F. tularensis* a to jinými mechanismy, než je

produkce specifických protilátek za podpory pomocných T lymfocytů. Mluvíme o protektivní imunitě nezávislé na T lymfocytech, která trvá přibližně 1 měsíc. Pravděpodobně se tedy jedná o B-buněčnou produkci mediátorů jako jsou: IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 a TNF- α , které zesilují cytokinovou odpověď na infekci. Poměrně zásadní je IFN- γ , který však B lymfocyty neprodukuje (Culkin a kol., 1997). Předpokládá se interakce např. s NK-buňkami, které tuto možnost poskytují. Dále se ví, že IL-6, IL-12 a TNF-alfa produkované B lymfocyty rovněž produkci IFN- γ regulují (Elkins a kol., 1993; Elkins a kol., 1999; Elkins a kol., 2003).

Samostatnou kapitolou je práce, která prokazuje schopnost *F. tularensis* přímo interagovat s B lymfocyty. Bakterie *F. tularensis* v pokusech *in-vitro* adhezuje na povrch B lymfocytů, vstupuje do nich a indukuje jejich apoptózu. Pokusy byly prováděny jak s vakcinačním (LVS) tak s virulentním kmenem (FSC 200) na lidských i myších B buněčných liniích Ramos a A20 a na myších slezinných buňkách. Tato zjištění poukazují na možnou úlohu B lymfocytů ve velmi časně fázi infekce (Kročová a kol., 2008).

2.1.4 *F. tularensis* a protilátky

Obecně lze protilátkovou imunitní odpověď B lymfocytů spustit dvěma základními způsoby. Ty se liší podle typu antigenu. Po jeho rozeznání povrchovým antigenně specifickým proteinem B lymfocytů (BCR), je pro vznik protilátkové odpovědi ve většině případů ještě nutná stimulace pomocnými T lymfocyty, tzv. druhý signál, který probíhá při těsném kontaktu obou lymfocytů. Následně během 3-4 dnů dojde k proliferaci (s identickou nebo velmi podobnou specificitou) a diferenciací B lymfocytů v plazmatické buňky, které sekretují velké množství protilátek.

Existují však antigeny, které spouští protilátkovou odpověď i bez podpory T lymfocytů. K těmto antigenům patří zejména polysacharidy, lipopolysacharidy a polymerní bílkoviny. Taková reakce organismu je charakterizována časnou tvorbou nízkoafinitních protilátek třídy IgM, u kterých nedochází k afinitní maturaci a netvoří se paměťové buňky. Místo druhého signálu od pomocných T lymfocytů stačí cytokiny produkované NK buňkami či T lymfocyty. Imunitní reakce B lymfocytů tedy není plně závislá na přímém kontaktu s T lymfocyty. Výhodou této odpovědi je zejména rychlost, nevýhodou pak samozřejmě nižší specifita (Krejsek a Kopecký, 2004b)

U infekce *F. tularensis* dosud nejsou známy struktury, které by tuto časnou protilátkovou reakci mohly spouštět, ale je známo, že titr protilátek stoupá již od prvního dne infekce (Pohanka, 2007).

Dlouho převládal názor, že úloha protilátek v primární imunitní reakci na intracelulárního patogena jako je *F. tularensis* není významná (Casadevall, 1998). Zásadní úlohu hrál zejména předpoklad, že protilátky nejsou schopné pronikat do intracelulárních prostor a nemohou tak přímo interagovat s *F. tularensis* jako je tomu u extracelulárních bakterií. Avšak zejména na počátku infekce, tedy před vniknutím do buněk a dále po rozpadu infikovaných buněk, se pomnožené bakterie do extracelulárních prostor uvolňují. Dále mohou protilátky reagovat s antigeny intracelulární bakterie na povrchu infikované buňky. Takové protilátky poté iniciují na protilátkách závislou buněčnou cytotoxickou odpověď či aktivaci komplementu a dále se zapojují do imunitních reakcí.

V roce 2003 zveřejnila švédská skupina výsledky experimentů, které potvrzovaly schopnost protilátek přispět k imunitní obraně organismu infikovaného *F. tularensis*. Myším s deficitem B lymfocytů (C57Bl/10) bylo den před infekcí aplikováno imunní myší sérum. Pro následnou infekční intradermální zátěž byl použit jak vakcinační kmen *F. tularensis* LVS, tak plně virulentní kmen *F. tularensis holarctica*. Autoři experimentu prokázali významně vyšší odolnost těchto myší proti následné infekci ve srovnání s myšmi, kterým bylo podáno kontrolní, tedy normální sérum. Prokázali tak ochranný účinek protilátek při primární infekci (Stenmark a kol., 2003).

Dalším důkazem významné funkce specifických protilátek byl experiment, při kterém byly myším podány *F. tularensis* specifické protilátky a následně byly touto bakterií infikovány. Oproti kontrolním měly imunizované myši vyšší hladiny TNF- α a IL-12 a je tedy pravděpodobné, že protilátky tak přispívají k obraně proti infekci. Testy však poukazují na účinnost transferu protilátek pouze při infekci méně virulentním kmenem, zatímco vůči *F. tularensis ssp. tularensis* byl efekt slabý nebo žádný. I tak ale studie potvrdila, že specifické protilátky mají v obranné reakci hostitele své místo (Stenmark a Sjöstedt, 2004).

Dosavadní poznatky o úloze B lymfocytů a zejména protilátek v průběhu časné imunitní odpovědi na průnik původce tularémie do organismu jsou stále nekompletní. S vysokou pravděpodobností se jedná o kombinaci obou systémů imunitních reakcí a nelze popisovat úlohu protilátek bez komplexního náhledu na funkce lymfocytů a

produkci cytokinů. Na úzkém propojení humorální a buněčné imunity při imunitní odpovědi na infekci *F. tularensis* se shodlo více na sobě nezávislých vědeckých pracovišť (Baron a kol., 2007; Kirimanjeswara a kol., 2007; Lavine a kol., 2007).

K získání rezistence vůči letální dávce LVS stačí již intranasální podání usmrcené LVS, současně je však potřeba podat IL-12. Navíc je takto získaná obranyschopnost závislá na schopnosti organismu produkovat funkční slizniční protilátky IgA (Baron a kol., 2007). Rovněž sérum myší imunizovaných aplikací tepelně usmrcených LVS poskytovalo prokazatelnou ochranu proti letální zátěži *F. tularensis* LVS. Aby byl vyloučen imunogenní vliv O-antigenu, tedy polysacharidového řetězce přítomného v lipopolysacharidu této gramnegativní bakterie, byla ke stejným pokusům použita i modifikovaná varianta LVS neschopná produkce O-antigenu. I takto imunizované myší sérum poskytovalo plnou ochranu proti letální dávce LVS (Lavine a kol., 2007).

Poslední publikace potvrzuje již uvedenou závislost zisku časně imunity na přítomnosti IFN- γ . Myším bylo opět podáno imunizované myší sérum, které zajistilo 100% přežití intranasální infekce LVS. Účinnost byla měřena rychlostí eliminace patogenu z tkání. Opět tedy byla prokázána neoddělitelnost buněčné a humorální imunity. Navíc se jedná o první experiment dokazující léčebný efekt imunního séra i při podání 24-48 hodin po intranasální infekci. Lze tedy říci, že samotné podání protilátek nezajistí dostatečnou imunitu, ale protilátky zde hrají významnou roli (Kirimanjeswara a kol., 2007).

2.2 Western blot

Tato metoda se využívá k detekci proteinů s požadovanými vlastnostmi (reaktivitou). Zahrnuje elektroforézu (ELFO), blotování a imunodetekci s použitím specifických protilátek značených enzymovým komplexem nebo radionuklidy. Podle způsobu značení se pak přítomnost proteinu projeví buď barevnou stopou nebo emisí záření zachytilným na fotografickém filmu či CCD kamerou.

2.2.1 Dvourozměrná gelová elektroforéza

Tato metoda separace proteinů byla poprvé popsána v roce 1975 O'Farrellem a sestává ze dvou fází. V prvním rozměru se jedná o dělení proteinů na základě jejich náboje, tedy izoelektrickou fokusaci (IEF). Následuje separace podle molekulové

hmotnosti proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu realizovaná kolmo na IEF.

2.2.1.1 Příprava vzorků

Izoelektrické fokusaci předchází příprava vzorku. Proteiny v něm obsažené musí být solubilizovány, denaturovány, redukovány a alkylovány, aby byly narušeny všechny mezimolekulové interakce. Cílem těchto úprav jsou maximálně ohraničené spoty reprezentující jeden konkrétní protein. K solubilizaci vzorku se používají pufrů obsahující chaotropní látky (urea, thiourea), které rozrušují vodíkové můstky a hydrofobní interakce. Dále detergenty jako je dodecylsírán sodný (SDS), které brání interakcím mezi hydrofobními doménami proteinů a redukční činidla (dithiothreitol-DTT) proti zpětné oxidaci disulfidických vazeb. Pomocí těchto pufrů lze dosáhnout kompletního rozvolnění proteinů ve směsi (Herbert, 1999; Görg a kol., 2004).

2.2.1.2 Izoelektrická fokusace

Pomocí IEF je možné rozdělit amfoterní látky podle jejich izoelektrického bodu (pI). Taková látka se při pH nižším než je její pI pohybuje v jednosměrném (stejnoseměrném) poli k negativně nabitému konci a při vyšším pH ke konci nabitému kladně. V pH o hodnotě jejího pI se protein nepohybuje.

V praxi se nejčastěji pro tuto techniku používají komerčně dodávané gelové proužky s imobilizovaným gradientem pH (IPG), které se vyrábí kopolymerací akrylamidu a bisakrylamidu s karboxylovými skupinami a terciárními aminoskupinami. Tyto IPG-proužky se vyrábí 3, 3 mm široké v různých délkách a ve více variantách rozmezí pH, to může být velmi úzké, jako 4, 9 - 5, 3 i široké, tedy 3 – 12 (Poland a kol., 2003).

Proužky jsou z důvodu snadnější manipulace dodávané v dehydratovaném stavu. Nanášení vzorků pro IEF probíhá tzv. in-gelovou rehydratací, která spočívá ve smísení vzorku s rehydratačním pufrům a následné minimálně 12 hodinové inkubaci s proužky. Postupně tak proteiny prostupují ze vzorku do polyakrylamidové sítě. Nejdéle trvá prostup největších proteinů, který je limitovaný mírou hydratace gelu. Takto připravený gel s naadsorbovanými proteiny vzorku se podrobí působení napětí. Jeho velikost, stejně jako doba trvání se určuje empiricky na základě předchozích zkušeností laboratoře. Proužky s proteiny rozdělenými podle jejich pI je možné uchovávat bez poškození při -20°C. Kromě IPG-IEF existují ještě CA-IEF (IEF

s nosnými amfolyty, které vytvářejí gradient pH v trubičkových gelech) a NEpHGE-IEF (nerovnovážný systém pro analýzu bazických a kyselých proteinů), pro oba je společná obtížnější manipulace i reprodukovatelnost výsledků.

2.2.1.3 Ekvilibrace proužků po IEF:

Před provedením separace v druhém rozměru je nezbytné ekvilibrovat proužky v redukujícím roztoku, který zajistí rozštěpení disulfidických můstků mezi proteiny. Ekvilibrace je dokončena ponořením proužku do ekvilibračního roztoku s obsahem alkylačního činidla. Oba roztoky obsahují dodecylsírán sodný, který se váže na všechny rozdělené proteiny a uděluje jim jednotný poměr záporného náboje ke hmotnosti. Elektrostatické odpuzování molekul SDS způsobí denaturaci proteinu a eliminuje se tak vliv tvaru proteinu na pohyblivost. Separace proteinů v druhém rozměru pak probíhá pouze na základě molekulární hmotnosti a není již nábojem a tvarem ovlivněna. SDS navíc štěpí vodíkové můstky a ruší hydrofobní interakce, zabraňuje tak agregaci fokusovaných proteinů.

2.2.1.4 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Po ekvilibraci IPG proužků s proteiny rozdělenými podle jejich pI jsou tyto podrobeny separaci ve směru kolmém na IEF. Ta je realizována v polyakrylamidovém gelu opět obsahujícím SDS (SDS-PAGE). Podle molekulové hmotnosti lze proteiny dělit na dva základní typy gelů. Homogenní jsou vhodné pro separaci proteinů v úzkém hmotnostním rozmezí. Pokud jsou však rozdíly v molekulárních hmotnostech proteinů velké, separace je účinnější na gelech gradientových, kde koncentrace akrylamidu kontinuálně stoupá od začátku ke konci gelu. Snižuje se tak velikost pórů a s ní i prostupnost pro větší molekuly. Děj probíhá při konstantní hodnotě napětí, která umožňuje migraci proteinů s uděleným negativním nábojem (Görg a kol., 2004).

2.2.2 Blotování

Po separaci proteinů v gelu jsou tyto přeneseny působením elektrického proudu na nitrocelulóзовou nebo PVDF membránu, která je oproti gelu významně odolnější. Navíc lze na membráně imobilizované proteiny podrobit dalším imunochemickým reakcím, zatímco gely tuto možnost nenabízejí. Blotování bylo poprvé realizováno a zdokumentováno v roce 1979 (Towbin a kol., 1979). Rozlišujeme 4 základní způsoby přenosu proteinů na membránu: difúzní, kapilární, vakuový a elektroblot.

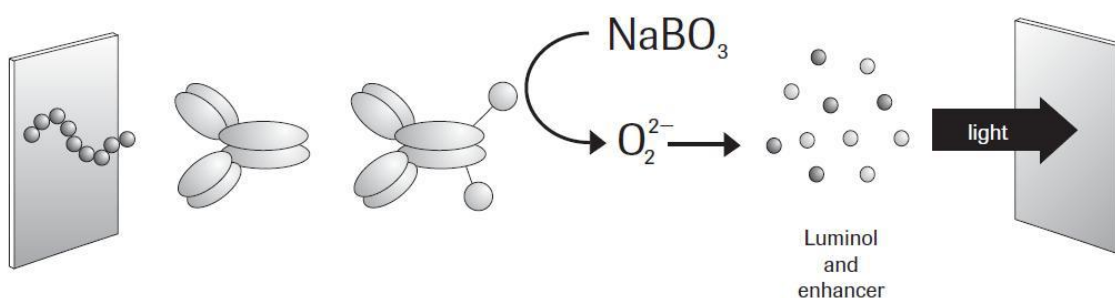
Elektroblotování je považované za nejrychlejší a nejúčinnější. Hnací silou je působení elektrického pole. Podle uspořádání je rozdělujeme na tankové a polosuché. Pro blotování proteinů s vysokou molekulovou hmotností nebo termolabilních proteinů je výhodnější použití tankového elektroblotu. Stejně jako u polosuchého blotování existuje možnost přenosu bílkovin z několika gelů zároveň (Glatz, 1995).

2.2.3 Imunodetekce

Pro specifickou detekci proteinů vázaných na membráně, které reagují s primární protilátkou je nejdříve potřeba membránu vystavit působení roztoku, který blokuje vznik nespecifických vazeb protilátek na membránu. K tomuto účelu se nejčastěji používá roztok inertních bílkovin: sušeného odtučněného mléka, hovězího sérového albuminu, želatiny či kaseinu. Případně je možné aplikovat neiontové detergenty (Triton X 100, Tween 20). Blokovací roztok nesmí vytěšňovat nebo modifikovat přenesené bílkoviny a ovlivňovat následnou detekci (Glatz, 1995).

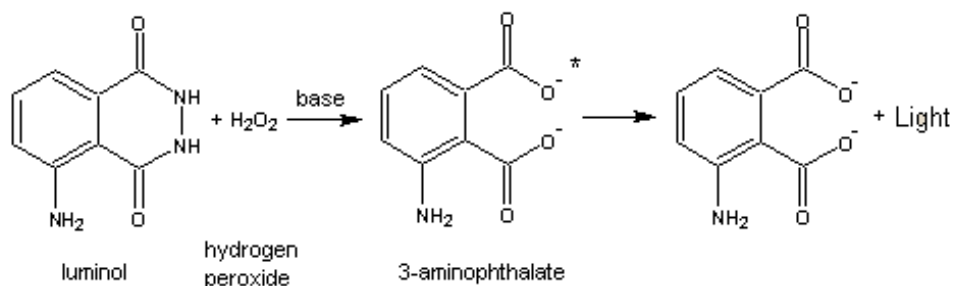
Po navázání primární protilátky na proteiny fixované na membráně, je pro účely vizuální detekce nutné komplexy antigen-protilátka zviditelnit. Proto je membrána dále vystavena působení specifické sekundární protilátky, značené radioaktivně, fluorescenčně, luminiscenčně či konjugované s enzymy, nejčastěji peroxidázy nebo fosfatázy. Ty v přítomnosti vhodného substrátu způsobí buď změnu barvy či emisi záření pouze v místě výskytu sekundární protilátky. Protože sekundární protilátky vytvářejí polyvalentní vazbu, zesilují signál (Glatz, 1995).

Obrázek č. 1:



Konjugovaným enzymem může být křenová peroxidáza, která v přítomnosti peroxidu oxiduje luminol. Ten následně vyzařuje světelné záření zachytitelné na fotografický film.

Obrázek č. 2:



(web roche-applied-science)

2.3 Srovnávací analýza

Srovnávací analýza slouží ke srovnávání vzorků mezi sebou a s kontrolním vzorkem. Nejčastěji je realizována pomocí výpočetní techniky se specifickým software, který zajišťuje objektivní porovnání. V takovém případě je třeba gely či filmy s vyznačenými proteiny převést do digitální formy. Nejedná-li se o gely značené fluorescenčními barvivy či radioaktivními izotopy, používají se pro digitalizaci kamerové systémy s nastavitelným expozičním časem a clonou. Následuje vlastní analýza v programech jako je Melanie či PDQuest. Tyto programy jsou primárně určené k analýze gelů, ale vzhledem k absenci speciálních programů pro analýzu filmů, využívají se i k tomuto účelu. Zásadní pro srovnávací analýzu je dodržení stejných experimentálních podmínek u všech porovnávaných gelů či filmů. Program nabízí automatické funkce, které významně usnadní analýzu a zároveň do značné míry garantuje objektivitu výsledků (Bouchal a Kučera, 2003).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Zvířata, biologický materiál

„Specific pathogen free“ (SPF) myši BALB/c, samice z chovu Velaz s. r. o. Praha, byly chované za SPF podmínek v chovných boxech Tough Slim Line (Techniplast, Itálie) na Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové. Hmotnost jedinců se pohybovala mezi 15-18 gramy.

Bakterie *Francisella tularensis holarctica* FSC 200 (FOI Umeå, Švédsko)

3.1.2 Roztoky, činidla, média

Agarosa (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Akrylamid (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Azid sodný (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

BCA - Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Benzonáza ® Nukleáza, 315 U/ml (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Bromfenolová modř (Serva, Heidelberg, Německo)

Complete, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)

De Streak reagent 12µl/ml (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko)

Deionizovaná voda (ÚMP, Hradec Králové, Česká republika)

DTT - Dithiothreitol (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko)

ECL kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo)

Glycerol (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Glycin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Chamberlainovo médium (Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové)

CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko)

Chlorid draselný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

Chlorid sodný (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

Iodoacetamid (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

IPG-proužky Immobiline DryStrip pH 3-10, 18 cm (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

IPG-pufr pH 3-10 (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
IPG-pufr pH 8-10 (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
Metanol (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
Močovina (Merck, Darmstad, Německo)
Parafínový olej (Merck, Darmstad, Německo)
PDA - 1, 4-bis(akryloyl)piperazin (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Persíran amonný (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
SDS - Dodecylsírán sodný (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Sekundární butanol (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
Sekundární protilátka Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP
(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
TEMED - N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (Amersham Pharmacia Biotech
Uppsala, Švédsko)
Thiosírán sodný (Merck, Darmstad, Německo)
Tris base - Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
Tris-HCl - Hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Sigma, St. Louis,
Montana, USA)
Tween 20 – polyoxyethylen-sorbitan monolaurát (Sigma, St. Louis, Montana,
USA)
Ustalovač (AGFA, Mortsel, Belgie)
Vývojka (AGFA, Mortsel, Belgie)

3.1.2.1 Složení roztoků

Dolní pufr pro ELFO:

Pufr pro ELFO 20 l

Azid sodný 4 g

Ekvilibrační roztok

0,5 M Tris pH 6,8 10 ml

Močovina 36 g

Glycerol 30 ml

SDS 2 g

Deionizovaná voda do objemu 10 l

Ekvilibrační roztok s DTT

Ekvilibrační roztok 50 ml

DTT 1 g

Ekvilibrační roztok s iodacetamidem

Ekvilibrační roztok 50 ml

Iodacetamid 1,25 g

Bromfenolová modř 1% 250 µl

10% persíran amonný

Persíran amonný 200 mg

Deionizovaná voda 2 ml

Pufr pro ELFO:

Glycin 576 g

Tris 120 g

SDS 20

Deionizovaná voda 20 l

Pufrovaný fyziologický roztok (PBS)

Chlorid sodný 8 g

Chlorid draselný 0,2 g

Dihydrogenfosforečnan draselný 0,2 g

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného 2,89 g

Destilovaná voda do objemu 1 l

Roztok agarózy

Agaróza 0,5 g

Pufr pro ELFO 100 ml

Roztok akrylamidu s PDA

Akrylamid 45 g

PDA 1,2 g

Deionizovaná voda do objemu 150 ml

Roztok RTS-D s IPG pufrem pH 3-10

6M močovina 1,8 g

2M thiomočovina 0,76 g

4% CHAPS 0,2 g

40mM Tris-base 24,25 mg

0,12% De Streak Reagent 50 µl

0,5% bromfenolová modř 10 µl

0,1% IPG-pufr pH 3-10 50 µl

Deionizovaná voda do objemu 5 ml

TBS

Tris-base 48,4g
Chlorid sodný 160 g
1M kys. chlorovodíková 76 ml
Konc. HCl do pH 7,6
Deionizovaná voda do objemu 2 l

Vodou saturovaný butanol

Sekundární butanol 50 ml
Deionizovaná voda 10 ml

TBST 0,05%

Koncentrovaný TBS 200 ml
Tween 20 1 ml
Deionizovaná voda do objemu 2 l

TBST 0,1%

Koncentrovaný TBS 200 ml
Tween 20 2 ml
Deionizovaná voda do objemu 2 l

5% thiosíran sodný

Thiosíran sodný 5 g
Deionizovaná voda 10 ml

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Tris Base 72,66 g
Tris-HCl 23,66
Deionizovaná voda 400 ml

Transfer pufr

Tris-base 15,15 g
Glycin 72 g
Metanol 1 l
Deionizovaná voda do objemu 5 l

3.1.3 Pomůcky a přístroje

Analytické váhy AX 105 (Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko)
Automatické mikropipety Proline (Biohit, Helsinky, Finsko)
Centrifuga Jouan CR312 (Jouan, Francie)
Centrifuga Sorvall Evolution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Gradientní mixér Gradient Former 395 (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Hybridiser HB-1D (Techne, Cambridge, UK)
Laminární box S@FE FLOW 1. 2 (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Latexové rukavice (Hartmann)
Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Mrazicí box MDF C2156VAN Sanyo ultra low -153°C (Sanyo, Japonsko)
Mrazicí box PowerFREEZE -87°C VXE (Jouan, Francie)
PROTEAN II xi 2-D Multi-Cell (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
PROTEAN II xi Multi-Gel Casting Chamber (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Protein IEF Cell (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
Příruční densitometr C08000 Cell Density Meter (WPA Biowave, Cambridge, UK)
PVDF membrány (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)
Speed Vac (Eppendorf, Hamburg, Německo)
Spektrofotometr Helios Gamma (Thermo Spectronic, Cambridge, UK)
Stanice KODAK Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)
Termostat s cirkulací MultiTemp™ (LKB Produkter, Bromma, Švédsko)
Třepačka IKA HS 260 basic (Schoeller instruments, Praha, Česká republika)
Běžný laboratorní materiál: plastové zkumavky, pipety, špičky, očkovací kličky, kultivační misky, misky na gely, pinzety, skalpel, filtrační papír, odměrné válce, kádinky

3.1.4 Software

ImageMaster 2D Platinum Software Version 6. 0 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)

Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)

3.2 Pracovní postup

Připravili jsme celobuněčný lyzát *F. tularensis*, který jsme podrobili separaci 2D elektroforézou. Pomocí elektroblotu jsme proteiny přenesli na membránu. Následovala imunodetekce s použitím předem připravených myších sér. Myší séra byla odebrána 24 a 48 hodin po infekci. Srovnávací analýzou jsme zjišťovali výskyt jednotlivých proteinů detekovaných při imunodetekci imunními séry oproti kontrolnímu séru získanému od neinfikovaných myší.

3.2.1 Infekce myší a příprava séra pro detekci

Z celkového počtu 18 myší, jsme 12 infikovali intraperitoneálně v dávce 10^2 mikrobů na myš v objemu 0,2 ml ve fyziologickém roztoku. Zbylých 6 myší jsme neinfikovali, jejich sérum bylo použito jako kontrolní. Po 24 hodinách od infekce jsme vykrvili 6 infikovaných myší, které jsme předem uspali 100% CO₂. Po 48 hodinách od infekce jsme odebrali krev od zbylých 6 infikovaných a uspaných myší. Krev jsme nechali v lednici inkubovat 30 minut. Po uvolnění krevního koláče tyčinkou jsme vzorky podrobili odstředování při 1200 rpm a 4°C po dobu 10 minut. Supernatant jsme odebrali do nových zkumavek a tento postup jsme opakovali ještě dvakrát. Vzniklé sérum jsme opatrně odebrali a zamrazili na -80°C. Tímto postupem jsme získali po šesti 24 a 48 hodinových imunizovaných sér a šest kontrolních, ta budou při detekci použita jako primární protilátky.

3.2.2 Příprava proteinů *F. tularensis*

Kulturu *F. tularensis* FSC200 jsme masivně naočkovali na tři plotny McLeod a nechali inkubovat 24 hodin při 37°C. V laminárním boxu jsme předehřáli kompletní médium dle Chamberlaina, 20 ml jsme napipetovali do 50 ml zkumavky Falcon, kam jsme sterilní kličkou naočkovali bakterie ze dvou ploten. 3 ml suspenze jsme odebrali pro změření optické density (O.D.), požadovaná hodnota O.D. je 0,3. Suspenzi jsme vpravili do 60 ml předehřátého Chamberlainova média a na třepačce nechali při 200 rpm a 36,8°C inkubovat přes noc (asi 16 hodin).

Za 24 hodin jsme narostlou bakteriální suspenzi centrifugovali při 7300 rpm a 4°C po dobu 15 minut. Sediment jsme dvakrát promyli studeným pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) a naředili kompletním Chamberlainovým médiem na

koncentraci s O.D. 0, 1. Vzniklou suspenzi jsme nechali inkubovat při 200 rpm a 36, 8°C. V hodinových intervalech jsme z bakteriální kultury odebírali vzorky na měření O.D., CFU a koncentrace: 3 ml pro měření O.D., jejíž hodnota musí růst a 2 ml pro výsev na McLeod půdy s ředěním:

Kultivovali jsme do O.D. 0,6, tedy 5-6 hod. Suspenzi jsme odstřeďovali 15 minut při 7300 rpm a 4°C. Sediment jsme promyli studeným PBS pufrům a odstřeďovali při 6500 rpm a 4°C po dobu 30 minut. Po opětovném promytí a odstředění jsme sediment resuspendovali ve 3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8) s inhibitory proteáz Complete EDTA-free. Produkt jsme zamrazili na -20°C do druhého dne.

Následující den jsme suspenze rozbíjeli metodou French press. Suspenze jsme rozplnili do kryotub po 1 ml a do každé přidali 1 µl benzonázy, která štěpí nukleové kyseliny. Rozbíjení probíhalo dvěma průchody při 16000 ψ. Získaný supernatant jsme odstřeďovali při 6500 rpm a 4°C po dobu 30 minut. Vzniklý supernatant jsme uschovali a sediment resuspendovali ve 3 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8). Celý postup rozbíjení jsme zopakovali a vzniklý supernatant jsme spojili s prvním. Odebrali jsme vzorek pro stanovení bílkoviny a zbytek rozplnili do eppendorfek a zamrazili na -150°C.

3.2.3 Stanovení bílkoviny

Ke stanovení bílkoviny jsme použili komerční sadu Bicinchonic Acid Protein Assay Kit. Pro sestavení kalibrační křivky jsme změřili 6 koncentrací. Jako standard jsme použili hovězí sérový albumin (BSA) v koncentraci 1 mg/ml v roztoku 0,9% chloridu sodného a 0,05% azidu sodného. Činidlo je tvořeno 50 díly roztoku bicinchoninové kyseliny a 1 dílem 4% roztoku síranu měďnatého. Podle následující tabulky jsme připravili vzorky pro kalibraci, každý minimálně dvakrát.

Tabulka č. 2: Složení vzorků pro vytvoření kalibrační křivky

Vzorek pro kalibraci	Deionizovaná voda	Standard	Činidlo
1	50 µl	-	1 ml
2	40 µl	10 µl	1 ml
3	30 µl	20 µl	1 ml
4	20 µl	30 µl	1 ml
5	10 µl	40 µl	1 ml
6	-	50 µl	1 ml

Pro stanovení bílkoviny ve sledovaném vzorku jsme automatickou pipetou odebrali 10µl vzorku a 40 µl deionizované vody do označené eppendorfky, opět minimálně dvakrát. Stejně jako u kalibračních roztoků jsme po přidání činidla nechali roztok inkubovat 30 minut při 37°C. Po ochlazení následovalo proměření všech vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm. Použitý spektrofometr podle změřených absorbancí kalibrační řady vypočítal kalibrační parametry a a b z kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci ve tvaru:

$$y = ax + b$$

Dosazením naměřených absorbancí vzorků (hodnoty y) do dané rovnice jsme vypočítali koncentraci bílkoviny ve zkoumaných vzorcích (hodnoty x). Pro další zpracování jsme použili takový objem vzorků, aby obsahoval 100 µg bílkoviny.

3.2.4 Dvourozměrná gelová elektroforéza

Separace proteinů v gradientním polyakrylamidovém gelu probíhá za přítomnosti SDS s použitím PDA jako zesíťovače.

3.2.4.1 Pasivní in-gel rehydratace a izoelektrická fokusace

Do mikrozkušavek jsme odebrali objem vzorku odpovídající 100 µg bílkoviny a doplnili do 350 µl směsí roztoku RTS-D a IPG pufru pH 3-10. Do rehydratační misky s výše uvedeným roztokem jsme vložili IPG-proužek, zalili parafínovým olejem, přikryli víkem a nechali rehydratovat přes noc (asi 16 hodin) při laboratorní teplotě.

Následující den jsme na IPG-proužky o délce 18 cm položili proužky mírně navlhčeného IEF-filtračního papíru a přes ně přiložili elektrody přístroje. Izoelektrická

fokusace probíhala při 20°C. Po ukončení jsme proužky uložili do zkumavek a zamrazili na -80°C

3.2.4.2 Příprava polyakrylamidových gelů

K přípravě gelu s lineárním gradientem koncentrace akrylamidu jsme připravili pouze roztoky s nejnižší a nejvyšší koncentrací akrylamidu, tedy 9% a 16%.

Tabulka č. 3: Složení lehkého a těžkého roztoku pro přípravu gradientního gelu

	9% lehký roztok	16% těžký roztok
Roztok akrylamidu s PDA	55,1 ml	108,5 ml
Tris-HCl pH 8, 8	48,4 ml	48,4 ml
Deionizovaná voda	87,8 ml	34,5 ml
5% thiosíran sodný	0,945 ml	0,945 ml

Do nalévací komory jsme položili skleněnou vnější desku, těsně podél bočních stěn komory i desky vymezovače tloušťky gelů. Mezi ně jsme vložili pomocnou destičku a poté jsme přiložili další kratší skleněnou desku. Na povrch této soustavy jsme položili separační folii. Postup jsme opakovali ještě pětkrát, tak abychom v komoře mohli připravit šest gelů naráz. Pomocí gradientní míchačky jsme mezi upevněná skla nalili oba gelové roztoky, ke každému jsme přidali 0,65 ml roztoku persíranu a 65 µl TEMEDu a rychle promíchali. V horní části gelu je koncentrace nejnižší, tedy 9%. Koncentrace rovnoměrně stoupá směrem dolů až na 16%. Gradientní roztok gelu jsme převrstvili vodou saturovaným butanolem a nechali hodinu polymerovat. Poté jsme butanol odsáli.

3.2.4.3 Ekvilibrace IPG-proužků

Rozmražené fokusované IPG-proužky jsme ponořili do ekvilibračního roztoku s DTT a 15 minut protřepávali. Roztok jsme slili a vyměnili za ekvilibrační roztok s přídavkem iodoacetamidu a 1% roztoku bromfenolové modři (indikační barvivo). Po 15 minutách třepání jsme proužky opláchli deionizovanou vodou.

3.2.4.4 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Ekvilibrované IPG-proužky jsme umístili na horní část polymerovaných gelů mezi krycí skla a převrstvili 1 ml předem připraveného roztoku agarózy zahřátého asi

na 70°C. Po zchladnutí je již každý IPG-proužek pevně ukotven na polyakrylamidovém gelu a soustava je připravena na vlastní elektroforézu.

Takto připravené gely jsme upevnili do držáků přístroje PROTEAN II Multi-Cell. Vnější nádobu přístroje jsme z části naplnili dolním pufem a odstranili případné bubliny z gelů. Teplotu jsme udržovali na 15°C pomocí připojeného termostatu. Pomocí připevněných svorek jsme gely připojili k chladicímu jádru. Nádobu jsme doplnili pufem a přístroj na ELFO připojili na programovatelný zdroj elektrického napětí. Po nastavení podmínek průběhu (Tab. 4) jsme spustili proces separace proteinů. Ten byl ukončen po vyplavení bromfenolové modři z gelů.

Tabulka č. 4: Podmínky průběhu elektroforézy

	elektrický proud	elektrické napětí	příkon	doba trvání
1. fáze	5 mA/gel	500 V	100W	1 hod 30 minut
2. fáze	40 mA/gel	500 V	100W	5 hod

Po ukončení ELFO jsme slili pufr a vyjmuli skla s gely. Gely jsme opatrně oddělili od skel a vložili do vaniček s transfer pufem.

3.2.5 Blotování

PVDF membrány a filtrační papíry jsme nastříhali do velikosti polyakrylamidového gelu. Membrány jsme minutu promývali v metanolu a potom 20 minut v transfer pufru. Polyakrylamidový gel se působení transfer pufru vystaví po dobu 10 minut.

Sestavili jsme blotovací jednotku, jednotlivé vrstvy jsme pokládali na sebe v pořadí: transfer pufr navlhčená porézní podložka, navlhčený filtrační papír, polyakrylamidový gel, PVDF membrána, navlhčený filtrační papír, navlhčená porézní podložka. Mezi vrstvami nesmí být bubliny, proto se vzduch v průběhu sestavování vytlačuje rolující zkumavkou. Po uzavření držiče gelu jsme blotovací jednotku umístili mezi vodící lišty do nádoby z poloviny naplněné transfer pufem. Najednou se dají blotovat 3 jednotky. Tento systém pro blotování jsme napojili na zdroj napětí. Transfer proteinů běží přes noc při 30 V a 0,1 A. Následující den ráno po dobu 1 hodiny při 60 V a 0,3 A. Po dokončení elektroblotu, jsme přístroj vypnuli a odpojili.

Poté jsme opatrně vyjmuli gely i membrány a vložili je do vaniček s destilovanou vodou, usušili a do zahájení blotování uchovávali při 4°C.

3.2.6 Imnodetekce

Membrány jsme po dobu jedné minuty aktivovali v metanolu, potom jsme je na 10 minut ponořili do TBS za stálého kývání. Veškerá manipulace s membránami probíhala za pomoci pinzety. K zablokování nespecifických vazebných míst jsme membránu hodinu promývali ve 100 ml 4% roztoku mléka v TBST 0,1%. Poté jsme membránu třikrát po 5 minutách promyli v TBST 0,1%. Takto připravenou PVDF membránu jsme nechali přes noc inkubovat s připraveným rozmraženým myším sérem, tedy roztokem primární protilátky v ředění 1:100 ve 4% roztoku mléka v TBST 0,1%. Inkubace probíhala v hybridizéru při 30°C. Použili jsme séra kontrolní a imunní odebraná po 24 a 48 hodinách od inkubace.

Následující den jsme membrány šestkrát po dobu 5 minut promývali TBST 0,05% v hybridizéru při 30°C. Po zbavení membrány přebytku primární protilátky jsme opět blokovali tvorbu nespecifických vazeb působením 4% mléka v TBST 0,1% dvakrát 10 minut. Dále byla membrána inkubována s roztokem sekundární protilátky v 5% mléku v TBST 0,1% po dobu 45 minut, ředění 1:1000. Jako sekundární protilátku jsme použili polyklonální kozí imunoglobuliny proti myším protilátkám, konjugované s křenovou peroxidázou, které reagují se všemi podtřídami myšího IgG, myším IgA a myším IgM.

Následovalo důkladné promytí TBST 0,05%, šestkrát po dobu 9 minut. Před aplikací chemiluminiscenčního kitu (ECL) jsme membránu 5 minut proplachovali v TBS a na závěr omyli vodou.

3.2.6.1 Detekce ECL

30 minut před dokončením promývání, jsme smíchali na 1 membránu 8 ml roztoku A a 80 µl roztoku B. Aktivovaný ECL kit jsme aplikovali na membránu a nechali minutu působit. Membránu jsme osušili a vložili do kazety. V temné komoře jsme do kazety vložili autoradiografický film, na který se tak zachytí emise záření v místě navázání protilátky. Filmy je dále potřeba vyvolat ponořením do vývojky a do ustalovače, opláchnout a usušit.

3.2.7 Srovnávací analýza

Filmy jsme nejprve naskenovali, uložili do správného formátu a poté převedli do programu pro srovnávací analýzu ImageMaster 2D Platinum. Zde jsme filmy dále upravovali. Pro spuštění automatické analýzy však bylo pozadí stále příliš intenzivní, proto jsme porovnávali výskyt jednotlivých proteinů i přímo, bez asistence výpočetní techniky. Hledali jsme proteiny, které by reagovaly pouze s imunními séry a ne s kontrolními.

4 Výsledky

V rámci předkládané práce byla provedena detekce vzniku specifických protilátek reagujících na infekci *F. tularensis* v časné fázi infekce. Zvolili jsme 24 a 48 hodinový interval pro odběr séra infikovaných myší BALB/c. Séry jsme promývali celobuněčný lyzát *F. tularensis* a hledali proteiny, na které by reagovala pouze imunizovaná séra. Vizualizaci jsme provedli chemiluminiscenčně na fotografický film.

Celkem jsme realizovali šest nezávislých pokusů a získali tak šest filmů zobrazujících imunoreaktivitu sér myší infikovaných 24 hodin, šest filmů zachycujících protilátkovou produkci v myším séru 48 hodin po infekci a šest kontrolních filmů.

Srovnávací analýzu jsme prováděli na specializovaném softwaru ImageMaster 2D Platinum. Ten je však primárně určený pro analýzu gelů, nikoli filmů. Naše filmy byly zatíženy významným pozadím, které program nedokázal eliminovat a nebyl schopen provést poloautomatické hodnocení. Srovnávací analýzu jsme tedy prováděli přímo, bez asistence výpočetní techniky. Tento postup se ukázal jako poměrně náročný, zejména z důvodu postupného tmavnutí filmů na světle. Nakonec tedy byla k analýze použita kombinace obou postupů za kontinuálního srovnávání výsledků. Vzhledem k tomu, že naším cílem bylo zjistit, zda existuje velmi časná protilátková odpověď na intracelulární bakterii *F. tularensis*, hledali jsme pouze proteiny, které by tuto odpověď vyvolaly u všech infikovaných myší a u žádné zdravé. Proteiny, které se nevyskytovaly na všech čitelných filmech daného intervalu jsme vyřadili. Vyřazeny byly samozřejmě i proteiny, které se vyskytovaly buď na jedné ze šesti kontrol. Počet původně detekovaných proteinů se tak významně snížil a to na tři. Všechny tři proteiny indukovaly tvorbu protilátek již 24 hodin po infekci *F. tularensis* a v séru jsme je detekovali i po 48 hodinách od infekce.

Čitelným segmentem filmu myslíme takový, na kterém prokazatelně proběhla kompletní imunodetekce, tzn. jsou zde viditelné okolní proteiny či jejich izoformy. Pokud je tedy na filmu segment čistě bílý či naopak velice tmavý, stal se nehodnotitelným a byl tak z analýzy daného proteinu vyřazen.

Protože jsme měli k dispozici proteinovou mapu vakcinačního kmene *F. tularensis* LVS, provedli jsme předběžnou identifikaci za pomoci srovnávací analýzy s touto mapou. Oba kmeny, *F. tularensis* LVS i *F. tularensis* FSC200, patří do

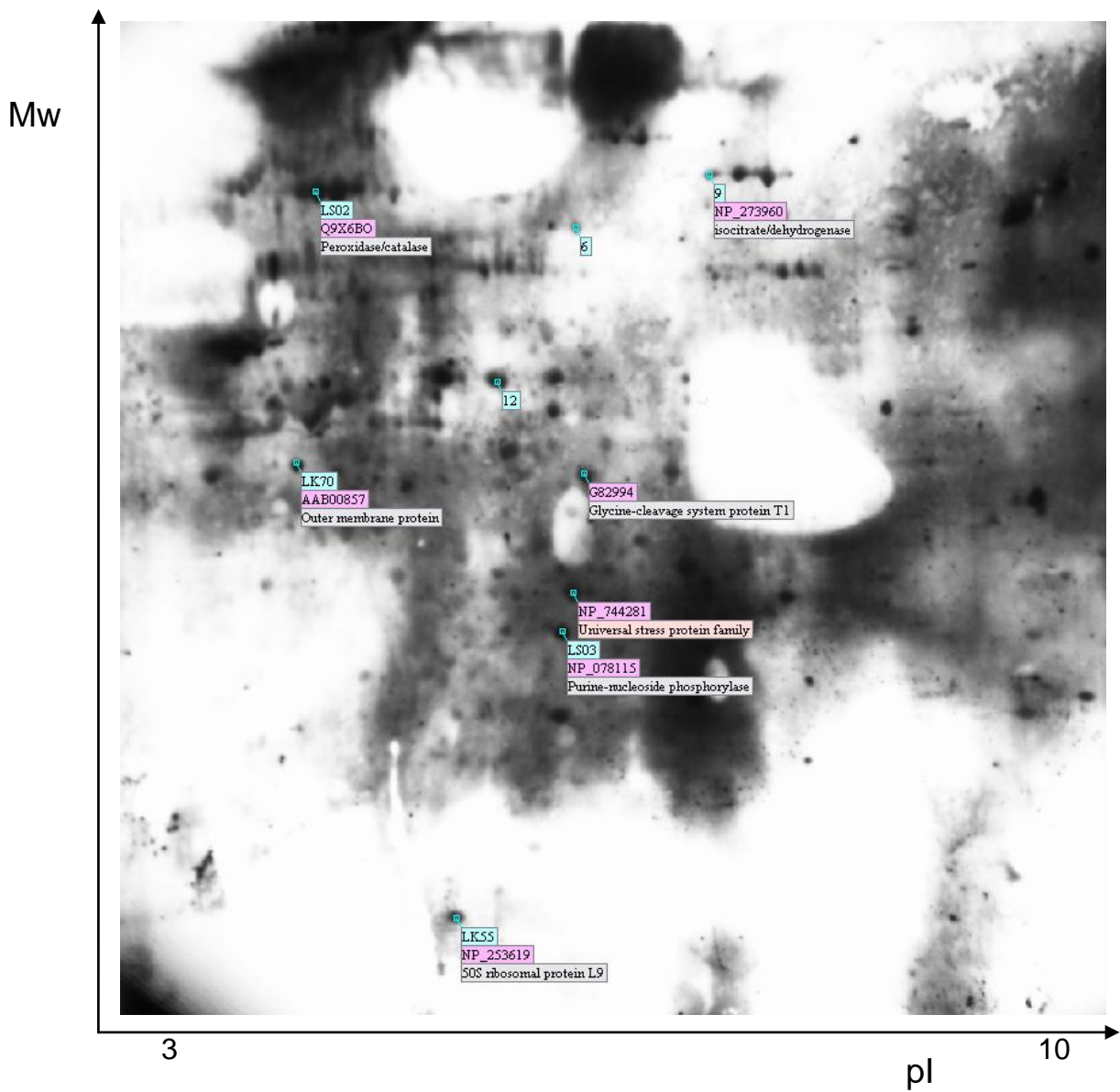
poddruhu *F. tularensis holarctica* a na genové i proteomové úrovni se liší jen velmi málo. Srovnáním blotů s elektroforetickou 2D mapou jsme zjistili, že se pravděpodobně jedná o proteiny uvedené v tabulce č. 5. Číslo byla proteinům přidělena před vznikem celosvětové databáze proteinů *F. tularensis holarctica* LVS. Sloupec „Shoda“ určuje míru sekvenční homologie s proteiny z databáze proteinů *F. tularensis holarctica* LVS.

Tabulka č. 5: Proteiny indukující tvorbu protilátek 24 a 48 hodin po infekci

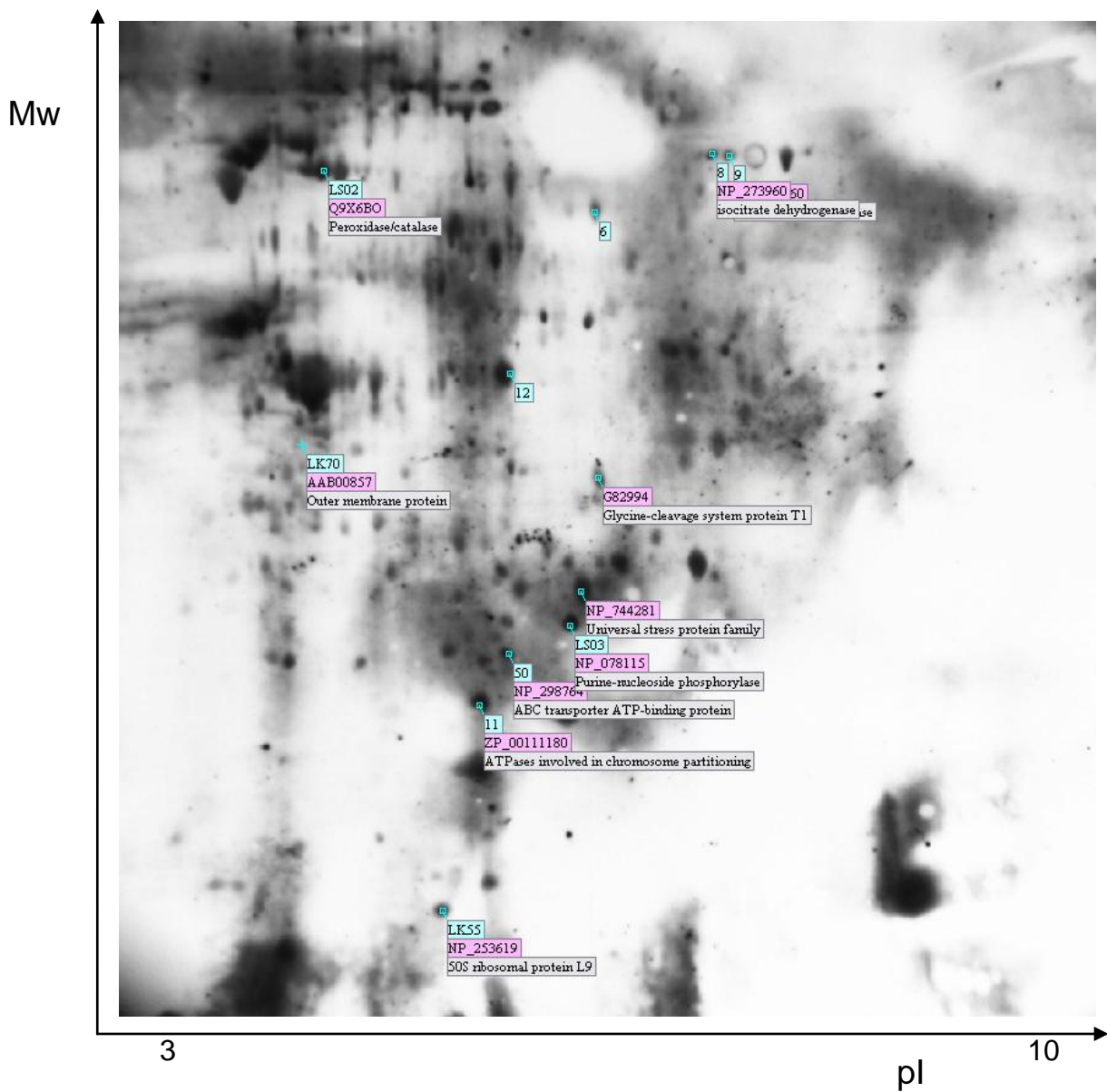
Číslo proteinu	Shoda	Číslo v databázi ¹	Název proteinu	Popis
NP_273960	62%	FTL_0588	izoforma isocitrát dehydrogenázy	„house keeping“ protein
NP_298764	88%	FTL_1229	ATP vázající kazetový transportér	potencionální faktor virulence
ZP_00111180	30%	FTL_0428	ATPáza podílející se na dělení chromozomů	„house keeping“ protein

¹ přístupové číslo proteinu v mezinárodní databázi (NCBI nr)

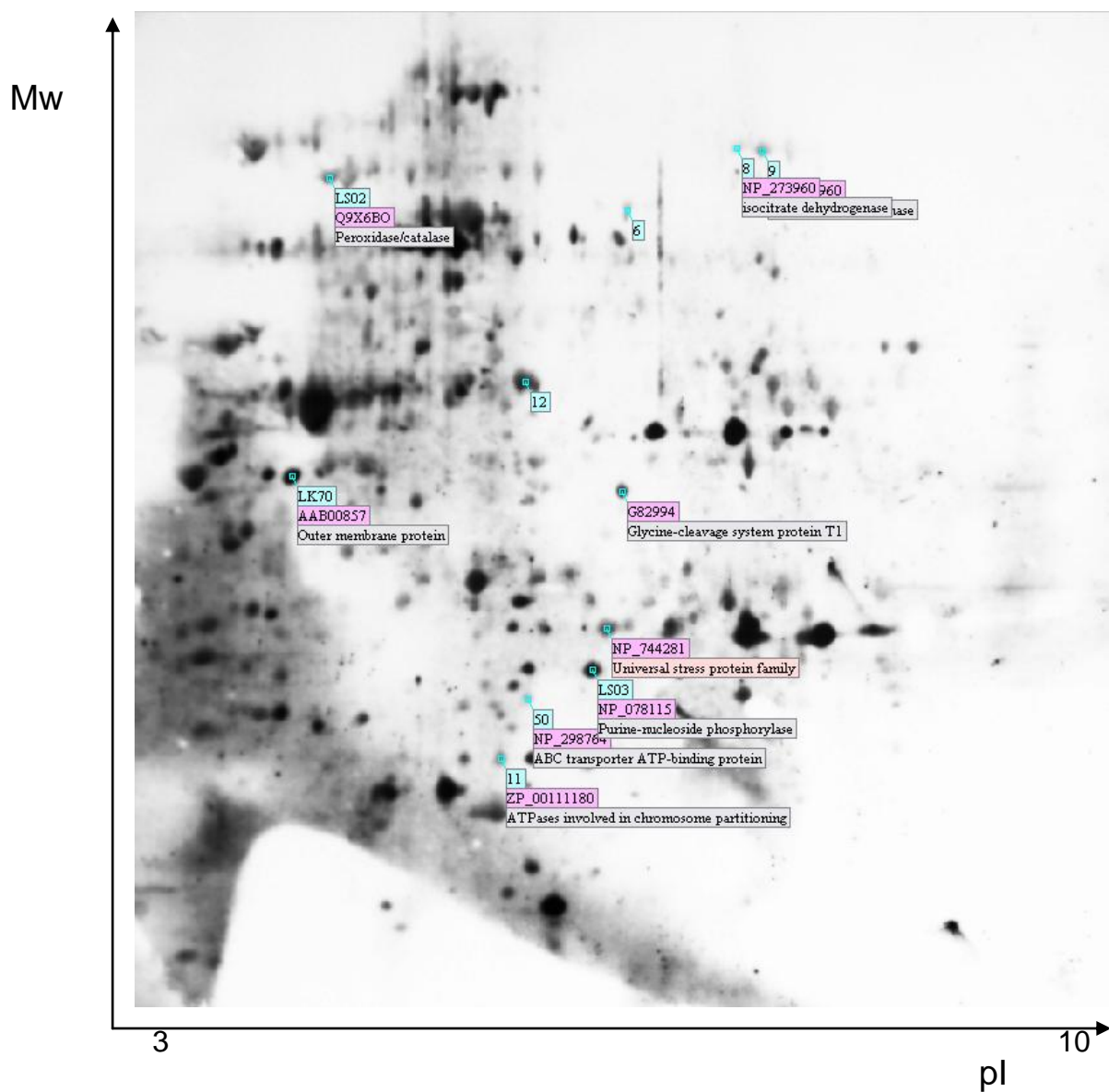
Detekovali jsme tedy přítomnost tří specifických protilátek. Ostatní proteiny označené na filmech sloužily jako značky pro orientaci při srovnávací analýze. Každý gel je totiž originální a nelze je pouze přiložit na sebe. Je potřeba počítat s mírnými odchylkami v umístění identických proteinů na více gelech a následně filmech.



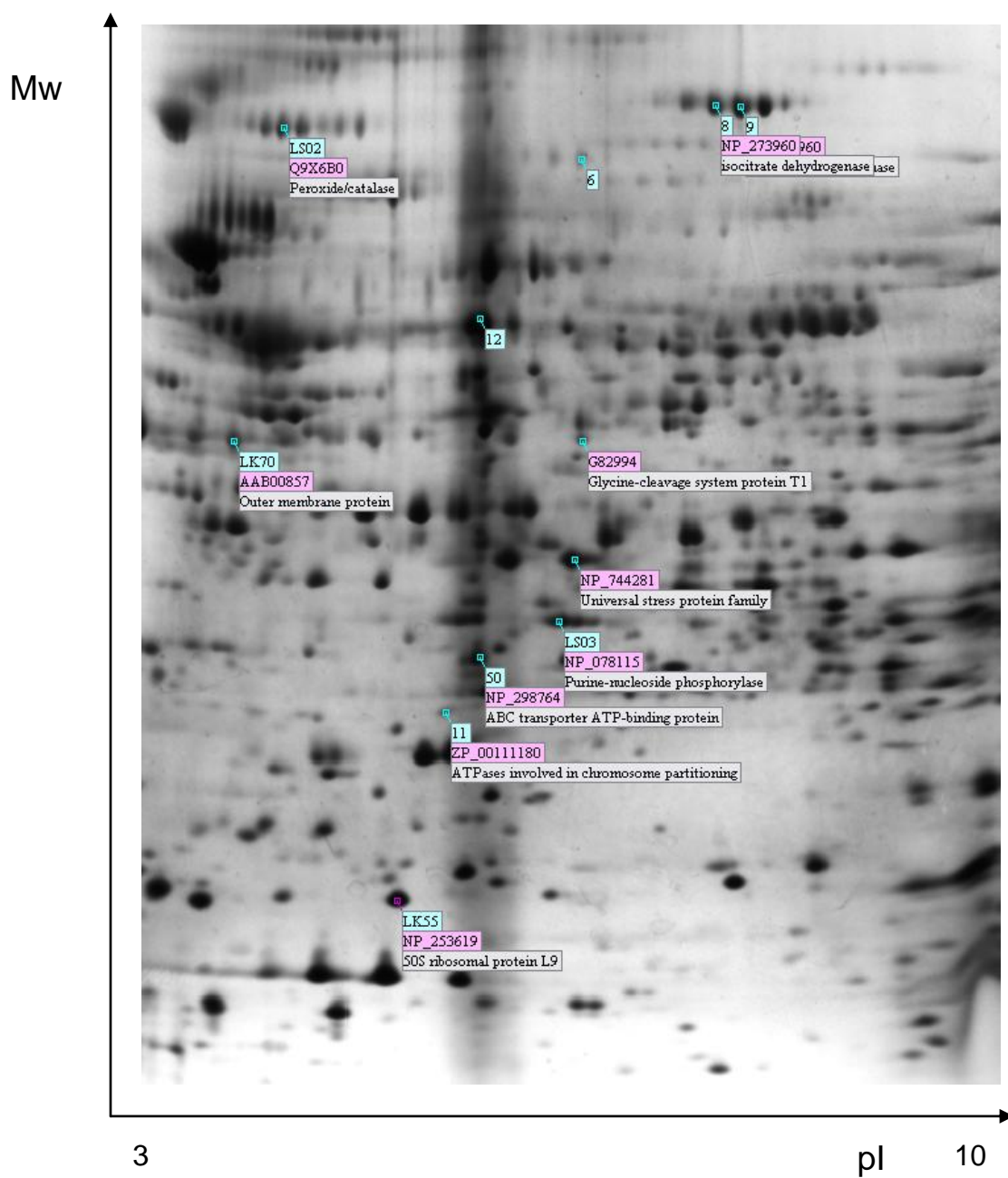
Obrázek č. 3: Reprezentativní film zobrazující kontrolní 2D proteinovou mapu.



Obrázek č. 4: Reprezentativní film zobrazující 2D mapu imunoreaktivních proteinů po inkubaci se sérem myši infikovaných po dobu 24 hodin.



Obrázek č. 5: Reprezentativní film zobrazující 2D mapu imunoreaktivních proteinů po inkubaci se sérem myší infikovaných po dobu 48 hodin.



Obrázek č. 6: Referenční stříbřený gel s 2D proteinovou mapou *F. tularensis* LVS.

5 Diskuze

Naše studie vychází z prací, ve kterých byla prokázána účast B lymfocytů v časně fázi imunitní reakce na infekci intracelulární bakterií *F. tularensis*. Autoři některých publikací předpokládají, že zásadní je produkce cytokinů B lymfocyty, nikoli specifických protilátek (Culkin a kol., 1997; Elkins a kol., 1999). Autoři jiné studie však popsali vyšší odolnost myší s deficitem B lymfocytů, kterým bylo předem aplikováno imunní sérum, proti primární infekci *F. tularensis*, oproti myším, kterým imunní sérum podáno nebylo (Stenmark a kol., 2003). Studie publikované v poslední době ukazují, že specifické protilátky mají v obranné reakci hostitele na primární infekci své místo.

Vzhledem k tomu, že vzestup protilátek po infekci *F. tularensis* je patrný již první den (Pohanka, 2007), zvažovali jsme, jestli neexistuje souvislost s prací, která popisuje schopnost *F. tularensis* přímo interagovat s B lymfocyty (Kročová a kol., 2008). Pohankova studie však prokazuje pouze vzestup celkového množství plasmatických protilátek, nikoliv jejich reaktivitu s *F. tularensis*. V naší práci jsme chtěli ověřit hypotézu, zda ve velmi časně fázi po infekci *F. tularensis* dochází k produkci specifických protilátek tak, jak již bylo prokázáno po infekci virem influenza A. Ve studii kalifornského týmu z roku 2006 byly myším BALB/c po infekci virem odebrány B lymfocyty a byla sledována produkce specifických protilátek, která byla již po 48 hodinách od infekce významná (Coro a kol., 2006).

Takto rychlou produkci protilátek jsou schopny zabezpečit B lymfocyty subsetu B1. Subset B2 k tvorbě protilátek vyžaduje druhý signál od T lymfocytů a jejich produkce proto probíhá s delším časovým odstupem. Ovšem dosud se předpokládalo, že B1 B lymfocyty produkují pouze přirozené protilátky, jejichž většinu tvoří izotyp IgM (Krejsek a Kopecký, 2004b; Krejsek a Kopecký, 2004a). Proti předpokladu, že B1 B lymfocyty produkují jen přirozené protilátky, se staví již zmíněná práce z roku 2006, kde Coro a kol. stanovovali i podíl IgM v celkovém objemu časných specifických protilátek proti viru influenzy A a ten byl velice nízký. Kromě použité kontroly (B lymfocytů z neinfikovaných myší), tak vyloučili podíl přirozených protilátek i touto cestou. Pokud by tedy B1 B lymfocyty byly schopny i produkce dalších nízkoafinitních protilátek, vysvětlovalo by to vzestup protilátek již velmi časně po infekci *F. tularensis* v Pohankově práci z roku 2007.

Pokusili jsme se proto zjistit, jestli během prvních 48 hodin po infekci *F. tularensis* dochází k produkci specifických protilátek. Pro odlišení od přirozených protilátek byla jako kontrolní použita séra zdravých neinfikovaných myší. Hlavní lokalizací subsetu B1 B lymfocytů je peritoneální dutina, proto jsme v naší studii myši infikovali intraperitoneálně, aby byla protilátková odpověď dostatečně intenzivní pro námi zvolený způsob detekce.

Hledali jsme tzv. na thymu nezávislé antigeny (TI) *F. tularensis*, které by přímo indukovaly proliferaci a diferenciaci B lymfocytů. Tyto TI-1 antigeny mají na B lymfocyty mitogenní efekt a stimulují polyklonální aktivaci všech B lymfocytů, jak zralých tak nezralých. Typickým příkladem takového antigenu je lipopolysacharid, ovšem patří sem i bakteriální polysacharidy a polymerní formy bílkovin.

Kromě TI-1 antigenních struktur existuje ještě druhá skupina na T lymfocytech nezávislých antigenů TI-2, na které B1 B lymfocyty reagují produkcí přirozených protilátek. Jedná se o polymerní proteiny, či bakteriální kapsulární polysacharidy složené z mnohokrát opakovaných monomerních jednotek. Tvorba protilátek proti TI-2 je velmi důležitá, uplatňuje se při infekci významných patogenů, jako jsou např. opouzdřené mikroorganismy z rodu *Haemophilus* či *Streptococcus* (Krejsek a Kopecký, 2004b).

My jsme se zaměřili na hledání struktur TI-1 *F. tularensis*, které by indukovaly tvorbu specifických protilátek během prvních 48 hodin po infekci. Nabízel se postup, kdy bychom infikovaným myším odebrali séra, jejich proteinovou složku bychom podrobili separaci na 2D elektroforéze a za pomoci imunodetekce bychom zjistili, zda je v infikovaných sérech více proteinů reagujících s celobuněčným lyzátem *F. tularensis* než v sérech kontrolních. Z technických důvodů jsme tento postup museli změnit. Problém byl zejména v provedení separace sérových proteinů, kterých je mnoho a vzniklá proteinová mapa by byla značně nepřehledná.

Proto jsme zvolili opačný postup, kdy jsme na elektroforéze separovali buněčný lyzáat *F. tularensis* a ten imunodetkovali za pomoci sér infikovaných myší a kontrolních sér myší neinfikovaných. Séra jsme odebrali po 24 a 48 hodinách od infekce. Aby výsledky lépe odpovídaly obrazu reálné infekce, použili jsme plně virulentní kmen *F. tularensis holarctica* FSC 200. K vizualizaci detekovaných proteinů jsme použili chemiluminiscenční kit a srovnávací analýza tak probíhala na fotografických filmech.

Výše popsaným způsobem byly nalezeny tři imunoreaktivní proteiny. Jedná se o proteiny, které se vyskytovaly na všech čitelných filmech a na žádném ze 6 kontrolních. Podobných proteinů je pravděpodobně víc, avšak v našem experimentu jsme se zaměřili především na potvrzení či vyloučení teorie o produkci protilátek v časně fázi imunitní odpovědi na infekci *F. tularensis*. Proto jsme hledali proteiny, které by reagovaly jednoznačně pouze s infikovanými séry.

Tyto tři proteiny jsme předběžně identifikovali za pomoci srovnávací analýzy. K dispozici jsme měli pouze proteinovou mapu vakcinačního kmene *F. tularensis* (LVS) a identifikace tak byla spíše orientační.

Nalezený protein ZP_00111180 z 30% odpovídá FTL_0428 (ATPáza podílející se na dělení chromozomů). Protein NP_273960 odpovídá FTL_0588, tedy isocitrát dehydrogenáze z 62%. Nízká míra sekvenční homologie nemusí znamenat, že reálná podobnost funkce proteinů je malá. Shodný úsek může představovat konzervovanou proteinovou doménu či domény, které jsou typické pro určitou funkční skupinu proteinů. Výše uvedené proteiny považujeme za tzv. „house-keeping“ proteiny. Ty vykonávají funkce v zajištění nezbytných substrátů pro zachování životních funkcí a bakteriální proliferaci.

Třetí antigen, tedy ATP-vázající kazetový přenašeč NP_298764 je v současné době považován za potenciální faktor virulence. Míra sekvenční homologie s FTL_1229 je signifikantní, činí 88%. Předpokládá se, že hraje klíčovou roli v získávání nutričních substrátů, regulaci růstu, transportu intracelulárních signálních peptidů či zprostředkovává rezistenci k defenzinům hostitelů a toxickým peptidům (Macela a kol., 2006).

Zmíněné „house-keeping“ proteiny mohou tvořit součást proteomu více bakterií, ne pouze *F. tularensis*. Mohlo by se tedy jednat o pan-bakteriální antigeny a naše studie by tak získala obecnější charakter. Mohla by popisovat obecný fenomén schopnosti intracelulárních bakterií indukovat velmi časnou protilátkovou odpověď.

Výše uvedené informace o konkrétních proteinech je potřeba ověřit ve studii zaměřené přímo na tuto problematiku. Otázka jednoznačné identifikace a kvantifikace proteinů tak bude řešena v další práci, nejlépe s použitím hmotnostní spektrometrie či porovnáváním s proteinovou mapou virulentní *F. tularensis holarctica*.

Pokud bychom nalezené proteiny považovali za antigeny nezávislé na thymu, je pravděpodobné, že podobných struktur bude mít *F. tularensis* více, zejména charakteru polysacharidů a lipopolysacharidů. Ty však nemohly být v rámci této studie detekovány, protože 2D ELFO umožňuje pouze separaci proteinových struktur. Ani proteinové antigeny nemohly být zachyceny všechny zejména z důvodu denaturace proteinů před provedením 2D ELFO.

Časná syntéza protilátek proti *F. tularensis* je nepřímým důkazem pro zapojení B lymfocytů do velmi časně imunitní reakce při infekci intracelulárními patogeny. Přítomnost specifických protilátek již po 24 hodinách svědčí proti zapojení T lymfocytů, protože syntéza protilátek iniciovaná T lymfocyty probíhá s delší časovou prodlevou. Výsledky naší studie jsou proto v souladu s pracemi Kročové a Pohanky, které dává do souvislosti. Není v rozporu s výsledky studií prokazujícími významný vliv cytokinů produkovaných B lymfocyty v časně fázi infekce *F. tularensis*, kde problematika časně produkce specifických protilátek přímo zkoumána nebyla (Elkins a kol., 1993; Culkin a kol., 1997). Existence protilátek reagujících s proteinovými strukturami *F. tularensis* v časně fázi infekce potvrzuje možnost přímé interakce antigenů *F. tularensis* s B lymfocyty a jejich stimulace k produkci nízkoafinitních protilátek. Jednalo by se tak o dosud nepopsaný způsob aktivace B lymfocytů bakterií *F. tularensis*.

Limitací naší práce je vizuální způsob vyhodnocení získaných výsledků. V budoucnosti bude pravděpodobně možné zpřesnit výsledky této studie využitím pokročilejší výpočetní techniky, která je však v porovnání s vizuálním hodnocením zatím zatížena velkou mírou nepřesnosti. Prosté vyhodnocování pohledem nedovolilo s určitostí říci, kolik proteinů se podílí na popisovaných reakcích B lymfocytů, avšak dovolilo s velkou dávkou pravděpodobnosti potvrdit náš předpoklad, že zmíněné interakce existují a naše práce tak může sloužit k podpoření dalšího výzkumu v tomto směru.

K upřesnění výsledků této studie bude vhodné definovat typ protilátek, které takto časně reagují, protože my jsme pro detekci použili polyvalentní sekundární protilátka a nejsme tedy schopni určit o jakou třídu, případně podtřídu imunoglobulinů se jedná. Vycházíme-li ze studie s virem influenzy A, je možné předpokládat, že se nebude jednat o IgM (Coro a kol., 2006). Dále bude potřebné specifikovat subpopulaci B lymfocytů zodpovědných za syntézu těchto protilátek. Důležité je

posouzení účasti B1 subsetu, který není schopen somatických mutací zvyšujících afinitu protilátky vůči antigenu a jím tvořené protilátky se nepodílí na vzniku dlouhodobé imunity. To může být významné zejména při přípravě subjednotkové očkovací látky proti *F. tularensis*, pro jejíž sestavení jsou podobné antigeny nevyužitelné.

Další limitace vyplývá ze zvoleného intraperitoneálního způsobu infekce pokusných myší, u kterého předpokládáme největší schopnost vyvolání časně imunitní reakce, ale který zároveň neodpovídá žádné s přirozených cest vstupu *F. tularensis*.

6 Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda může infekce intracelulární bakterie *F. tularensis* v napadeném organismu vyvolat kromě reakcí buněčné imunity i velmi časnou produkci specifických protilátek. Pokusy jsme prováděli na myších, kterým bylo odebráno sérum 24 a 48 hodin od infekce. Séra byla použita jako primární protilátky při imunodetekci 2D mapy celobuněčného lyzátu *F. tularensis*. Zviditelnění vazby protilátek ze séra na proteiny *F. tularensis* proběhlo chemiluminiscenčně.

Tímto postupem se nám podařilo zjistit, že k produkci specifických protilátek došlo již 24 hodin po infekci. Dále jsme našli proteinové struktury, které syntézu protilátek spustily. Jejich předběžnou identifikaci jsme zjistili, že se pravděpodobně jedná o proteiny, které nejsou součástí pouze proteomu *F. tularensis*. Podobně by tedy mohly B lymfocyty reagovat i na jiné bakterie.

V každém případě je tvorba specifických protilátek ve velmi časně fázi infekce *F. tularensis* zajímavým tématem pro další výzkum. Zejména objasnění mechanismu této interakce by bylo velkým přínosem. Neméně podstatné bude i posouzení účasti jednotlivých subpopulací B lymfocytů a určení podtřídy imunoglobulinů, které se na reakci podílejí.

Literatura:

- BARON, SD., SINGH, R., METZGER, DW.: Inactivated *Francisella tularensis* LVS protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an IgA-dependent fashion. *Infect. Immun.*, 2007, roč. 75, s. 2152–2162.
- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J.: *Lékařská mikrobiologie*, vyd. Praha: Marvil, 1996, s. 558. Převzato z Masaříková, 2006.
- BOUCHAL, P., KUČERA, I.: Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chemické listy*, 2003, roč. 97, s. 29-36.
- CASADEVALL, A.: Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol*, 1998, roč. 6, s. 102–107.
- CORO, ES., CHANG, WLW., BAUMGARTH, N.: Type I IFN Receptor Signals Directly Stimulate Local B Cells Early following Influenza Virus Infection. *J. Immunol.*, 2006, roč. 176, s. 4343-4351.
- CULKIN, SJ., RHINEHART-JONES, T., ELKINS, KL.: A novel role for B cells in early protective immunity to an intracellular pathogen, *Francisella tularensis* strain LVS. *J. Immunol.*, 1997, roč. 158, s. 3277–3284.
- DENNIS, DT., INGLESBY, TV., HENDERSON, DA., BARTLETT, JG., ASCHER, MS., EITZEN, E., FINE, AD., FRIEDLANDER, AM., HAUER, J., LAYTON, M., LILLIBRIDGE, SR., MCDADE, JE., OSTERHOLM, MT., O'TOOLE, T., PARKER, G., PERL, TM., RUSSELL, PK., TONAT, K.: Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.*, 2001, roč. 285, s. 2763-73.
- ELKINS, KL., BOSIO, CM., RHINEHART-JONES, TR.: Importance of B cells, but not specific antibodies, in primary and secondary protective immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.*, 1999, roč. 67, s. 6002–6007.
- ELKINS, KL., COWLEY, SC., BOSIO, CM.: Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes and Infection*, 2003, roč. 5, s. 135-142.
- ELKINS, KL., RHINEHART-JONES, T., NACY, CA., WINEGAR, RK., FORTIER, AH.: T-Cell-Independent Resistance to Infection and Generation of Immunity to *Francisella tularensis*. *Infect Immun*, 1993, roč. 61, s. 823-829.

- ELLIS, J., OYSTON, PCF., GREEN, M., TITBALL, RW.: Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, roč. 15, s. 631-646.
- GLATZ, Z.: Způsoby a použití přenosu bílkovin z gelů po elektroforéze – blotting bílkovin. *Chemické listy*, 1995, roč. 89, s. 437-443.
- GÖRG, A., WEISS, W., DUNN, MJ.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, roč. 12, s. 3665-85.
- HAYES, EB.: *Tularemia*. In: J. L. Goodman, D. T. Dennis and D. E. Sonenshine: Tick-Borne Diseases of Humans, 1. vyd. Washington, DC: ASM Press, 2005, s. 207-217.
- HERBERT, B.: Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999, roč. 20, s. 660-3.
- HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.: *Základy imunologie*, 2. vyd. Praha: Triton, 2002, s. 121-123. ISBN 80-7254-215-X
- HUBÁLEK, Z.: *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*, 1. vyd. Brno: Přírodovědecká fakulta MU v Brně, 2000, s. 153. Převzato z Kaderová, 2008.
- CHAMBERLAIN, RF.: Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol.*, 1965, roč. 13, s. 232–235.
- JÍROVEC, O., KRAMÁŘ, J., KUBÁT, K., SCHWANK, K.: *Parazitologie pro lékaře*, 1. vyd. Praha: Státní Zdravotnické Nakladatelství, 1954, s. 475. Převzato z Masaříková, 2006.
- KADEROVÁ, J.: Tularémie, přírodně ohnisková nákaza v rámci Evropy. Brno, 2008. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce S. Šikulová.
- KIRIMANJESWARA, GS., GOLDEN, JM., BAKSHI, CS., W., MD.: Prophylactic and therapeutic use of antibodies for protection against respiratory infection with *Francisella tularensis*. *J. Immunol.*, 2007, roč. 179, s. 532–539.
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O.: *Klinická imunologie*, 1. vyd. Pardubice: Nukleus HK, 2004a, s. 478-482. ISBN 80-86225-50-X
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O.: *Klinická imunologie*, 1. vyd. Pardubice: Nukleus HK, 2004b, s. 254-257. ISBN 80-86225-50-X
- KROČOVÁ, Z., HÄRTLOVÁ, A., SOUČKOVÁ, D., ŽIVNÁ, L., KROČA, M., RUDOLF, E., MACELA, A., STULÍK, J.: Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microb Pathog.*, 2008, roč. 45, s. 79-85.

- LAVINE, CL., CLINTON, SR., ANGELOVA-FISCHER, I., MARION, TN., BINA, XR., BINA, JE., WHITT, MA., MILLER, MA.: Immunization with heat-killed *Francisella tularensis* LVS elicits protective antibody-mediated immunity. *Eur. J. Immunol.*, 2007, roč. 37, s. 3007–3020.
- MACELA, A., STULIK, J., TREBICHAVSKÝ, I., KROČA, M., JANOVSÁ, S.: *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006, s. 115-119. ISBN 80-247-0664-4
- MASAŘÍKOVÁ, J.: Mikrobiální diversita v klíšťatech, vektorech patogenů obratlovců. Brno, 2006. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce I. Rudolf.
- NANO, FE., ELKINS, KL.: *Francisella*. In: S. P. Boriello, P. R. Murray and G. Funke: *Bacteriology*, 10. vyd. London: Hodder Arnold Ltd., 2005, s. 1752-1759.
- OLSUFJEV, NG., MESHCHERYAKOVA, IS.: Subspecific Taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1983, roč. 33, s. 872-874.
- POHANKA, M.: Evaluation of Immunoglobulin Production during Tularaemia Infection in BALB/c Mouse Model. *Acta Vet. Brno*, 2007, roč. 76, s. 579-584.
- POLAND, J., CAHIL, MA., SINHA, P.: Isoelectric focusing in long immobilized pH gradient gels to improve protein separation in proteomic analysis *Electrophoresis*, 2003 roč. 24, s. 1271-1275.
- web roche-applied-science, <http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1520709a.pdf>,
- ROTZ, LD., KHAN, AS., LILLIBRIDGE, SR., OSTROFF, SM., HUGHES, JM.: Public Health Assessment of Potential Biological Terrorism Agents. *Emerg Infect Dis.*, 2002, roč. 8, s. 225–230.
- SALOMONSSON, E.: *The role of the Type IV pili system in the virulence of Francisella tularensis*, vyd. Umeå: Umeå Universitet, 2008, s. 73. Dizertační práce.
- SEDLÁČEK, I.: *Taxonomie prokaryot*, vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, s. 270. Převzato z Kaderová, 2008.
- STENMARK, S., LINDGREN, H., TÄRNVIK, A., SJÖSTEDT, A.: Specific antibodies contribute to the host protection against strains of *Francisella tularensis* subspecies holarctica. *Microb. Pathog.*, 2003, roč. 35, s. 73–80.

- STENMARK, S., SJÖSTEDT, A.: Transfer of specific antibodies results in increased expression of TNF-alpha and IL12 and recruitment of neutrophils to the site of a cutaneous *Francisella tularensis* infection. *J Med Microbiol.*, 2004, roč. 53, s. 501-4.
- TITBALL, RW., SJÖSTEDT, A.: *Francisella tularensis*: an Overview. *ASM News*, 2003, roč. 69, s. 558-563.
- TOWBIN, H., STAЕHELIN, T., GORDON, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, roč. 76, s. 4350-4354
- VOTAVA, M., ČERNOHORSKÁ, L., HEROLDOVÁ, M., HOLÁ, V.: *Lékařská mikrobiologie speciální*, vyd. Brno: Neptun, 2003, s. 495. Převzato z Kaderová, 2008.