

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**IZOLACE A PROTEOMOVÁ ANALÝZA FRAKCE  
OBOHACENÉ O PERIPLAZMATICKÉ PROTEINY BAKTERIE  
*FRANCISELLA TULARENSIS***

Diplomová práce

Vedoucí katedry: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Klára Konečná

Vedoucí diplomové práce – specialista: PharmDr. Ivona Pávková, PhD.

Jana Kolářová

Hradec Králové, 2010

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a všechny citace řádně vyznačila v textu. Veškerou použitou literaturu a podkladové materiály uvádím v příloženém seznamu literatury a zdrojů.

V Hradci Králové, dne 10. května 2010

Ráda bych poděkovala Doc. MUDr. Jiřímu Stulíkovi CSc. za možnost vypracování diplomové práce na Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové. Můj velký dík patří školitelce PharmDr. Ivoně Pávkové, PhD. za vlídný přístup, odborné rady i připomínky týkající se této práce, Mgr. Monice Mazgajové a zaměstnancům Ústavu molekulární patologie za pomoc při praktické části diplomové práce.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>13</b>
3.1 Bakterie <i>Francisella tularensis</i> .....	13
3.1.1 Obecná charakteristika agens .....	13
3.1.2 Taxonomie a nomenklatura .....	13
3.1.3 Kultivační podmínky .....	14
3.1.4 Tularemie .....	15
3.1.4.1 Epidemiologie .....	15
3.1.4.2 Klinické formy tularemie .....	15
3.1.4.3 Diagnóza .....	16
3.1.4.4 Léčba .....	17
3.1.4.5 Vakcíny .....	17
3.1.5 Patogeneze .....	19
3.1.6 Imunitní odpověď vůči <i>Franciselle</i> .....	20
3.1.7 Virulence, virulenční faktory .....	21
3.2 Proteomické přístupy .....	24
3.2.1 Klasická proteomika .....	24
3.2.1.1 Separace .....	24
3.2.1.2 Vizualizace .....	24
3.2.1.3 Analýza obrazu .....	25
3.2.1.4 Identifikace .....	25
3.2.2 „Shotgun“ proteomika .....	26
3.3 Bakteriální povrchy a proteomická analýza jejich proteinů .....	27
3.3.1 Příprava frakce obohacené o periplazmatické proteiny .....	28

<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
4.1 Materiál, přístroje a pomůcky .....	29
4.1.1 Použité chemikálie a další reagensie .....	29
4.1.2 Přístroje a pomůcky.....	31
4.1.3 Software.....	32
4.1.4 Mikroorganismy .....	32
4.1.5 Kultivační média.....	33
4.2 Kultivace bakterií, sklizení a promytí .....	34
4.3 Příprava frakce obohacené o periplazmatické proteiny <i>Francisella tularensis</i> ....	35
4.3.1 Metoda s použitím EDTA a lysozymu.....	35
4.3.2 Metoda s použitím MgCl <sub>2</sub> a lysozymu .....	35
4.3.3 Metoda s použitím chloroformu.....	35
4.3.4 Metoda s použitím polymyxin B sulfátu.....	36
4.3.5 Metoda studeného osmotického šoku ( <i>cold osmotic shock</i> ).....	36
4.4 Příprava celobuněčného lyzátu .....	37
4.5 Stanovení bílkoviny .....	37
4.5.1 <i>Micro BCA Protein Assay Kit</i> .....	37
4.5.2 <i>Bicinchonic Acid Protein Assay Kit</i> .....	38
4.5.3 <i>BCA s přesrážením</i> .....	39
4.6 Postupy vedoucí k zakoncentrování a přečištění vzorku, pufrů pro 2-DE.....	39
4.6.1 <i>ReadyPrep 2-D Clean Up-Kit</i> .....	39
4.6.2 <i>Precipitace pomocí trichloroctové kyseliny</i> .....	40
4.6.3 <i>Složení pufrů pro 2-DE</i> .....	40
4.7 Dvourozměrná elektroforéza.....	41
4.7.1 <i>Izoelektrická fokusace</i> .....	41
4.7.1.1 <i>Příprava vzorku před separací</i> .....	41

4.7.1.2 Rehydratace IPG-proužků.....	41
4.7.1.3 Izoelektrická fokusace.....	41
4.7.2 Příprava polyakrylamidových gelů .....	42
4.7.3 Ekvilibrace IPG-proužků.....	43
4.7.4 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.....	43
4.7.5 Detekce proteinů stříbřením .....	44
4.8 Digitalizace gelů.....	46
4.9 Vyhodnocování gelů .....	46
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>47</b>
5.1 Metoda s použitím EDTA a lysozymu.....	47
5.2 Metoda s použitím MgCl <sub>2</sub> a lysozymu.....	49
5.3 Metoda s použitím chloroformu.....	51
5.4 Metoda s použitím polymyxin B sulfátu .....	57
5.5 Metoda studeného osmotického šoku .....	60
5.6 Vyhodnocení testovaných metod pomocí periplazmatických markerů .....	70
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>75</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>82</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ.....</b>	<b>83</b>

## **ABSTRAKT**

Autor: Bc. Jana Kolářová

Vedoucí práce: Mgr. Klára Konečná

Vedoucí práce - specialista: PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D

Název: Izolace a proteomová analýza frakce obohacené o periplazmatické proteiny bakterie *Francisella tularensis*

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Odborný pracovník v laboratorních metodách

Cílem předkládané diplomové práce bylo otestování několika v literatuře uváděných postupů pro získání frakce obohacené o periplazmatické proteiny z bakterie *Francisella tularensis*. Vybraná metoda pak bude v následujících studiích využita ke hledání potenciálních substrátů hypotetického lipoproteinu s homologií k DsbA proteinu, z nichž některé pravděpodobně hrají klíčovou roli ve virulenci *F. tularensis*. DsbA proteiny se nacházejí v periplazmě gramnegativních bakterií, kde zaváděním disulfidických můstků zodpovídají za správnou konformaci a tím i funkčnost celé řady extracelulárních proteinů včetně známých faktorů virulence.

Mezi testované postupy patřily metoda studeného osmotického šoku, postupy s použitím chloroformu, polymyxin B sulfátu, EDTA s lysozymem a chloridu hořečnatého s lysozymem. Proteiny vzorků připravených jednotlivými postupy byly separovány pomocí dvourozměrné elektroforézy a získané 2-D proteinové mapy byly hodnoceny pomocí programu ImageMaster 2D Platinum. Vhodnost metody byla posuzována jednak z hlediska obohacení o proteiny s predikovanou periplazmatickou lokalizací a dále byly hodnoceny i rozdíly v tvorbě proteinů mezi divokým kmenem a kmenem s delecí genu pro příslušný protein s homologií k DsbA.

Z předběžných výsledků se jako nejvhodnější zdá být metoda studeného osmotického šoku a postup s chloroformem. Vhodnost a především reprodukovatelnost těchto postupů je však nezbytné ještě otestovat v dalších studiích.

## ABSTRACT

Candidate: Bc. Jana Kolářová

Supervisor: Mgr. Klára Konečná

Supervisor – specialist: PharmDr. Ivona Pávková, Ph.D

Title: Isolation and proteome analysis of fractions enriched in periplasmic proteins of bacterium *Francisella tularensis*

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Biological and Medical Sciences

Study field: Special worker in laboratory methods

The aim of the presented diploma thesis was to test several previously published methods for preparation of fractions enriched in periplasmic proteins of bacterium *Francisella tularensis*. The selected method will be further used in studies aimed at finding potential substrates of hypothetical protein with homology to DsbA as several of them are expected to play a crucial role in *Francisella tularensis* virulence. DsbA proteins found in periplasm of gramnegative bacteria are in general responsible for disulfide bond introduction and thus for right folding and function of number of extracytosolic proteins, known virulence factors included.

Tested methods included the method of cold osmotic shock, the method using chloroform, polymyxin B sulphate, EDTA in combination with lysozyme and magnesium chloride in combination with lysozyme. The obtained protein samples were separated using two-dimensional gel electrophoresis and the acquired 2-D protein maps were analyzed using the ImageMaster 2D Platinum software. The suitability of method was evaluated first by the enrichment in proteins with predicted periplasmic localization and by the differences in protein synthesis between the wild type strain and mutant strain with deletion of gene encoding the lipoprotein homological to DsbA protein.

The method of cold osmotic shock and method using chloroform seem to be the most suitable methods. However, the suitability and especially the reproducibility of these methods have to be further tested and confirmed.



## POUŽITÉ ZKRATKY

2-DE	dvourozměrná gelová elektroforéza (2-Dimensional Gel Electrophoresis)
APS	persíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina (Bicinchoninic Acid)
BSA	bovinní sérový albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiaminocetová kyselina (disodná sůl)
FPI	ostrov patogenicity bakterie <i>Francisella tularensis</i> ( <i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát
IEF	izoelektrická fokusace (Isoelectric Focusation)
IPG	ukotvený pH gradient (Immobilized pH Gradient)
LPS	lipopolysacharid
LVS	Živý vakcinační kmen (Live Vaccine Strain) bakterie <i>Francisella tularensis</i> , odvozený ze subtypu <i>holarctica</i>
Mw	molekulová hmotnost (Molecular weight)
NDS	disodná sůl kyseliny 2,7-naftalensulfonové
O.D.	optická denzita
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PDA	1,4-bis(akryloyl)piperazin
pI	hodnota pH v izoelektrickém bodě (v pI je molekula elektroneutrální)
SDS	dodecylsíran sodný

TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like receptor
TRIS-HCl	hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu
wt	původní, divoký kmen (wild type)

## 1. ÚVOD

*Francisella tularensis* (*F. tularensis*) je patogenní gramnegativní intracelulární bakterie, původce onemocnění tularemie, jejíž molekulární mechanismy patogeneze zůstávají i přes intenzivní výzkum zatím neobjasněny. Jejich pochopení včetně poznání všech faktorů zodpovědných za virulenci této bakterie je nezbytné pro vývoj účinných diagnostických, profylaktických i terapeutických prostředků. V nedávné době objevený nový faktor virulence této bakterie – hypotetický lipoprotein - vykazuje homologii k DsbA proteinům. DsbA proteiny obecně působí u gramnegativních bakterií v periplazmatickém prostoru, kde zaváděním disulfidických můstků zodpovídají za správnou konformaci a tím i funkčnost celé řady extracelulárně lokalizovaných proteinů. Vyřazení genu pro DsbA protein vedlo u celé řady jiných patogenních bakterií k oslabení jejich virulence. Má se však obecně za to, že právě substrátové proteiny pro DsbA jsou vlastními faktory virulence.

V případě DsbA proteinu u *F. tularensis* se proteomovou komparativní analýzou frakcí obohacených o membránové proteiny izolovaných z původního kmene a kmene s delecí příslušného *dsbA* genu podařilo odhalit jen několik málo potenciálních substrátových proteinů. Poněvadž však tento protein působí v periplazmatickém prostoru, je pravděpodobné, že obdobná analýza frakcí obohacených o periplazmatické proteiny by mohla vést k odhalení dalších potenciálních substrátů pro DsbA. Mnohé z nich by pak mohly hrát významnou roli ve virulenci a patogenezi *F. tularensis*.

Předkládaná diplomová práce se zabývá testováním a volbou vhodné metody pro izolaci frakcí obohacených o periplazmatické proteiny z bakterie *Francisella tularensis*, která by byla v následujících studiích využita ke hledání dalších potenciálních substrátů hypotetického lipoproteinu s homologii k DsbA. Za tímto účelem bylo otestováno několik v dostupné literatuře popsaných postupů, které byly posuzovány jednak z hlediska obohacení o vybrané proteiny s predikovanou periplazmatickou lokalizací a dále bylo i posuzováno, zda daným přístupem lze na dvourozměrných elektroforetických mapách pozorovat rozdíly v tvorbě proteinů mezi divokým kmenem a kmenem s delecí genu pro sledovaný protein.

## 2. CÍL PRÁCE

Hypotetický lipoprotein bakterie *Francisella tularensis*, který vykazuje homologii s DsbA proteiny gramnegativních bakterií, byl v nedávné době popsán jako faktor významně přispívající k virulenci této bakterie. DsbA proteiny mají obecně schopnost ovlivňovat správnou konformaci a tedy i funkci mnoha extracelulárních proteinů včetně celé řady faktorů virulence. V případě *F. tularensis* se proteomovou analýzou frakcí obohacených o membránové proteiny doposud podařilo nalézt jen několik málo potenciálních substrátů pro tento protein. K odhalení dalších substrátů by mohla významně přispět obdobná analýza frakcí obohacených o periplazmatické proteiny, protože periplazma je místem působení výše zmíněného DsbA proteinu. Cílem předkládané práce bylo otestování a vybrání vhodné metody pro izolaci frakcí obohacených o periplazmatické proteiny z bakterie *Francisella tularensis*, která bude v následujících studiích využita ke hledání dalších potenciálních substrátů hypotetického lipoproteinu s homologií k DsbA. Za tímto účelem bylo vyzkoušeno několik postupů popsaných v dostupných literárních zdrojích. Jedná se o metodu studeného osmotického šoku, metody založené na aplikaci chloroformu, polymyxin B sulfátu, chloridu hořečnatého a lysozymu a EDTA a lysozymu.

U každého postupu pak bylo prostřednictvím dvourozměrných elektroforetických proteinových map sledováno zastoupení proteinů s predikovanou periplazmatickou lokalizací. Dále bylo i posuzováno množství nalezených rozdílů v tvorbě proteinů mezi divokým kmenem a kmenem s delecí genu pro hypotetický lipoprotein s homologií k DsbA.

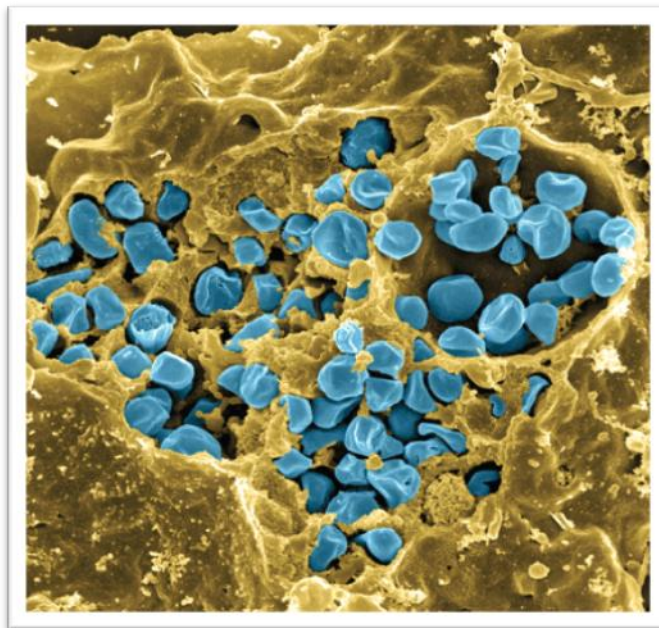
### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### **3.1 Bakterie *Francisella tularensis***

##### *3.1.1 Obecná charakteristika agens*

*Francisella tularensis* je gramnegativní, nepohyblivá, nesporeující, aerobní bakterie proměnlivého, nejčastěji tyčinkovitého tvaru (Macela et al., 2006). Její velikost se pohybuje v rozmezí 0,1-1 x 0,1-3 µm (Foley, Nieto, 2009). Je původcem onemocnění zvaného tularemie (Macela et al., 2006).

Poprvé byla tato bakterie izolována z malých hlodavců, kteří umírali na onemocnění podobné moru, v roce 1911 v Kalifornském údolí Tulare (Oyston, 2008). První ověřený případ lidské tularemie se vyskytl v Ohio v roce 1914 (Sjöstedt, 2007).



Obr. 1 Myší makrofágy infikované *F. tularensis*, kmen LVS  
(skenovací elektronová mikroskopie)

(převzato z <http://www.pnas.org/content/103/39.cover-expansion>)

##### *3.1.2 Taxonomie a nomenklatura*

Původně byla Edwardem Francisem pojmenována *Bacterium tularense* podle údolí Tulare, kde bylo onemocnění endemické mezi hlodavci (Sjöstedt, 2007). Později

byl vytvořen nový rod – *Francisella*. Ten získal název právě po Edwardu Francisovi, který zahájil výzkumnou činnost týkající se této bakterie.

V současné době se rozlišují dva druhy: *Francisella tularensis* a *Francisella philomiragia*. Dříve se mezi druhy řadila i *Francisella novicida*, nověji je však považována za subtyp *F. tularensis* (Oyston, 2008).

Dále jsou na základě biochemických vlastností, virulence a geografického původu rozlišovány čtyři subtypy *F. tularensis*:

- *tularensis* - vyskytuje se na severoamerickém kontinentu, je vysoce virulentní, označuje se také jako typ A,
- *holarctica* - subtyp běžný v Asii a Evropě mj. i v České republice, je méně virulentní, označuje se jako typ B,
- *mediasiatica* – vyskytuje se ve střední Asii,
- nověji i subtyp *novicida* – je vysoce virulentní pro myši, ale avirulentní pro imunokompetentní jedince.

### 3.1.3 Kultivační podmínky

*F. tularensis* je poměrně náročná bakterie, která vyžaduje ke svému růstu obohacené půdy, optimální pH (6,9) a teplotu (37 °C). *F. novicida* a *F. philomiragia* rostou dobře také při teplotě 28 °C (Foley, Nieto, 2009).

Půdy pro kultivaci *F. tularensis* musí obsahovat železo a sloučeniny s thiolovou funkční skupinou (například cystein nebo thioglykolát), které fungují jako redukční činidla (Macela et al., 2006).

Jedná se například o krevní agar s glukózou a cysteinem nebo čokoládový agar obohacený cysteinem. U inokula pozorujeme viditelný růst po 18 hodinách inkubace při 37 °C, pokud požadujeme jednotlivé kolonie, je nutná dvou až čtyřdenní inkubace. Na čokoládovém agaru jsou kolonie 2 až 4 mm velké, zelenobílé, kulaté a hladké. Na agaru s plnou krví je v okolí kolonií obvykle malá zóna  $\alpha$ -hemolýzy.

*F. tularensis* se v tekutých médiích příliš nedaří, ani jsou-li obohacené cysteinem (Oyston, 2008). Jedním z médií je kompletní Chamberlainovo médium.

### 3.1.4 Tularemie

#### 3.1.4.1 Epidemiologie

Tularemie je zoonotické onemocnění s přírodní ohniskovostí. Je rozšířena na celé severní polokouli, nejčastěji ve Spojených státech amerických, v Kanadě, Skandinávii, ve střední Evropě, centrální Asii a Japonsku. V USA a Kanadě je tularemie nejčastěji vyvolána subtypem *F. tularensis tularensis*, v Evropě subtypem *F. tularensis holarctica* (Macela et al., 2006).

Celosvětově lze říci, že počet případů tularemie poklesl, zejména z důvodu omezeného kontaktu s infikovanými zvířaty. V roce 1939 bylo ve Spojených státech zaznamenáno 2 291 případů, zatímco v letech 1993-2005 jich bylo pouze 125. Nárůst počtu případů v Bosně a Kosovu ukázal na významnou souvislost mezi onemocněním a sociálními podmínkami (Foley, Nieto, 2009).

V České republice se tularemie vyskytuje nejčastěji na jižní Moravě, výjimečně i v jiných oblastech (okolí Plzně, Chlumce nad Cidlinou). Tyto mikroepidemie jsou v posledních letech nejčastěji spojeny s loveckou sezónou.

Hlavním přírodním rezervoárem jsou malí hlodavci, členovci a hmyz. Pro vznik epidemie jsou důležité ve vodě žijící jednobuněčné organismy – vodní améby (Macela et al., 2006), incidence je však nízká.

Největší nebezpečí nákazy je u osob, které se často vyskytují v endemických oblastech. Jedná se o zemědělce, lovce, pracovníky v lese (Oyston, 2008).

Tularemie je přenosná na člověka přímým kontaktem s infikovanými zvířaty, pobodáním hmyzem či sáním klišťat. Další cesta přenosu je požití kontaminované vody či potravin a vdechnutí infekčních částic. Vstupní branou infekce je poraněná kůže, spojivkový vak, plíce a gastrointestinální trakt. Pro vyvolání infekce stačí vdechnout 1 až 10 mikrobů subtypu *F. tularensis tularensis*. Inkubační doba je udávána v rozmezí 3 až 5 dnů (Macela et al., 2006).

#### 3.1.4.2 Klinické formy tularemie

Typ a závažnost onemocnění závisí na kmeni vyvolávajícím onemocnění, dávce a způsobu vzniku infekce (Oyston, 2008). Rozlišujeme:

- ulceroglandulární formu – je nejčastější, udává se asi 80 % ze všech případů, vzniká po infekci přes poškozenou kůži,

- orofaryngeální formu – představuje asi 10 % případů, je způsobena požitím kontaminované stravy či vody,
- okuloglandulární formu - asi 5 % ze všech případů, je vyvolána vnesením infekce do spojivkového vaku,
- plicní formu – nejméně častá, je vyvolána vdechnutím kontaminovaných prachových částic či částic biologického aerosolu. V ohrožení jsou mj. zemědělci manipulující s kontaminovaným senem, sekající trávníky, také zdravotnický personál. Právě pro snadné šíření vzdušnou cestou je *Francisella* zneužitelná jako potencionální biologická zbraň.

Onemocnění začíná náhlým vzestupem teploty, zduřením mízních uzlin, doprovází ho úporné bolesti hlavy, svalů, kloubů, nespavost, neklid, malátnost. Později se bakterie mohou dostat krevní cestou až do plic, kde vyvolávají sekundární pneumonii. Rekonvalescence po prodělaném onemocnění je velmi dlouhá, mohou se dostavit i dlouholeté následky. Onemocnění vyvolaná *F. tularensis tularensis* mají více než 30 % úmrtnost, pokud se nenasadí léčba (Oyston, 2008). Při léčbě antibiotiky klesá úmrtnost pod 10 %. U onemocnění vyvolaných subtypem *F. tularensis holarctica* se udává úmrtnost bez léčby 1-10 % (po léčbě prakticky nulová) (Macela et al., 2006).

#### 3.1.4.3 Diagnóza

Pokud u pacienta pozorujeme nespecifické horečnaté příznaky s lymfadenopatií a v anamnéze uvádí kontakt se zajíci, pobodání hmyzem nebo sání klíštětem, či laboratorní kontakt, může se jednat o tularemii. Pokud však neznáme anamnézu, stanovit diagnózu může být obtížné. Může se jednat o mor, psitakózu, Q horečku atd. Gramovo barvení exsudátu a krevní kultury je často negativní. Pro zlepšení citlivosti se využívá přímá imunofluorescence.

Dále se provádí kultivace získaného materiálu na půdách obohacených cysteinem. PCR je vhodná u vzorků získaných z plicní tkáně, u krevních vzorků, u exsudátu i u formalinem fixované tkáně.

Serologie může potvrdit infekci. Pokud vyjde serologie pozitivní, nelze zjistit, zda k nákaze došlo v nedávné době či kdysi v minulosti. U pozitivních vzorků je také třeba brát v úvahu možnost zkřížené reakce mezi antigeny různých kmenů a druhů (*Brucella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Legionella*). Problémem serologie je také to, že



u akutního onemocnění nemusí být protilátky vytvořeny ani 10 dní po expozici patogenu. Ke konečné diagnóze se používají aglutinační metody nebo metoda ELISA se specifickými anti-*Francisella* protilátkami (Foley, Nieto, 2009).

#### 3.1.4.4 Léčba

Tularemie odpovídá velmi dobře na léčbu antibiotiky. Jako léky první volby se používají aminoglykosidy. Streptomycin, ačkoliv je účinný, se používá zřídka z důvodu ototoxicity a nefrotoxicity. Podobné je to i v případě chloramfenikolu z důvodu možného negativního vlivu na krvetvorbu. Jako vhodná alternativa se využívá gentamicin.

#### 3.1.4.5 Vakcíny

Do dnešní doby byla testována celá řada vakcín proti tularemii. Jedná se o vakcíny obsahující usmrcené kmeny, podjednotkové vakcíny i vakcíny založené na oslabených živých kmenech. Doposud však není dostupná žádná vakcína pro účely profylaxe, která by měla licenci pro humánní použití (Oyston, 2008).

- Vakcíny obsahující usmrcené kmeny

Během 20. a 30. let dvacátého století bylo velkou snahou vyvinout usmrcenou vakcínu pro prevenci onemocnění a antisera pro léčbu tularemie (Griffin et al., 2007). První připravené vakcíny jsou označovány jako Foshayovy vakcíny na počest Dr. Lee Foshaye, který je vyvinul. Jednalo se o fenolem usmrcené bakterie či acetonové extrakty. Mnoho očkovaných jedinců však vážně onemocnělo po kontaktu s vysoce virulentními kmeny (Conlan, Oyston, 2007).

- Podjednotkové vakcíny

Už asi 50 let se vědci snaží identifikovat antigeny zodpovědné za indukci protektivní imunity po imunizaci živou vakcínou nebo po prodělané infekci. Dodnes se podařilo objevit pouze jediný – a to lipopolysacharid (LPS). Imunizace LPS je méně účinná u *F. tularensis* subtypu *tularensis*. Pro ochranu proti tomuto subtypu je nezbytné, aby se do imunitních dějů zapojily také T-lymfocyty.

Jednou z možností je kombinace LPS a antigenu, který je schopný vyvolat T-buněčnou odpověď (Griffin et al., 2007).

- Živé oslabené vakcinační kmeny

V Rusku se dříve užívala lyofilizovaná živá vakcína připravená původně Elbertem a Gajskim ve 40. letech dvacátého století. Tato vakcína měla dobrý ochranný efekt, ale silné vedlejší nežádoucí účinky.

V padesátých letech Eigelsbach a Downsová izolovali (opakováním pasážováním na agarových plotnách a následně s využitím myši) z komerční sovětské vakcíny jeden z oslabených kmenů *F. tularensis* subtyp *holarctica*, který dal základ současné americké vakcíně s názvem Live Vaccine Strain (LVS). Ta se začala hojně využívat. Dříve se používala na ochranu rizikových skupin - například laboratorních pracovníků (Macela et al., 2006). Incidence respirační formy tularemie u takto vakcinovaných jedinců značně poklesla, incidence ulceroglandulární formy však zůstala stejná (Oyston, 2008).

LVS kmen našel široké uplatnění v experimentální medicíně, protože je virulentní pro myši a vyvolává u nich onemocnění podobné lidské tularemii. Tato vakcína však nezískala licenci pro humánní použití.

Důvodem byl možný návrat k virulenci, různá morfologie kolonií, proměnlivá imunogenicita, neznalost principu oslabení LVS, také nebezpečí nákazy imunosuprimovaných osob.

V současné době již máme určité znalosti o principu oslabení. Oblast genomu, kterou se odlišují plně virulentní Schu S4 kmen (subtyp *tularensis*) a LVS, obsahuje geny, které kódují pili typu IV. LVS kmeni tyto pili chybí (Griffin et al., 2007).

- Živé oslabené vakcinační kmeny budoucnosti

V současné době se vědci snaží o vyvinutí oslabeného vakcinačního kmene s přesně známým genetickým poškozením (Conlan, Oyston, 2007). Díky znalosti genomu plně virulentního kmene Schu S4 se usnadnila identifikace genů, které by měly být inaktivovány (mutovány) u vakcinačního kmene. Jedná se o geny, jejichž exprese vede k tvorbě proteinů účastnících se biosyntézy purinů, také geny obsažené v ostrově patogenity (Griffin et al., 2007).

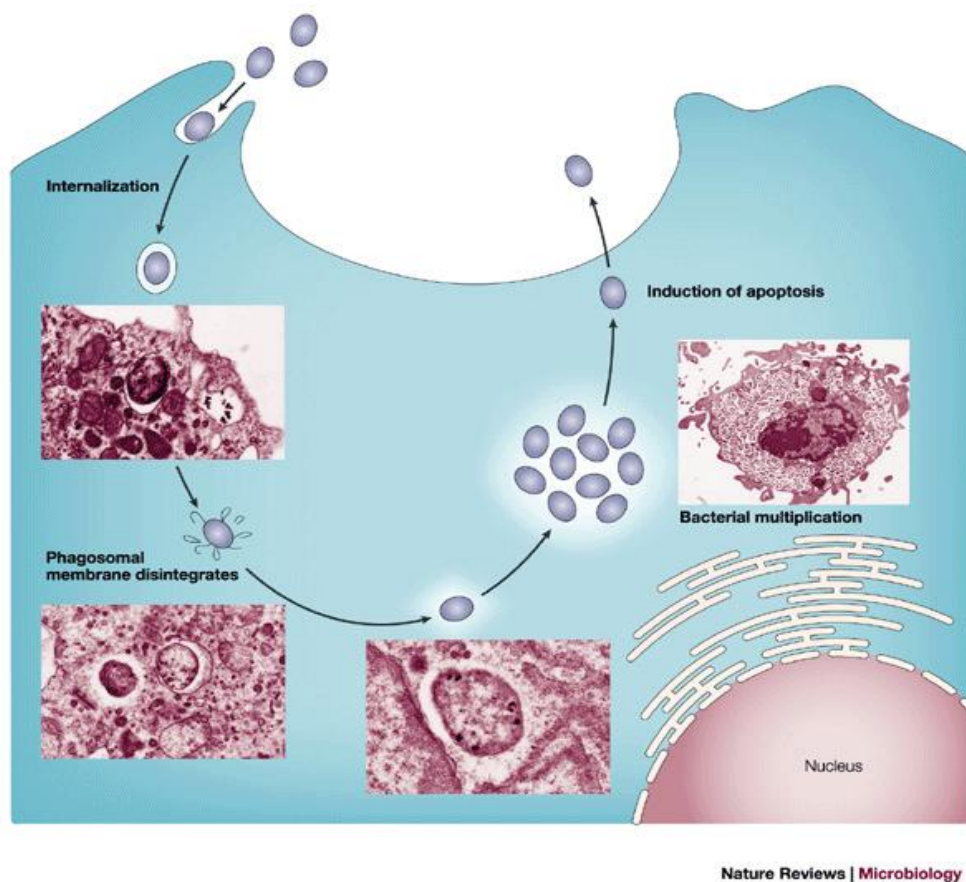
Další možností je vložit protektivní antigeny do živých bakteriálních či virových vektorů. Například lipoprotein *F. tularensis* - TUL4 je exprimován oslabeným kmenem *Salmonella typhimurium* (Conlan, Oyston, 2007).

### 3.1.5 Patogeneze

*F. tularensis* je fakultativní intracelulární bakterie, schopná proliferovat uvnitř makrofágů a neutrofilních granulocytů (profesionálních fagocytů), také v hepatocytech a řadě dalších buňkách. Její lipopolysacharid není endotoxický a dosud není známo, že by produkovala nějaký exotoxin.

Způsob vstupu do makrofágových buněk je pro druh *Francisella* unikátní. Bakterie je pohlcena hostitelskou buňkou podobným způsobem, jako k tomu dochází u améb. Tento proces je zprostředkován interakcí s uhlovodíkem na povrchu bakterie (jedná se pravděpodobně o jedinečný typ LPS). Interakcí s receptorem pro komplement na povrchu makrofágů dojde k zablokování oxidačního vzplanutí a deaktivaci makrofágů. Pokud jsou však infikovány aktivované makrofágy, *F. tularensis* je jimi rozpoznána a zlikvidována (Foley, Nieto, 2009).

Po vniknutí do makrofágu, bakterie vstupuje do fagozomu, zabraňuje splynutí fagozomu s lysozomem, opouští fagozom a replikuje v cytosolu buňky. Na rozdíl od jiných intracelulárních bakterií, které se uvolňují do cytosolu řádově minuty po infekci, *F. tularensis* zůstává ve fagozomu 3-4 hodiny. Jakmile se bakterie dostane do cytosolu, vyvolá u infikované buňky pyroptózu (zvláštní formu apoptózy, za jejíž navození zodpovídá IglC protein). Bakterie tak uniká z buňky. Po opuštění jedné buňky *Francisella* rychle infikuje jinou, nebo je fagocytována (Foley, Nieto, 2009).



Obr. 2 Kroky intracelulární replikace bakterie *Francisella tularensis*  
(převzato

z [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n12/fig\\_tab/nrmicro1045\\_F4.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n12/fig_tab/nrmicro1045_F4.html))

### 3.1.6 Imunitní odpověď vůči *Franciselle*

Vrozená imunitní odpověď vůči *Franciselle* je zprostředkována mj. pomocí Toll-like receptoru 2 (TLR2) (Thakran *et al.*, 2008). TLR jsou transmembránové receptorové proteiny, které rozpoznávají konzervativní mikrobiální struktury.

*Francisella* interaguje s TLR2 prostřednictvím svého lipopolysacharidu (ačkoliv nedochází k přímému navázání) (Foley, Nieto, 2009). Dále byly identifikovány dva lipoproteiny – TUL4 a FTT1103, které také interagují s TLR2. Vzájemná interakce vede k produkci prozánětlivých cytokinů během infekce (Oyston, 2008).

Prozánětlivá odpověď hostitelské buňky je ovlivněna také host matrix metaloproteázou 9, jejíž hladina se v průběhu nemoci zvyšuje. Tento protein ovlivňuje funkci leukocytů a je produkován aktivovanými makrofágy a neutrofily (Foley, Nieto, 2009).

### 3.1.7 Virulence, virulenční faktory

Poznat virulenční faktory bakterie *Francisella tularensis* se vědci snaží už dlouhou dobu. Jejich nalezení by mohlo přispět k přípravě nových léčiv či protektivních antigenů, které by byly součástí vakcíny.

Doposud bylo identifikováno jenom málo virulenčních faktorů, které regulují či usnadňují únik bakterie z fagosomu, a které umožňují intracelulární přežívání a replikaci (Qin et al., 2009). Některé z těchto faktorů jsou kódovány tzv. ostrovem patogenity (*Francisella* Pathogenicity Island – FPI). Zatímco *F. novicida* má pouze jednu kopii FPI, podtypy *tularensis* a *holarctica* mají po dvou kopiích. To může být důvod, proč je *F. novicida* méně virulentní pro člověka.

FPI je tvořen 19 geny, z nichž *iglABCD* operon a *pdpABCD* geny jsou zásadně důležité z hlediska virulence (Oyston, 2008). Přesto geny kódované v FPI představují pouze zlomek genů, které se podílí na virulenci bakterie (Titball, Petrosino, 2007).

Funkce proteinů kódovaných FPI jsou v současné době široce zkoumány. Například proteiny IglA a IglB jsou podobné nedávno popsanému sekrečnímu systému typu VI. Pravděpodobně se tedy účastní sekrece. IglC zprostředkovává apoptózu infikovaných buněk (Oyston, 2008).

Pro virulenci bakterie je důležitý také Macrophage Growth Locus, který obsahuje operon s geny *mglA* a *mglB*. Produkty těchto genů ovlivňují expresi genů z FPI. Například MglA pravděpodobně interaguje s RNA polymerázou (Foley, Nieto, 2009).

Lokus označovaný *FTT0918* kóduje další důležitý virulenční faktor *F. tularensis* subtypu *tularensis* a pravděpodobně i dalších subtypů. Jedná se o 58 kDa protein vnější membrány prozatím neznámé funkce (Conlan, Oyston, 2007).

U subtypu *holarctica* jsou pro virulenci zásadní pili typu IV. Zdá se, že se podílejí na šíření bakterie z původního ložiska infekce (Conlan, Oyston, 2007).

#### ▪ Lokus *FTT1103* (Lokus *FTL1096* – dle nomenklatury LVS)

Qin a Mann (2006) se ve své studii pokoušeli identifikovat virulenční faktory (respektive geny kódující virulenční faktory) *F. tularensis* subtypu *tularensis*. Pro určení těchto „virulenčních genů“ vkládali transpozony na různá místa genomu kmene Schu S4 a pozorovali, zda jejich vložení vyvolává oslabení kmene (neschopnost intracelulární replikace v jaterních buňkách linie HepG2). Takto byl objeven mimojiné

„virulenční“ lokus *FTT1103*, který kóduje tzv. hypotetický lipoprotein (*Qin, Mann, 2006*). Navazující studie kmene Schu S4 s mutací v loku pro hypotetický lipoprotein prokázala, že se *FTT1103* skutečně podílí na virulenci bakterie *F. tularensis* subtypu *tularensis*. Mutace v tomto loku vyvolala avirulentnost kmene, po intranazální aplikaci myším byl však tento kmen schopný vyvolat protektivní imunitní odpověď (*Qin et al., 2009*).

Předpokládá se, že lokus *FTT1103* kóduje tzv. hypotetický lipoprotein, který sdílí určitou podobnost s DsbA proteiny. Ty jsou součástí rozsáhlého systému Dsb (Disulfide bond formation) proteinů.

Dsb proteiny jsou thiol-disulfid oxidoreduktázy, členové thioredoxin nadrodiny s aktivním místem tvořeným dvěma cysteinovými zbytky, které jsou oddělené dvěma jinými aminokyselinami (motiv CXXC) (*Heras et al., 2009*).

Dsb systém je široce popsán u *E. coli*, kmeni K-12 (*Heras et al., 2009*). Právě u této bakterie bylo objeveno celkem sedm proteinů tohoto systému. Pět z těchto proteinů se účastní dvou nezávislých metabolických cest – oxidační (DsbA a DsbB) a izomerizační/redukční (DsbC, DsbD, DsbG).

DsbA je hlavní protein katalyzující tvorbu disulfidických můstků. DsbB zajišťuje reoxidaci cysteinů DsbA proteinu. DsbC, DsbG a DsbD se účastní izomerizace disulfidických sloučenin, které získaly působením Dsb systému nenativní konformaci. DsbC a DsbG podporují přestavování nesprávně vytvořených disulfidických můstků. DsbD transportuje elektrony (z cytoplazmatického thioredoxinu) nutné pro katalýzu izomerizační reakce, udržuje DsbC a DsbG v redukované formě. Další protein – DsbE/CcmG se podílí na zrání cytochromu. Úloha DsbF ještě není zcela objasněna (*Łasica, Jagusztyn-Krynicka, 2007*). Dsb systém tak, jak je znám u *E. coli*, se může více či méně odlišovat u různých druhů bakterií (mohou chybět jeden, dva ale i všechny Dsb proteiny) (*Heras et al., 2009*).

Jak již bylo uvedeno, DsbA proteiny katalyzují tvorbu disulfidických můstků v nově vzniklých bílkovinách. Disulfidické můstky ovlivňují správnou konformaci a stabilitu proteinů tzn. i virulenčních faktorů jako jsou různé toxiny, povrchové struktury (adheziny a pili) a sekreční systémy. Pokud tedy nefunguje Dsb systém, je oslabena virulence patogenů (*Heras et al., 2009*).

U kmenů LVS a FSC 200 bylo rovněž potvrzeno, že lokus *FTL1096* (dle nomenklatury pro LVS, jedná se o tentýž lokus jako *FTT1103*), který kóduje protein

homologní k DsbA proteinu, je nutný pro přežívání bakterie a její replikaci v makrofázích (buněčná linie J774.2) a pro vlastní virulenci patogenu u myši (*Straskova et al., 2009*). Také působí imunoprotektivně. Myši infikované dsbA mutantním kmenem jsou chráněny proti následné expozici virulentímu kmeni subtypu *holarctica*.

V této studii bylo také pomocí metod 2-DE a kvantitativní shotgun analýzy s následnou hmotnostní spektrometrií identifikováno několik proteinů, které by mohly být substráty DsbA disulfid oxidoreduktázy a jejichž inaktivace (při narušené funkci Dsb systému) by mohla způsobovat oslabení virulence u dsbA mutantního kmene.

Jedná se o 2 karboxypeptidázy serinového typu D-Ala-D-Ala, pět hypotetických proteinů, dále protein chitinázové rodiny 18. V jejich aminokyselinovém složení bylo nalezeno několik cysteinových zbytků, což dokládá úlohu DsbA proteinu na jejich správném složení.

Karboxypeptidázy serinového typu D-Ala-D-Ala jsou virulenčním faktorem u bakterie *Brucella abortus*, navíc tento enzym patří mezi penicilin vázající proteiny, podílí se na stavbě buněčné stěny a je cílem  $\beta$ -laktámových antibiotik.

Chitinázy jsou secernované řadou bakterií včetně *Francisella tularensis* subtyp *novicida*. Tyto enzymy jsou důležité pro invazi členovci.

Objevené hypotetické proteiny nevykazují žádnou homologii se známými bakteriálními proteiny. Není tedy možné spolehlivě predikovat jejich biologickou úlohu. Hypotetický protein FTL1306 obsahuje motiv, který zodpovídá za interakci bakteriální a eukaryotické hostitelské buňky, stejný motiv je i u bílkoviny, která zajišťuje vstup bakterie *Legionella pneumophila* do epiteliálních buněk a makrofágů. Nedávno byl tento protein potvrzen jako virulenční faktor u *F. tularensis* Schu S4. Konzervativní hypotetický protein kódovaný 2 shodnými FPI lokusy *FTL1161* a *FTL0115* je další potenciální virulenční faktor. Bioinformatická analýza dalšího hypotetického proteinu FTL1579 odhalila jeho sekreční potenciál. Dochází také ke zvýšení jeho exprese po pohlcení mikroba makrofágy.

Gen kódující potenciátor infekivity makrofágů (MIP – macrophage infectivity potentiator) vytváří s geny pro DsbA jeden operon. Na základě přítomnosti peptidyl-prolyl izomerázové domény FKBP typu na N-konci peptidu se předpokládá, že se tento protein podílí na skládání proteinů. MIP je známý virulenční faktor *Legionella pneumophila* (*Straskova et al., 2009*).

## **3.2 Proteomické přístupy**

Proteomické technologie dnes umožňují zkoumat tisíce proteinů v jednom experimentu díky kombinaci separačních a identifikačních metod. Poněkud odlišné jsou přístupy založené na proteinových čipech.

### *3.2.1 Klasická proteomika*

#### 3.2.1.1 Separace

K separaci se využívá dvourozměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE), případně jednoduchá SDS elektroforéza, která však vyžaduje před vlastní identifikací provedení prefrakcionace bílkovin.

2D-PAGE separuje proteinové směsi pomocí izoelektrických bodů (pI) a molekulových hmotností (Mw) jednotlivých proteinů. Díky tomu je dosaženo vysokého rozlišení. Jedná se vlastně o kombinaci izoelektrické fokusace v jednom směru a SDS elektroforézy ve směru kolmém na první (*Lenčo, Hernychová, 2008*).

#### 3.2.1.2 Vizualizace

K vizualizaci separovaných proteinů lze použít řadu technik. Jedná se například o metabolické značení proteinů s následnou autoradiografií, která je vysoce citlivá.

Konvenční způsoby využívají např. afinity barviva Coomasie Blue G-250 k proteinům. Toto barvení je však málo citlivé, na druhou stranu je dobře kompatibilní s MS, protože gely lze snadno odbarvit.

Dalším konvenčním způsobem vizualizace je stříbření. Jde vlastně o redukci stříbrných iontů na povrchu proteinů a kovalentní vazbu stříbra na bílkovinu. Toto barvení je vhodné pro komparativní proteomiku a je vysoce citlivé.

Stále více se využívají fluorescenční barviva – Sypro Ruby i přes jejich vysokou cenu. Citlivost je srovnatelná se stříbřením. Jsou upřednostňována zejména z důvodu kompatibility s hmotnostní detekcí, která se využívá pro identifikaci proteinů. Využívají se často pro komparativní proteomické studie (*Lenčo, Hernychová, 2008*).

Pro srovnávání exprese různých proteinů za různých podmínek lze s výhodou použít rozdílné fluorescenční značení DIGE (Differential Gel Electrophoresis). Metoda je založena na kovalentní modifikaci proteinů barvivy Cy2, Cy3 a Cy5. Jedná se o kyaninová barviva (CyDyes; Amersham Biosciences), která mají rozdílné vlnové délky excitačního a emisního záření. Nejprve se jednotlivé vzorky označí *in vitro*, každý



jedním typem barviva. Poté se vzorky smísí a provede se dvourozměrná elektroforéza (Görg *et al.*, 2004). Jelikož analýza probíhá na jednom gelu, jsou eliminovány „inter-gelové“ rozdíly. (Honoré *et al.*, 2004).

### 3.2.1.3 Analýza obrazu

Obarvené gely jsou nejprve převedeny do digitální podoby. Ke snímání za viditelného světla se používají CCD (Charged Coupled Camera) kamery, denzitometry nebo skenery. S využitím speciálních přístrojů je možné detekovat fluorescenci i radioaktivní záření. Pomocí softwaru jsou skvrny na gelu detekovány, je možné odečítat pozadí, navzájem přiřazovat skvrny z různých gelů (tzv. matching), vzájemně standardizovat a kvantitativně vyhodnocovat gely (Bouchal, Kučera, 2003). Na trhu je dostupných několik softwarů, k nejpoužívanějším patří Z3, PDQuest, Melanie, Progenesis (Lenčo, Hernychová, 2008).

### 3.2.1.4 Identifikace

(Lenčo, Hernychová, 2008)

V současné době nezastupitelnou úlohu mezi identifikačními metodami v proteomice zaujímá hmotnostní spektrometrie.

V proteomice jsou nejčastěji používány měkké ionizační techniky – desorpce/ionizace laserem za účasti matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI). Druhá z uvedených technik se výhradně využívá pro on-line spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostního spektrometru.

Jako hmotnostní analyzátor se používá analyzátor doby letu (TOF) ve spojení s MALDI. Je vysoce citlivý a výkonný. Pro strukturní analýzu peptidů se využívá trojitý kvadrupól nebo iontová past, která se s výhodou využívá pro MS<sup>n</sup> analýzu.

Jako jednoduchá identifikační metoda slouží „Peptide Mass Fingerprinting“ (PMF). Ta je založena na štěpení proteinu trypsinem či jinou sekvenčně specifickou proteázou na peptidy. Naměřené hodnoty jsou porovnávány s teoreticky vypočtenými hodnotami, které byly získány překladem sekvence DNA do sekvence aminokyselin.

K určení aminokyselinové sekvence nebo lokalizace posttranslačních modifikací se využívají tandemové hmotnostní spektrometry, které obsahují dva hmotnostní analyzátoři sériově spojené kolizní celou.

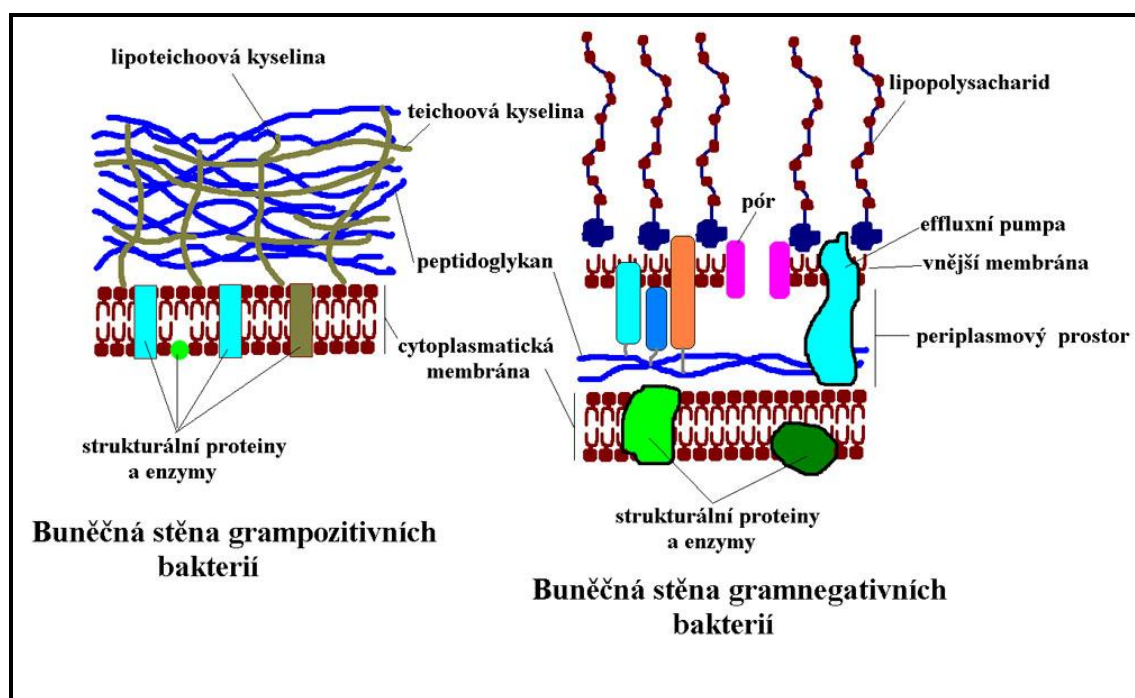
### 3.2.2 „Shotgun“ proteomika

Také tento přístup kombinuje separační a identifikační metody. K separaci dochází však až na úrovni peptidů, které vzniknou po rozštěpení směsi proteinů sekvenčně specifickou proteázou. Vzniklé peptidy jsou separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie – HPLC (nejvíce se využívá stacionární fáze C18 v reverzním módu - RP-HPLC), která je on-line připojena k tandemovému hmotnostnímu spektrometru. Z důvodu omezené kapacity RP-HPLC pro separaci velkého množství peptidů byla vyvinuta MudPIT technologie (Multidimensional Protein Identification Technology). Tato metoda využívá dvojrozměrnou kapalinovou chromatografii. Rutinně se provádí s využitím kationtové výměnné chromatografie, po níž následuje chromatografie na reverzních fázích. Podobně lze předřadit i izoelektrickou fokusaci peptidů či afinitní chromatografii, které vedou ještě k lepšímu rozlišení (Cordwell, 2006).

Komparativní „shotgun“ analýzy vyžadují označení peptidů. Ke značení se může využít derivatizace látkami obsahujícími stabilní izotopy jako např.  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ . Dále se využívá metabolické značení proteinů v živých buňkách pomocí aminokyselin s  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ . Peptidy lze také značit pomocí výměny  $^{16}\text{O}$  na C-konci peptidu za  $^{18}\text{O}$  během štěpení proteinu trypsinem v  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ . Další techniky vyžadují kovalentní připojení izotopických sloučenin. GIST (Global Internal Standard Technology) značí peptidy  $\text{H}^2/\text{D}^3$ -N-acetoxysukcinimidem. ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) je kvantifikační metoda spojená s afinitní chromatografií modifikovaných peptidů pomocí interakce avidin-biotin. Další metodou je iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification). Ke značení se využívá čtyř isobarických značek (Lenčo, Herychová, 2008).

### **3.3 Bakteriální povrchy a proteomická analýza jejich proteinů**

Buněčná stěna G- bakterií se liší od stěny G+ jak svým složením, tak uspořádáním jednotlivých molekul. Buněčná stěna G- bakterií je tvořena periplazmatickým prostorem, který je obklopen z jedné strany vnitřní (cytoplasmatickou) a z druhé strany vnější membránou. Vnitřní membrána je vlastně fosfolipidová dvojvrstva, zatímco vnější membrána je asymetrická, obsahuje fosfolipidy a lipopolysacharidy.



Obr. 3 Buněčná stěna G+ a G- bakterií

(převzato z [http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna\\_stena.jpg](http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna_stena.jpg))

Proteiny buněčné stěny (vnitřní a vnější membrány, periplazmatické) jsou vysoce antigenní a jsou cílem imunitních mechanismů infikovaných organismů. Proto znalost jejich proteinového složení může významně přispět k vývoji nových léčiv, k získání antigenů pro imunoprophylaxi a látek pro imunoterapii (*Imperi et al., 2009*).

Proteiny obsažené v bakteriálních membránách je obtížné analyzovat tradičními metodami proteomiky. Důvodů je hned několik. Je to nízký výskyt většiny membránových proteinů v komplexní biologické matici. Dále špatná propustnost membránových složek (fosfolipidy, lipopolysacharidy, peptidoglykany). Jedná se

i o hydrofobicitu řady integrálních proteinů, které obsahují více než 15 transmembránových oblastí (Cordwell, 2006).

### 3.3.1 Příprava frakce obohacené o periplazmatické proteiny

Periplazma vyplňuje periplazmatický prostor G- bakterií. Má konzistenci podobnou gelu. Obsahuje úzkou vrstvu peptidoglykanu, dále řadu proteinů (Imperi et al., 2009). Periplazma zajišťuje u G- bakterií řadu vitálních funkcí. Působí jako osmotický pufr mezi vnějším prostředím a cytoplazmou, obsahuje řadu významných enzymů a enzymových systémů, je důležitá pro transport živin. Enzymy, které se nacházejí v periplazmě *E. coli* zahrnují proteázy, fosfatázy, lipázy, periplazmatické vazebné proteiny, které transportují cukry a aminokyseliny přes cytoplazmatickou membránu, enzymatický systém zajišťující tvorbu peptidoglykanu, proteiny pro transport extracelulárních proteinů (Judd, Porcella, 1993).

Pro přípravu frakce obohacené o periplazmatické proteiny existuje řada postupů. Mezi standardní metody patří metoda studeného osmotického šoku. Při osmotickém šoku dochází k permeabilizaci vnější membrány. Promyté buňky jsou resuspendovány v hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris-HCl) a smíseny se sacharózou a disodnou solí ethylendiaminoctové kyseliny (EDTA). EDTA slouží k rozrušení vnější membrány, sacharóza stabilizuje vnitřní membránu. Po určité době se provede centrifugace a buňky se rychle suspendují v ledově vychlazeném chloridu hořečnatém a uloží na led. Díky náhlým změnám osmolarity dojde k uvolnění periplazmy s obsahem bílkovin do supernatantu (Jensch, Fricke, 1997).

Dále se využívá ošetření bakteriálních buněk chloroformem, tvorba sferoplastů pomocí lysozymu (ten rozkládá peptidoglykan, který je součástí buněčných stěn bakterií) s různými použitými přísadkami (EDTA či chlorid hořečnatý). EDTA, jak již bylo výše uvedeno, slouží k narušení vnější membrány, při tomto postupu se dále k promytným buňkám kromě lysozymu a EDTA přidává Tris-HCl pufr a sacharóza. Chlorid hořečnatý zvyšuje propustnost vnější membrány, stejně jako další látka používaná pro získání frakce obohacené o periplazmatické proteiny – polymyxin B sulfát (Jensch, Fricke, 1997).

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Materiál, přístroje a pomůcky

#### *4.1.1 Použité chemikálie a další reagensie*

- 1,4-bis(akryloyl)piperazin - PDA (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát - Chaps (Serva, Heidelberg, Německo)
- Aceton (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Akrylamid (Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA)
- Ampfolyte pH 3-10, pH 8-10, pH 9-11 (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Azid sodný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Benzonáza (250 U) (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Bromfenolová modř (LKB, Bromma, Švédsko)
- De Streak Reagent (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švédsko)
- Deionizovaná voda
- Deoxycholát sodný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Serva, Heidelberg, Německo)
- Disodná sůl ethylendiaminoctové kyseliny - EDTA-Na (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Disodná sůl kyseliny 2,7-naftalensulfonové - NDS (Acros Organics, Geel, Belgie)
- Dithiothreitol - DTT (Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA)
- DL-methionin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- DL-prolin (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- DL-serin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- DL-threonin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- DL-valin (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Dusičnan stříbrný (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Formaldehyd (Fluka, Buchs, Švýcarsko)

- Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok – PBS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA))
- Glukoza p.a. (Penta, Praha)
- Glutaraldehyd (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Glycerol (USB, Cleveland, Ohio, USA)
- Glycin na elektroforézu (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (PLIVA-Lachema, Brno)
- Heptahydrát síranu železnatého (ICN Biomedicals Inc., Kalifornie, USA)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Riedel-de Haën, Hannover, Německo)
- Hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu - Tris-base, Tris-HCl (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Hydroxid amonný (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Hydroxid sodný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Chlorid hořečnatý hexahydrát (Merck, Darmstadt, Německo)
- Chlorid sodný (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Chloroform (Lachema, Brno)
- Inhibitory proteáz Complete mini, EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švýcarsko)
- Iodoacetamid (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- IPG pH 6-11 (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švédsko)
- Kalcium panthotenat (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Kit Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Kit Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA)
- Kit ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
- Kyselina citronová (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Kyselina octová (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- L-arginin-HCl (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- L-asparagová kyselina (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- L-cystein-HCl (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- L-histidin-HCl (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- L-isoleucin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- L-leucin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- L-lysin-HCl (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

- L-tyrosin (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Lysozym (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Methanol (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- Močovina (Fluka, Buchs, Švýcarsko)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin – TEMED (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
- Octan sodný (Merck, Darmstadt, Německo)
- Parafinový olej (Merck, Darmstadt, Německo)
- Persíran amonný – APS (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
- Polymyxin B sulfát (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Sacharosa (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Sekundární butanol (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Sodium dodecylsulfát (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Spermin tetrahydrochlorid (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Thiamin-HCl (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Thiomočovina (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Thiosulfát sodný (Sigma, St. Louis, Montana, USA)
- Trichloroctová kyselina (Sigma, St. Louis, Montana, USA)

#### 4.1.2 *Přístroje a pomůcky*

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Greifensee, Švýcarsko)
- Automatické pipety (Eppendorf Research, Hamburk, Německo)
- Centrifuga Jouan BR4i (Jouan, Francie)
- centrifugační filtrační zkumavky Amicon Ultra-4 (pro objemy do 4 ml) (Millipore, Bedford, USA)
- Denzitometr WPA biowave CO 8000 (Biochrom, Cambridge, UK)
- French pressure cell press (Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, USA)
- Hybridiser HB-1D (termostat) (Barloworld Scientific, Techne, Staffordshire, UK)
- inkubátorová třepačka (SHEL LAB, Cornelius, Oregon, USA)
- IPG-proužky pro pH 4-7, pH 6-11 (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švédsko)

- Jednorázové 0,22 µm filtry GP Millipore Express PLUS Membrane (Millipore, Bedford, USA)
- Laminární box S@feFlow 1.2 (BioAir Instruments, Siziano, Itálie)
- Nanofotometr pro stanovení koncentrace bílkoviny (Implen GmbH, mnichov, Německo)
- pH-metr (inoLab, WTW, Weilheim, Německo)
- Proužky na elektrody pro izoelektrickou fokusaci Protean IEF System (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA), IEF electrode strips (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švédsko)
- Přístroj pro elektroforézu – Protean Multi-Cell (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA)
- Přístroje pro izoelektrickou fokusaci – Protean IEF Cell (Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA), Multiphor II (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko)
- Rotátor Grant Boekel HIM 20 (Cambridgeshire, UK)
- Stanice KODAK Image Station 2000R (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)
- Ultracentrifuga Optima MAX (Beckman Coulter, Fullerton, Kalifornie, USA)
- Ultracentrifuga Sorvall Evolution RC (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)

#### 4.1.3 Software

- ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Švédsko)
- KODAK 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, Rochester, New York, USA)

#### 4.1.4 Mikroorganismy

V této diplomové práci byly použity bakterie *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* kmen LVS 155 a dále kmen s delecí v genu pro hypotetický lipoprotein-LVS 155Δ1103.



#### 4.1.5 Kultivační média

Bakterie byly kultivovány v chemicky definovaném Chamberlainově médiu. Dle níže uvedeného rozpisu (tabulka č. 1) se naváží chemikálie pro roztoky 1, 2 a 3. Jednotlivé chemikálie se rozpustí asi ve 200 ml deionizované vody na každý roztok. Roztok 4 se připraví rozpuštěním za přidávání 3M NaOH, titruje se do rozpuštění zákalu.

Roztoky se smísí s předepsanými doplňky, pomocí koncentrované HCl se upraví pH na 6,3 a objem se doplní do 2 litrů. Médium se přefiltruje přes jednorázový 0,22 µm filtr do sterilních lahví a skladuje se při 4 °C. Provádí se kontrola růstu bakterie a kontrola sterility (médium se ponechá přes noc při teplotě 37 °C, druhý den se proměří optická denzita (O.D.) při 600 nm).

Tabulka č. 1 Chemikálie pro přípravu Chamberlainova média

<b>Roztok 1</b>	<b>% koncentrace</b>	<b>gramů na 2 litry</b>
L-arginin-HCl	0,040	0,800
L-cystein-HCl	0,020	0,400
L-histidin-HCl	0,020	0,400
L-isoleucin	0,040	0,800
L-leucin	0,040	0,800
L-lysin-HCl	0,040	0,800
DL-prolin	0,200	4,000
DL-serin	0,040	0,800
DL-threonin	0,200	4,000
DL-valin	0,040	0,800
DL-methionin	0,040	0,800

<b>Roztok 2</b>	<b>% koncentrace</b>	<b>gramů na 2 litry</b>
Glukoza p.a.	0,400	8,000

<b>Roztok 3</b>	<b>% koncentrace</b>	<b>gramů na 2 litry</b>
NaCl p. a.	1,000	20,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,100	2,000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100	2,000

<b>Roztok 4</b>	% koncentrace	gramů na 2 litry
L-asparagová kyselina	0,040	0,800
L-tyrosine	0,040	0,800

<b>Doplňky roztoku 1</b>	% koncentrace	navážit gramů	ml vody	do 2 litrů média přidat
Thiamin-HCl	0,0004	0,02	10	4 ml roztoku
Spermin tetrahydrochlorid	0,004	0,08	10	10 ml roztoku
Kalcium panthotenat	0,0002	0,01	10	4 ml roztoku

<b>Doplňky roztoku 2</b>	% koncentrace	navážit gramů	ml vody	do 2 litrů média přidat
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0135	0,675	10	4 ml roztoku
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0002	0,01	10	4 ml roztoku

## **4.2 Kultivace bakterií, sklizení a promytí**

Z bakterie *Francisella tularensis* LVS 155 a LVS 155Δ1103 rostlé na pevné půdě McLeod bylo připraveno 50 ml suspenze v Chamberlainově médiu o O.D. (600 nm) 0,1. Bakterie byly v této suspenzi kultivovány přes noc při 36,8 °C za stálého míchání (225 rpm).

Druhý den ráno byla kultura naředěna předeřhřátým Chamberlainovým médiem do objemu 200-1000 ml (dle použité metody) tak, aby se výsledné O.D. pohybovalo v rozmezí 0,10 až 0,15. Kultura byla kultivována při 36,8 °C za stálého míchání při 200 rpm. Kultivace byla ukončena při dosažení O.D. 0,60 (asi 4-5 hodin), kdy se bakterie *F. tularensis* nachází v exponenciální fázi růstu.

Narostlá bakteriální suspenze byla centrifugována 15 minut při 9 000x g, 4 °C. Sediment byl dvakrát promyt následujícím způsobem: sedimentované bakterie byly resuspendovány ve zvoleném promývacím pufru a suspenze byla centrifugována 15 minut, 7 000x g, 4 °C.

### **4.3 Příprava frakce obohacené o periplazmatické proteiny *Francisella tularensis***

#### *4.3.1 Metoda s použitím EDTA a lysozymu*

Bakterie narostlé z 350 ml kultivačního média a promyté v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) byly jemně resuspendovány v 3,5 ml ledově vychlazeného TS pufru o složení: 0,2 M hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris-HCl), pH 8,0; 0,5 M sacharosa; 1 mM disodná sůl ethylendiaminocetové kyseliny (EDTA-Na); 100 µg/ml lysozymu s přidavkem benzonázy (150 U/ml). Suspenze byla inkubována 30 minut na ledu a centrifugována po dobu 15 minut, 12 500x g při 4 °C. Supernatant byl odebrán a znovu centrifugován za stejných podmínek. K supernatantu s obsahem periplazmatických proteinů byly přidány inhibitory proteáz (Complete mini, EDTA-free, Roche) o koncentraci 40 µl/ml. Vzorek byl následně zakoncentrován pomocí centrifugačních filtračních zkumavek Amicon-4 ml 3K (6 500x g, 9 °C) až do zakoncentrování na objem asi 100 µl.

Pomocí kitu Micro-BCA Protein Assay Kit byla stanovena bílkovina. Vzorek byl přečištěn a zakoncentrován pomocí 2-D Clean-up Kitu do rehydratačního pufru pro dvourozměrnou elektroforézu (2-DE).

#### *4.3.2 Metoda s použitím MgCl<sub>2</sub> a lysozymu*

Bakterie narostlé z 1000 ml kultivačního média a promyté v PBS byly jemně resuspendovány v 30 ml extrakčního pufru o složení: 10 mM Tris-HCl (pH 8,4); 200 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mg/ml lysozymu a inhibitory proteáz. Suspenze byla jemně míchána 30 minut při pokojové teplotě a následně zcentrifugována 11 000x g při 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant s obsahem periplazmatických bílkovin byl zakoncentrován na objem asi 700 µl pomocí centrifugačních filtračních zkumavek Amicon- 4 ml 3K (9 °C, 6 500x g). Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí kitu Micro BCA Protein Assay Kit.

#### *4.3.3 Metoda s použitím chloroformu*

V PBS promyté bakterie, sklizené z 200 ml kultivačního média, byly resuspendovány ve 2 ml chloroformu a pomalu promíchány. Po 12 minutové inkubaci při pokojové teplotě bylo k suspenzi přidáno 20 ml 0,01M Tris-HCl (pH 8,0) s inhibitory proteáz s následnou centrifugací (6 000x g po dobu 20 minut při 4 °C).

Supernatant s obsahem periplazmatických proteinů byl dvakrát centrifugován při 6 000x g, 15 min při 4 °C a poté přefiltrován přes 0,2 µm PVDF filtry (Millipore). Tyto filtry by měly zadržovat nežádoucí zbylé bakterie a sféroplasty a měly by propouštět proteiny.

Vzorek byl poté zakoncentrován na finální objem asi 1 ml pomocí centrifugačních filtračních zkumavek Amicon Ultra (9 °C, 6 500x g). K zakoncentrovaným proteinům byly přidány inhibitory proteáz a byla stanovena koncentrace bílkoviny (BCA).

#### *4.3.4 Metoda s použitím polymyxin B sulfátu*

Bakterie narostlé z 1000 ml kultivačního média byly po promytí v 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) jemně resuspendovány v extrakčním pufru o složení: 1 mg/ml polymyxin B sulfátu, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA (pH 8,0) v poměru 2 ml na 1 g bakterií (mokrý váha). Suspenze byla jemně míchána 1 hodinu při 4°C na rotátoru a centrifugována 10 000x g při 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl znovu centrifugován 20 min, 4 °C, 40 000x g. Supernatant s obsahem periplazmatických bílkovin byl zakoncentrován pomocí centrifugačních filtračních zkumavek Amicon 4 ml na objem asi 500-300 µl (6 500x g, 9 °C) a byla stanovena bílkovina s využitím kitu Micro BCA Protein Assay Kit.

Tento postup byl proveden ještě v modifikaci s použitím 0,22µm filtrů (Millipore) před zakoncentrováním supernatantu.

#### *4.3.5 Metoda studeného osmotického šoku (cold osmotic shock)*

Bakterie narostlé z 1000 ml kultivačního média byly dvakrát promyty ve 25 ml vychlazeného 10 mM Tris-HCl (pH 7.1), 30 mM NaCl a resuspendovány v 33 mM Tris-HCl, pH 7,1 (24 °C) v poměru 1g bakterií (mokrý váha) do 40 ml Tris-HCl. Za rychlého míchání bylo přidáno 40 ml (na 1 gram mokré váhy) 40% roztoku sacharózy (w/v) v 33 mM Tris-HCl, pH 7,1 a EDTA-Na do finální koncentrace 0,1 mM. Suspenze byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě za stálého míchání (180 rpm) a centrifugována při 11 000x g, 4 C po dobu 10 minut. Peleta byla resuspendována v 80 ml ledově vychlazeného 0,5M MgCl<sub>2</sub> na 1 gram mokré váhy a suspenze byla 10 minut pomalu míchána v ledové lázni. Přidaly se inhibitory proteáz a benzonáza (80U). Suspenze se centrifigovala 11 000x g, 4°C, 10 minut. Supernatant s obsahem periplazmatických proteinů byl zakoncentrován pomocí trichloroctové

kyseliny (TCA) s následným promýváním acetonem. Peleta byla rozpuštěna v rehydratačním pufru pro 2-DE; koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena metodou BCA s přesrážením.

Opět se u této metody prováděla i modifikace s použitím 0,22 $\mu$ m filtrů (Millipore) před zakoncentrováním supernatantu.

#### **4.4 Příprava celobuněčného lyzátu**

Bakterie narostlé z 200 ml kultivačního média byly promyty v PBS a resuspendovány ve 3 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 s inhibitory proteáz (40  $\mu$ l/ml) a benzonázou (150 U/ml). Dále bylo provedeno rozbití bakterií pomocí přístroje French Press při 16000 psi, 2 průchody. Nerozbité bakterie byly odstraněny dvojnásobnou centrifugací při 6 500x g po dobu 15 min, 4 °C. Pomocí BCA-kitu byla stanovena koncentrace bílkoviny, vzorek byl přesrážen pomocí Ready Clean-Up kitu do rehydratačního pufru pro 2-DE.

#### **4.5 Stanovení bílkoviny**

##### *4.5.1 Micro BCA Protein Assay Kit*

Pro stanovení koncentrace bílkoviny ve vybraných vzorcích byl použit Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology). Tento kit obsahuje několik reagensů. Reagensie A obsahuje uhličitán sodný, hydrogen uhličitán sodný, vlnan sodný v 0,2 M NaOH. Reagensie B obsahuje 4 % bicinchoninovou kyselinu (BCA) ve vodě. Reagensie C obsahuje 4 % pentahydrát síranu měďnatého ve vodě. Jako standard se používá bovinní sérový albumin (BSA) v koncentraci 2,0 mg/ml v roztoku 0,9 % fyziologického roztoku a 0,05 % azidu sodného.

Při reakci dochází k redukci měďnatých kationtů na měďné působením bílkovin v alkalickém prostředí. Redukované měďnaté ionty vytváří se dvěma molekulami BCA barevný fialový produkt. Při 562 nm se měří jeho absorbance, která je přímo úměrná koncentraci bílkoviny ve vzorku.

Podle schématu uvedeného v tabulce č. 2 se připraví kalibrační řada zkumavek a z každé zkumavky se pipetuje po dvakrát 300  $\mu$ l vzorku ke kalibraci. Stejným způsobem se pipetuje i 300  $\mu$ l příslušně ředěného vzorku (opět dva vzorky).

Dále se připraví tzv. pracovní roztok smísením 25 dílů činidla A, 24 dílů činidla B, 1 dílu činidla C (25:24:1). Ke kalibračním i vlastním vzorkům se přidá vždy

300 µl pracovního roztoku, směs se promíchá a nechá inkubovat po dobu 60 minut při 60 °C. Po hodině se všechny zkumavky zchladí na pokojovou teplotu a na spektrofotometru se proměří absorbance při vlnové délce 562 nm. Z kalibrační řady se zjistí koncentrace bílkoviny ve vzorcích, která slouží k určení množství nanášeného vzorku na 2-DE.

Tabulka č. 2 Schéma pro pipetování kalibrační řady pro stanovení bílkoviny – micro BCA

Zkumavka	Objem vody v ml	Objem BSA v ml	BSA koncentrace v µg/ml
A	2,25	0,25 ml zásobního roztoku	200
B	4,0	1 ml A	40
C	2,0	2 ml B	20
D	2,0	2 ml C	10
E	2,0	2 ml D	5
F	2,0	2 ml E	2,5
G	2,4	1,6 ml F	1
H	2,0	2,0 ml G	0,5
I	4,0	0 ml	0

#### 4.5.2 Bicinchonic Acid Protein Assay Kit

Pro stanovení koncentrace bílkoviny se používal i Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma). Kit obsahuje činidlo A - roztok bicinchoninové kyseliny, činidlo B - síran měďnatý a jako standarda se používá bovinní sérový albumin.

Podle níže uvedené tabulky č. 3 se připraví kalibrační řada. Dále se pipetuje 45 (resp. 40) µl deionizované vody a 5 (resp. 10) µl vzorku (provádí se vždy dvakrát). Připraví se tzv. pracovní roztok smísením 50 dílů činidla A, 1 dílu činidla B. Ke standardům i vzorkům se přidá 1 ml pracovního roztoku a po promíchání se inkubovat po dobu 30 minut při 37 °C. Po půl hodině se všechny zkumavky zchladí na pokojovou teplotu. Další postup je shodný s metodou micro-BCA (viz výše).

Tabulka č. 3 Schéma pro pipetování kalibrační řady pro stanovení bílkoviny – BCA

Zkumavka	1	2	3	4	5	6
Pipetovaný objem deionizované vody v $\mu\text{l}$	50	40	30	20	10	0
Pipetovaný objem standardu v $\mu\text{l}$	0	10	20	30	40	50
Pipetovaný objem činidla v ml	1	1	1	1	1	1
Koncentrace standardu v mg/ml	0	2	4	6	8	10

#### 4.5.3 BCA s přesrážením

Tato metoda se používá tehdy, pokud látky obsažené v pufru, ve kterém je vzorek rozpuštěn, interferují se stanovením bílkoviny. Proteiny obsažené ve vzorku jsou proto před vlastním stanovením vysráženy prostřednictvím deoxycholátu sodného (0,15% roztok, tj. 15 mg/10 ml vody) a 72% TCA a rozpuštěny v 5% roztoku SDS v 0,1M NaOH. Vlastní stanovení se provádí pomocí BCA.

K 5  $\mu\text{l}$  vzorku se přidá 995  $\mu\text{l}$  deionizované vody a 100  $\mu\text{l}$  0,15% roztoku deoxycholátu sodného. Vzorek se inkubuje 10 minut při laboratorní teplotě. Pipetuje se 100  $\mu\text{l}$  72% trichloroctové kyseliny a eppendorfky se promíchají, dále zcentrifugují 15 minut (12 000x g), a sediment se rozpustí v 50  $\mu\text{l}$  5% roztoku SDS. Další postup je shodný s předchozím stanovením pomocí Bicinchonic Acid Protein Assay Kit (Sigma).

## **4.6 Postupy vedoucí k zakoncentrování a přečištění vzorku, pufrů pro 2-DE**

### 4.6.1 ReadyPrep 2-D Clean Up-Kit

Tento kit (firma Bio-Rad) slouží k přečištění a zakoncentrování vzorků určených pro 2-DE. V průběhu procesu dochází k rozpuštění a odstranění nečistot, které interferují s průběhem izoelektrické fokusace v rámci 2-DE, jako jsou např. iontové detergenty, lipidy, sole či nukleové kyseliny. Kit obsahuje několik reagentů:

precipitační činidlo 1 a 2, promývací roztoky 1 a 2, wash 2 additive. Během práce se vzorkem postupujeme dle návodu výrobce.

Ke 100  $\mu$ l vzorku o koncentraci 1-500  $\mu$ g se pipetuje 300  $\mu$ l precipitačního činidla 1. Následuje inkubace 15 minut v ledu. Přidá se 300  $\mu$ l precipitačního činidla 2. Eppendorfký se zcentrifugují 5 minut, asi 12 000x g. K sedimentu se napipetuje 40  $\mu$ l promývacího roztoku 1 a znovu se centrifuguje za stejných podmínek. K peletám se přidá 25  $\mu$ l deionizované vody a 1 ml promývacího roztoku 2 a 5  $\mu$ l wash 2 additive. Eppendorfký se inkubují při -20 °C 30 minut. Po inkubaci se provede centrifugace (5 minut, 12 000x g). Sediment se vysuší při laboratorní teplotě a rozpustí ve vhodném 2-DE pufru.

#### 4.6.2 *Precipitace pomocí trichloroctové kyseliny*

Ke vzorku s obsahem proteinů se přidá 100% trichloroctová kyselina do finální koncentrace 13%. Suspenze se inkubuje nejprve 5 minut při -20°C, a poté se nechá přes noc při 4 °C. Následuje centrifugace (10 000x g, 15 minut při 4 °C) a získaná peleta se dvakrát až třikrát promyje v 1,5–5 ml ledově vychlazeného acetonu. Důkladně promytá a na vzduchu vysušená peleta se rozpustí v příslušném pufru pro 2-DE.

#### 4.6.3 *Složení pufrů pro 2-DE*

- RTS pufr (pro neredukující podmínky)
  - 6M močovina
  - 2M thiomočovina
  - 4% 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát (Chaps)
  - 40 mM Tris-base
  - 0,5% bromfenolové modře
  
- RTS-D pufr (pro standardní, redukující podmínky)
  - Složení viz RTS pufr, navíc obsahuje De Streak Reagent (1,5%)
  
- UP pufr (Urea lysis buffer) (pro neredukující podmínky)
  - 9M močovina
  - 4% Chaps
  - 40 mM Tris-base



- UP-D pufr (pro redukující podmínky)  
Složení viz UP pufr, navíc obsahuje De Streak Reagent (1,5%) a 70 mM (1%) dithiothreitol (DTT)

#### **4.7 Dvourozměrná elektroforéza**

2-DE byla prováděna za standardních redukujících podmínek i za podmínek neredukujících (byly použity rehydratační pufrы i ekvilibrační roztoky bez redukčních činidel).

##### *4.7.1 Izoelektrická fokusace*

(IEF)

###### 4.7.1.1 Příprava vzorku před separací

Pro IEF při pH 4-7 a pH 3-10 jsme zvolily nanášku 100 µg bílkoviny, pro pH 6-11 nanášku 150 µg. Délka proužků ve všech případech byla 18 cm.

V případě pH 4-7 a 3-10 se vzorek doplňuje do celkového objemu 350 µl příslušným pufrem pro 2-DE doplněným o 1% IPG pufr pH 4-7. Pro IEF při pH 3-10 byl vzorek a 2-DE pufr doplněn 2,8% amfolytem pro pH 3-10 (Ampholyte, Fluka) a 1,3 % amfolytem pro pH 8-10 (Ampholyte I, Fluka). V případě IEF při pH 6-11 se vzorek doplňuje do celkového objemu 150 µl příslušným pufrem pro 2-DE. Ke směsi vzorku a pufru se přidává 2% IPG pufr pro pH 6-11.

###### 4.7.1.2 Rehydratace IPG-proužků

V případě pH 4-7 a pH 3-10 se provádí tzv. in-gel rehydratace. IPG-proužky jsou přes noc rehydratovány směsí vzorku s pufrem a amfolyty. U pH 6-11 se rehydratace provádí pouze roztokem pufru s amfolyty (pipetuje se 350 µl na jeden proužek). Druhý den se aplikuje vzorek do korýtek. Aby se zabránilo vysychání vzorku, rehydratující se proužky se zalévají parafinovým olejem.

###### 4.7.1.3 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace probíhala za podmínek uvedených v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4 Podmínky izoelektrické fokusace

pH 3-10, pH 4-7	pH 6-11
300 V – 30 minut	150 V – 1 hodina
600 V – 30 minut	300 V – 2 hodiny
1000 V – 30 minut	300-600 – 2 hodiny
2000 V – 30 minut	600– 1000 V – 2 hodiny
2500 V – 30 minut	1000– 3500 V – 3,5 hodiny
3000 V – 30 minut	3500 V – 15 hodin
3500 V – 3 hodiny	
5000 V – 12 hodin	

#### 4.7.2 Příprava polyakrylamidových gelů

Druhá dimenze 2-DE byla provedena na gradientovém polyakrylamidovém gelu, připraveného z tzv. lehkého 9 % a těžkého 16 % roztoku dle rozpisu uvedeného v tabulce č. 5.

Základní roztok (na 6 gelů):

- 51 g akrylamidu a 1,36 g 1,4-bis(akryloyl)piperazin (PDA) se rozpustilo v 170 ml vody a roztok se přefiltroval za odsávání přes nitrocelulózovou membránu
- Přidal se 5% thiosulfát sodný (0,5 g na 10 ml vody)
- a 10% persíran amonný (0,2 g na 2 ml vody)

Základní roztok se poté využil pro přípravu lehkého a těžkého roztoku.

Tabulka č. 5 Rozpis pro přípravu lehkého a těžkého roztoku pro nalití 6 gelů

9% lehký roztok	Akrylamid + PDA	55,1 ml
	Tris-HCl pH 8,8	48,4 ml
	Deionizovaná voda	87,8 ml
	5% thiosulfát sodný	0,945 ml

16% těžký roztok	Akrylamid + PDA	108,5 ml
	Tris-HCl pH 8,8	48,4 ml
	Deionizovaná voda	34,5 ml
	5% thiosulfát sodný	0,945 ml

Roztoky se odvdušily a do každého roztoku se přidalo 0,731 ml persíranu amonného (APS) a 73,13  $\mu$ l N,N,N',N'-tetramethylethyldiaminu (TEMED). Mezi skla pro gely se pomocí gradientní míchačky napustily lehký i těžký roztok. Horní část gelu měla koncentraci 9% a dolní část 16% polyakrylamidu.

#### 4.7.3 Ekvilibrace IPG-proužků

Fokusované IPG-proužky se smísily nejprve s 8 ml ekvilibračního roztoku s přídavkem dithiothreitolu (DTT) a poté s 8 ml ekvilibračního roztoku s přídavkem iodoacetamidu a 0,5 % bromfenolové modři (příprava uvedena v tabulce č. 6). Ekvilibrované proužky se vložily mezi skla na gel a zalily 0,5 % agarosou v Tris-glycin pH 8,3.

V případě elektroforézy za neredukujících podmínek se ekvilibrace prováděla stejným způsobem, avšak bez přítomnosti DTT a iodoacetamidu.

Tabulka č. 6 Ekvilibrační roztok

Základní ekvilibrační roztok	
Močovina	36 g
Glycerol	30 ml
SDS	2 g
1,5 M Tris-HCl pH 8.8 + 0,4% SDS	3,34 ml
doplnit deioniz. vodou do 100 ml, před použitím odměřit 2x 50 ml, přidat	
500mg DTT / 50 ml ekvilibračního roztoku	2 g iodoacetamidu a 250 $\mu$ l 0,5% bromfenolové modře / 50 ml ekvilibračního roztoku

#### 4.7.4 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Gely se zakotvenými IPG-proužky se umístily do držáků přístroje PROTEAN II Multi-Cell a zalily se pufrý pro elektroforézu (příprava uvedena v tabulce č. 7). Vlastní proces elektroforézy byl proveden za podmínek uvedených v tabulce č. 8.

Tabulka č. 7 Pufrý pro elektroforézu

Chemikálie	Horní pufr (objem 10 l)	Dolní pufr (objem 15 l)
Glycin	288 g	432 g
Tris-HCl	60 g	90 g
SDS	10 g	15 g
Azid sodný	0 g	3 g

Tabulka č. 8 Podmínky elektroforézy

Fáze procesu	El. proud	El. napětí	příkon	Počet volthodin	Doba trvání
1. Krok	5 mA/gel	500 V	100 W		1,5 hodiny
2. Krok	40 mA/gel	500 V	100 W	1327	5 hodin

#### 4.7.5 Detekce proteinů stříbřením

Složení jednotlivých roztoků používaných v průběhu stříbření gelů je uvedeno v tabulce č. 9. Po ukončení elektroforézy se gely nechaly na 5 minut promývat v deionizované vodě. Poté se přenesly do prvního fixačního roztoku 1 na dobu jedné hodiny a následovala inkubace ve fixačním roztoku 2 přes noc. Následujícího dne se gely oplachovaly chladnou (4 °C) deionizovanou vodou po dobu 5 minut. Ke gelům se přidal čerstvý roztok glutaraldehydu a octanu sodného na 30 minut a poté se opět promývaly chladnou vodou (třikrát během 30 minut). Ke gelům byl následovně přidán dvakrát za sebou na dobu 30 minut čerstvě připravený roztok 0,05 % disodné soli kyseliny 2,7-naftalensulfonové (NDS). K propláchnutým gelům (čtyřikrát po 15 minutách v chladné deionizované vodě) se přidal amoniakální roztok stříbra na dobu 30 minut. Poté se gely čtyřikrát za sebou (po 5 minutách) opět promývaly chladnou deionizovanou vodou. Ke gelům se přidal roztok vývojky. Poté, co se objevily proteinové skvrny, se barvení zastavilo pomocí tzv. přerušovací lázně s obsahem

kyseliny octové (na dobu 15 minut). Gely se uchovaly přes noc v roztoku 5 % Tris-HCl a 2 % kyseliny octové a následujícího dne se po promytí (10 minut v deionizované vodě) umístily do fixačního roztoku na dobu 3 hodin. Poté se gely složené mezi celofán umístily do rámečků a nechaly vysušit do druhého dne.

Tabulka č. 9 Roztoky na stříbření gelů (uvedeno na 6 gelů)

roztok	složení	objemy
Fixační roztok 1	metanol	480 ml
	kyselina octová	120 ml
	deionizovaná voda	600 ml
Fixační roztok 2	metanol	60 ml
	kyselina octová	60 ml
	deionizovaná voda	1080 ml
Roztok glutaraldehydu	glutaraldehyd	96 ml
	octan sodný	49,2 ml
	deionizovaná voda	do 1200 ml
0,05% NDS	NDS	0,2 g na 400 ml chladné vody
Amoniakální roztok Ag	10 M NaOH	2,4 ml
	hydroxid amonný	15.96 ml
	deionizovaná voda	256 ml
	roztok dusičnanu stříbrného	48 ml
20 % roztok dusičnanu stříbrného	dusičnan stříbrný deionizovaná voda	9,6 g doplnit do 48 ml
Roztok vývojky	roztok kys. citronové	120 µl
	formaldehyd	1,2 ml
	deionizovaná voda	doplnit do 1200 ml
Roztok kyseliny citronové	kyselina citronová deionizovaná voda	5g doplnit do 10 ml
Přerušovací lázeň	kyselina octová	250 ml
	deionizovaná voda	5000 ml
Uchovávání gelů	5 % Tris-HCl	250 g
	2 % kyselina octová	100 ml

	deionizovaná voda	5000 ml
Fixační roztok 3	metanol	2250 ml
	kyselina octová	375 ml
	glycerol	150 ml
	deionizovaná voda	2250 ml

#### **4.8 Digitalizace gelů**

Hotové, usušené gely byly nasnímány pomocí CCD kamery na přístroji KODAK Image station 2000R (Eastman Kodak Company).

#### **4.9 Vyhodnocování gelů**

Gely se poté vyhodnocovaly pomocí programu ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Tento program automaticky detekuje proteinové skvrny, provádí párování proteinových skvrn porovnávaných gelů (tzv. matchování) a umožňuje získat řadu informací na základě statistického zpracování dat.

Nejprve byly porovnávány vzorky celobuněčného lyzátu se vzorky frakce obohacené o periplazmatické proteiny. Na obou gelech byly nalezeny predikované periplazmatické proteiny (dle programu PSORTb) a porovnána jejich hodnota %VOL (tzv. relativní objem – jedná se o podíl objemu dané skvrny k objemu všech detekovaných skvrn na gelu). Ta posloužila k posouzení vhodnosti metody pro získání frakce obohacené o periplazmatické bílkoviny.

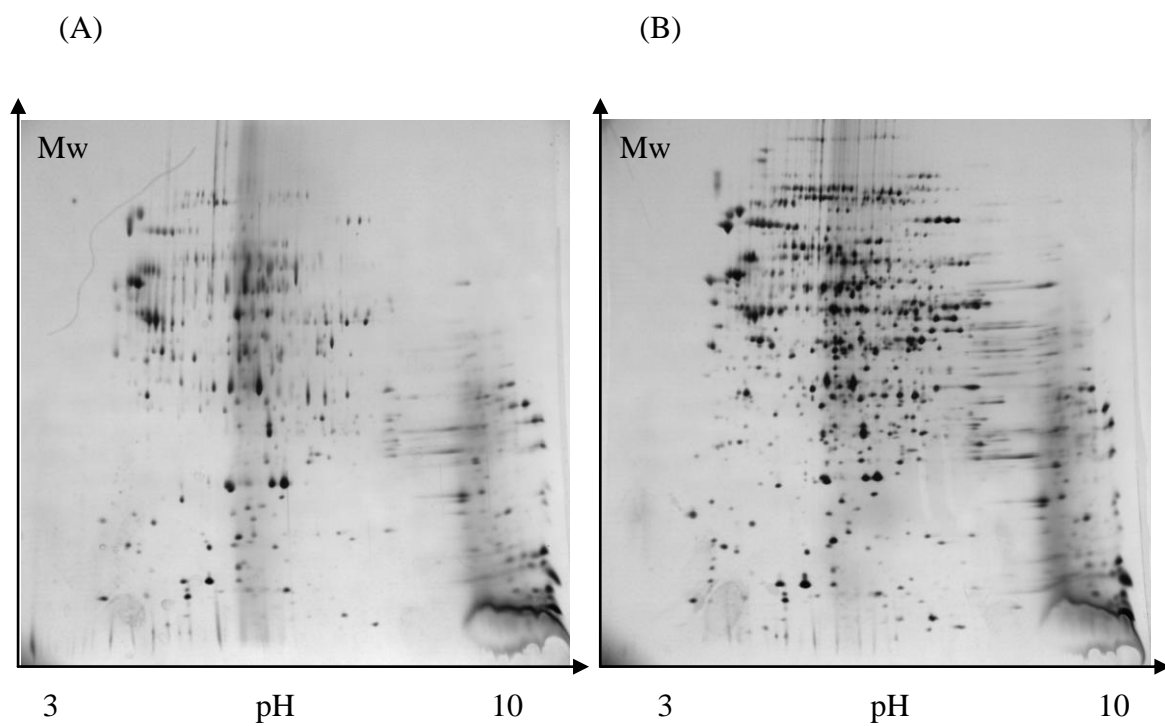
Po detekci následovalo spárování proteinových skvrn mezi gely ze vzorků získaných z divokého a mutantního kmene. Automatické párování vyžadovalo následnou manuální kontrolu. Cílem bylo zjistit, zda daná metoda pro získání frakce obohacené o periplazmatické proteiny, umožňuje detekovat významnější rozdíly ve výskytu a zastoupení proteinů u divokého a mutantního kmene. Za lišící se skvrny byly považovány ty, které se vyskytovaly buď pouze u divokého nebo mutantního kmene a hodnota jejich % VOL je větší nebo rovna 0,026 a skvrny, jejichž hodnota % VOL byla alespoň 2,5x vyšší u jednoho z kmenů (a zároveň alespoň u jednoho kmene měla daná proteinová skvrna hodnotu % VOL větší nebo rovnou 0,026).

## 5. VÝSLEDKY

### **5.1 Metoda s použitím EDTA a lysozymu**

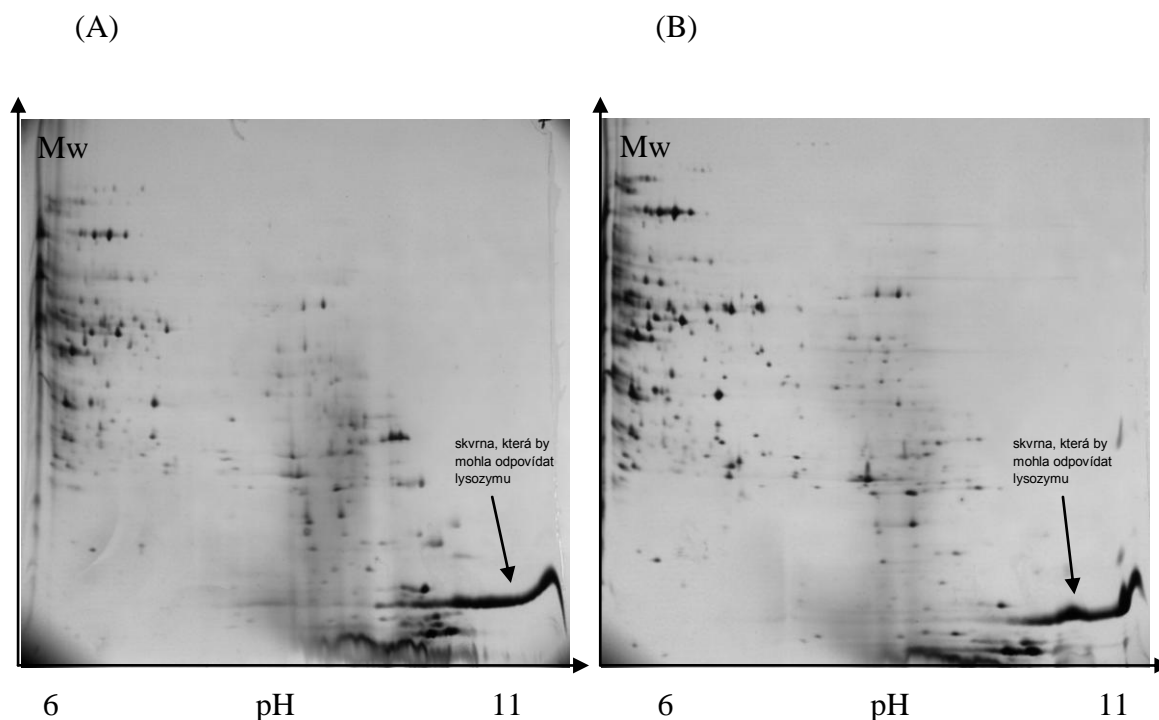
Tímto postupem bylo připraveno celkem pět různých vzorků, bohužel se však ukázalo, že není možné zajistit reprodukovatelnost výsledků. Získané proteinové mapy připravené z jednotlivých pokusů se totiž od sebe výrazně lišily. Nedařilo se ani připravit porovnatelné 2-D mapy z divokého a mutantního kmene s delecí v genu pro hypotetický lipoprotein s homologií k DsbA – LVS 155 $\Delta$ 1103 (dále jen mutantní kmen) i přes to, že byly tyto vždy připravovány paralelně (obrázek č. 4 a 5). V bazické oblasti pak u všech gelů (obrázek č. 5) byla patrná výrazná proteinová skvrna, která by svým pH a molekulovou hmotou mohla odpovídat kontaminaci vzorku lysozymem (pH 11,0; Mw 14,7 kDa). Je možné, že jeho přítomnost významně přispívá k výše zmíněným problémům. Nadále se proto od tohoto postupu upustilo.

V následující fázi jsme přistoupili k vyzkoušení čtyř dalších postupů, používaných k obohacení vzorků o periplazmatické proteiny (*Nossal, Heppel, 1966; Copeland et al., 1982; Ames et al., 1984; Judd, Porcella, 1993; Jensch, Fricke, 1997; Ren, Thöny-Meyer, 2001; Agudo et al. 2004, Hiniker a Bardwell, 2004; Önder et al., 2008; Imperi et al., 2009*) a zaměřili se na porovnatelnost získaných 2-D proteinových map mezi divokým a mutantním kmenem. Zároveň jsme i sledovali míru obohacení o sledované proteiny prostřednictvím vtipovaných periplazmatických markerů (viz kapitola 5.6).



Obrázek č. 4 Ukázka gelů frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím EDTA a lysozymu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 3-10, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením



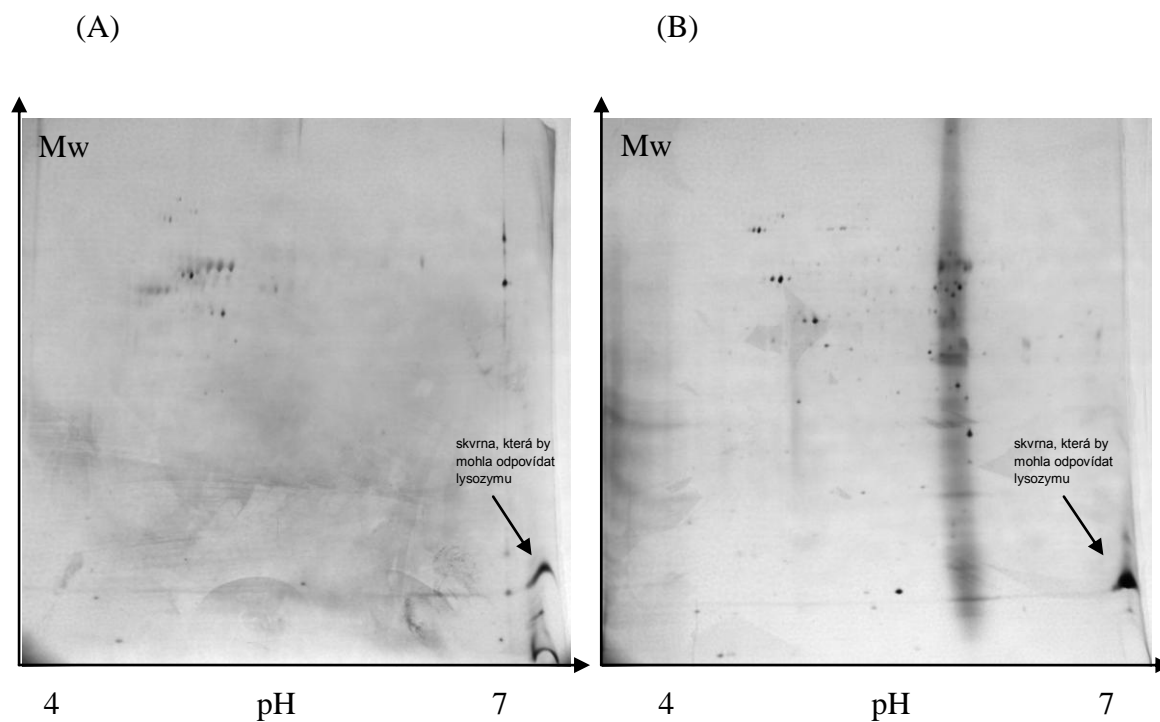


Obrázek č. 5 Ukázka gelů frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím EDTA a lysozymu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, nanáška 150 µg, detekce stříbřením. Na obrázku je patrná skvrna, která by mohla odpovídat lysozymu.

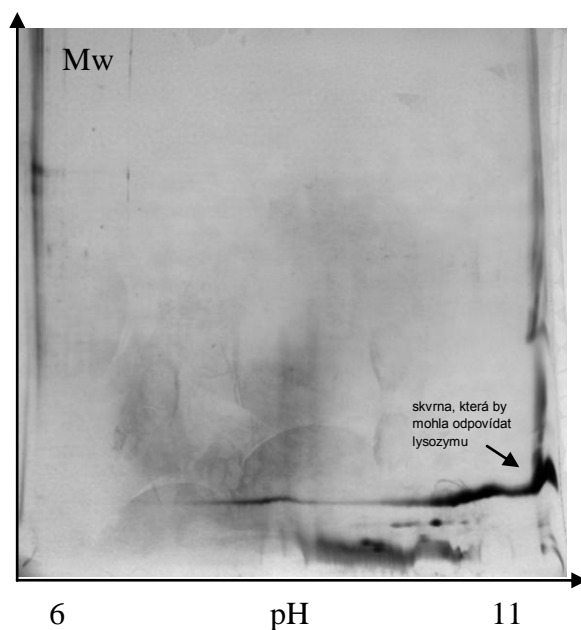
## **5.2 Metoda s použitím MgCl<sub>2</sub> a lysozymu**

Tímto postupem byl připraven jeden vzorek z divokého kmene a i přes standardní nanášku (100 µg) používanou ve všech ostatních postupech je na gelu patrně jen velmi málo proteinových skvrn (obrázek č. 6A). Pro případ, že při klasickém BCA stanovení koncentrace bílkoviny došlo k interferenci některé ze složek přítomných v proteinovém vzorku, bylo zároveň provedeno i stanovení bílkoviny s tzv. přesrážením (viz kapitola Metody 4.5.3), které by mělo případné rušivé složky odstranit. Koncentrace bílkoviny ve vzorku stanovená oběma postupy však byla srovnatelná. I přes pětinašobné navýšení nanášky bylo na gelu detekováno jen velmi málo proteinových skvrn (obrázek č. 6B). V bazické oblasti gelu je však vždy patrná velmi výrazná skvrna, která by opět svým pI i Mw mohla odpovídat přítomnosti lysozymu ve vzorku (obrázek č. 6, 7). Ten se v tomto postupu používá ve vysoké koncentraci - 0,5 mg/ml, což je dokonce 5x vyšší množství než v předchozím postupu. Jeho

přítomnost v takto vysokém množství pravděpodobně vedla k výše zmíněným problémům.



Obrázek č. 6 Ukázka gelů frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím  $MgCl_2$  a lysozymu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen, pH 4-7, detekce stříbřením. Standardní nanáška 100  $\mu g$  (A), nanáška 500  $\mu g$  (B). Na obrázku je patrná skvrna, která by mohla odpovídat lysozymu.



Obrázek č. 7 Ukázka gelu frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím  $MgCl_2$  a lysozymu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen, pH 6-11, nanáška 150  $\mu g$ , detekce stříbřením. Na obrázku je patrná skvrna, která by mohla odpovídat lysozymu.

### **5.3 Metoda s použitím chloroformu**

Tímto postupem jsme připravili vždy po jednom vzorku z divokého a mutantního kmene, ze kterých se podařilo získat vzájemně porovnatelné 2-D proteinové mapy v pH 4-7 i 6-11 za redukujících i neredukujících podmínek.

Na 2-D mapách rozdělených v pH 4-7 za standardních (redukujících) podmínek (obrázek č. 8) bylo objeveno 28 vzájemně se lišících proteinových skvrn mezi divokým a mutantním kmenem. Čtyři skvrny se vyskytovaly pouze u divokého kmene, 2 skvrny pak pouze u mutantního kmene, 11 jich bylo zvýšeno u divokého kmene (tj. mělo minimálně 2,5x vyšší hodnotu %VOL) a stejný počet i u kmene mutantního. V bazické oblasti (pH 6-11; obrázek č. 9) bylo objeveno celkem 40 vzájemně se lišících proteinových skvrn: jedna byla patrná pouze u divokého kmene, šest dalších pak pouze u mutantního kmene, 22 skvrn bylo zvýšeno u divokého a 11 u mutantního kmene. Jednotlivé počty rozdílných proteinových skvrn za daných podmínek jsou shrnuty v tabulce č. 10.

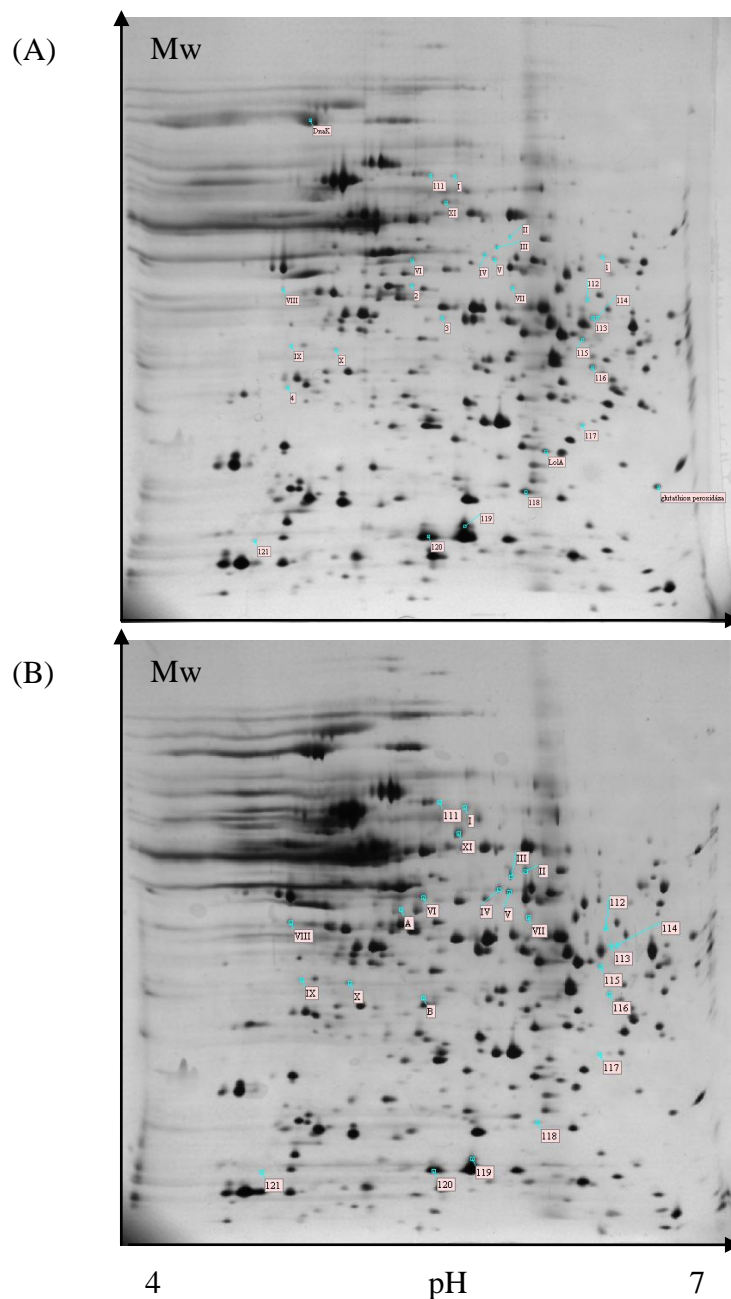
Na 2-D mapách připravených v oblasti pH 4-7 za neredukujících podmínek (obrázek č. 10) byl celkový počet odlišných skvrn 57 (více než dvojnásobný počet v porovnání

s redukujícími podmínkami). Pouze u divokého kmene bylo objeveno 14 proteinových skvrn, 14 jiných skvrn se vyskytovalo pouze u mutantního kmene, 16 jich bylo zvýšeno u divokého a 13 u mutantního kmene. V bazickém pH bylo za neredukujících podmínek nalezeno celkem 56 rozdílných proteinových skvrn (obrázek č. 11), což je téměř 1,5 krát více než v případě podmínek redukujících. Čtyři z těchto skvrn se vyskytovaly jen u divokého kmene, pouze u mutantního kmene bylo nalezeno 23 skvrn, 13 z nich bylo zvýšeno u divokého kmene a 16 u kmene mutantního.

Tabulka č. 10 Počet rozdílných skvrn u postupu s použitím chloroformu

podmínky	počet rozdílných skvrn				celkem
	pouze u wt	pouze u mutantního kmene	zvýšený u wt	zvýšený u mutantního kmene	
pH 4-7, redukující podmínky	4	2	11	11	28
pH 6-11, redukující podmínky	1	6	22	11	40
pH 4-7, neredukující podmínky	14	14	16	13	57
pH 6-11, neredukující podmínky	4	23	13	16	56

(wt-divoký kmen)



Obrázek č. 8 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím chloroformu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, redukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

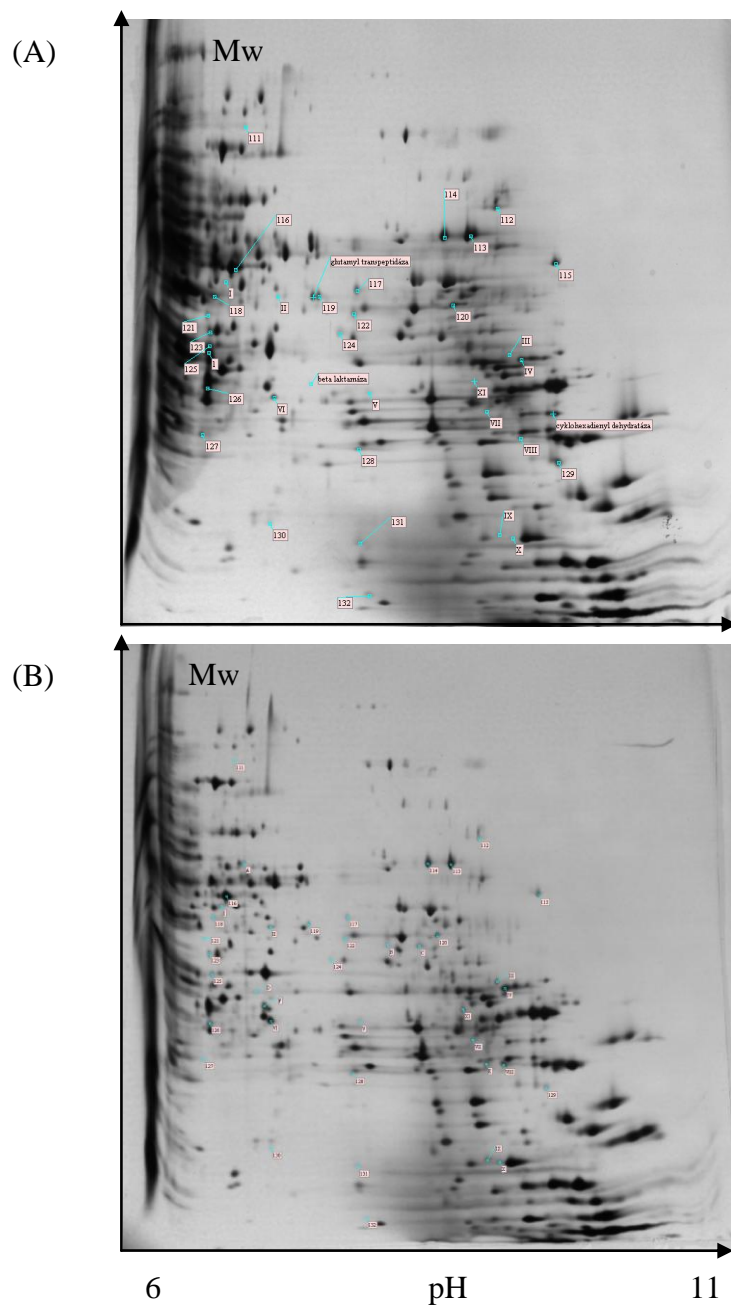
Legenda:

1-4...proteinové skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A,B...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-121...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XI...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 9 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím chloroformu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, redukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

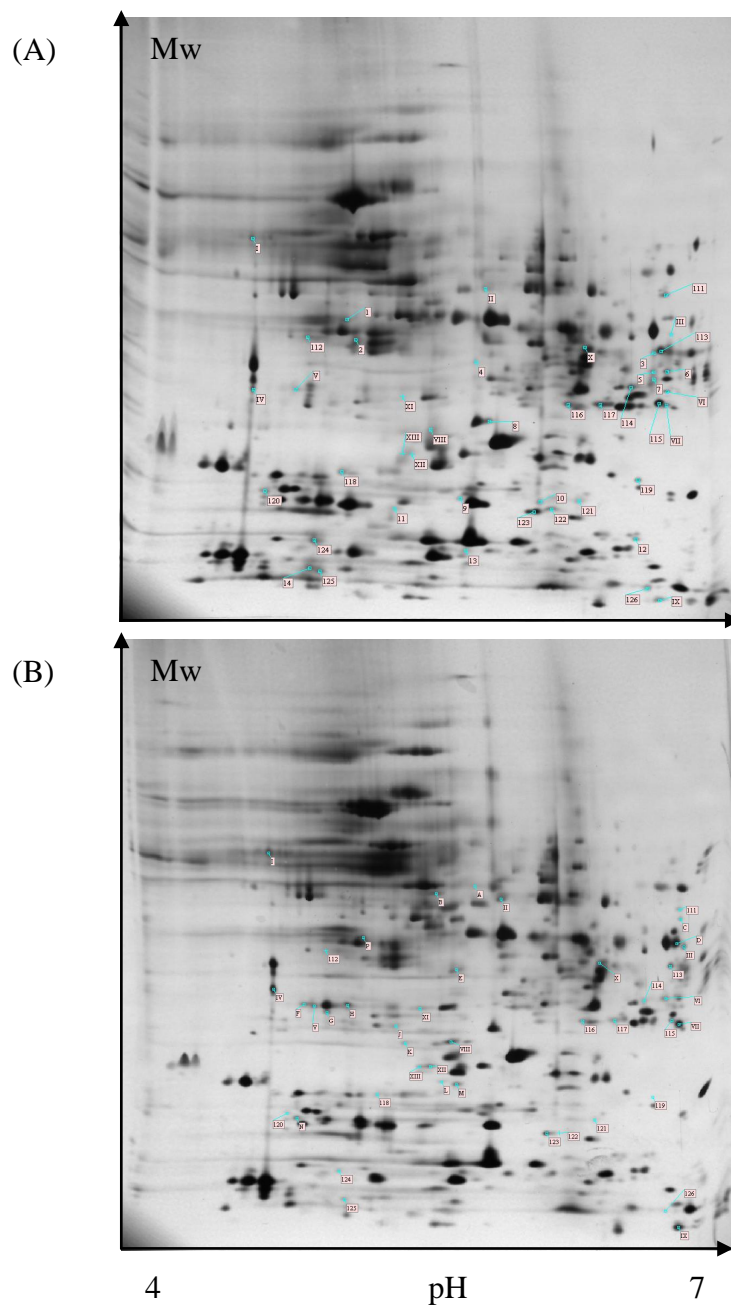
Legenda:

1...proteinová skvrna vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-F...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-132...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XI...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 10 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím chloroformu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, neredukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

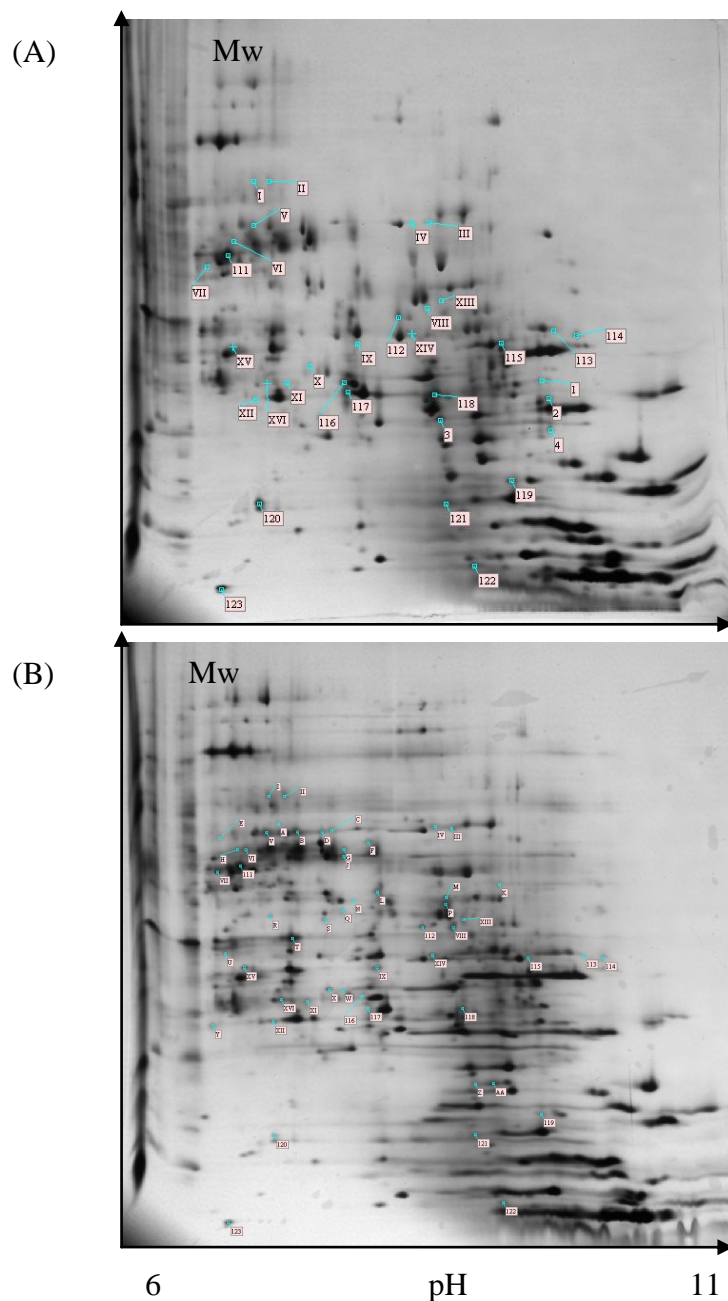
Legenda:

1-14...proteinové skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-P...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-126...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XIII...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 11 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím chloroformu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, neredukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

1-4...proteinové skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-AA... skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-123...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XVI...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



#### **5.4 Metoda s použitím polymyxin B sulfátu**

Metoda byla provedena ve dvou modifikacích: v prvním případě byly od supernatantů s přítomnými periplazmatickými proteiny odstraněny bakterie a sféroplasty pouze prostřednictvím dvojnásobné centrifugace (postup bez filtrů), v druhém případě pak byl vzorek i navíc zfiltrován pomocí PVDF filtrů (Millipore) s velikostí pórů 22  $\mu\text{m}$  (postup s filtry). Oběma postupy byly připraveny vzorky z divokého i mutantního kmene. Ze vzorků připravených postupem bez použití filtrů se však nepodařilo připravit porovnatelné 2-D proteinové mapy v pH 4-7 ani v pH 6-11 a to jak za redukujících tak i ani za neredukujících podmínek.

Naopak ze vzorků připravených postupem s filtrací se podařilo připravit porovnatelné proteinové 2-D obrazce v pH 4-7 za redukujících i neredukujících podmínek. V bazické oblasti za redukujících i neredukujících podmínek se bohužel porovnatelné 2-D proteinové mapy připravit nepodařilo.

Porovnáním 2-D proteinových obrazců připravených za redukujících podmínek v pH 4-7 jsme našli 25 rozdílných skvrn mezi divokým a mutantním kmenem. Sedm proteinových skvrn se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 2 skvrny pouze u mutantního kmene, 14 jich bylo zvýšeno (tj. mělo minimálně 2,5x vyšší hodnotu % VOL) u divokého kmene, 2 byly zvýšeny u kmene mutantního. Rozdílné proteinové skvrny jsou vyznačeny na obrázku č. 12.

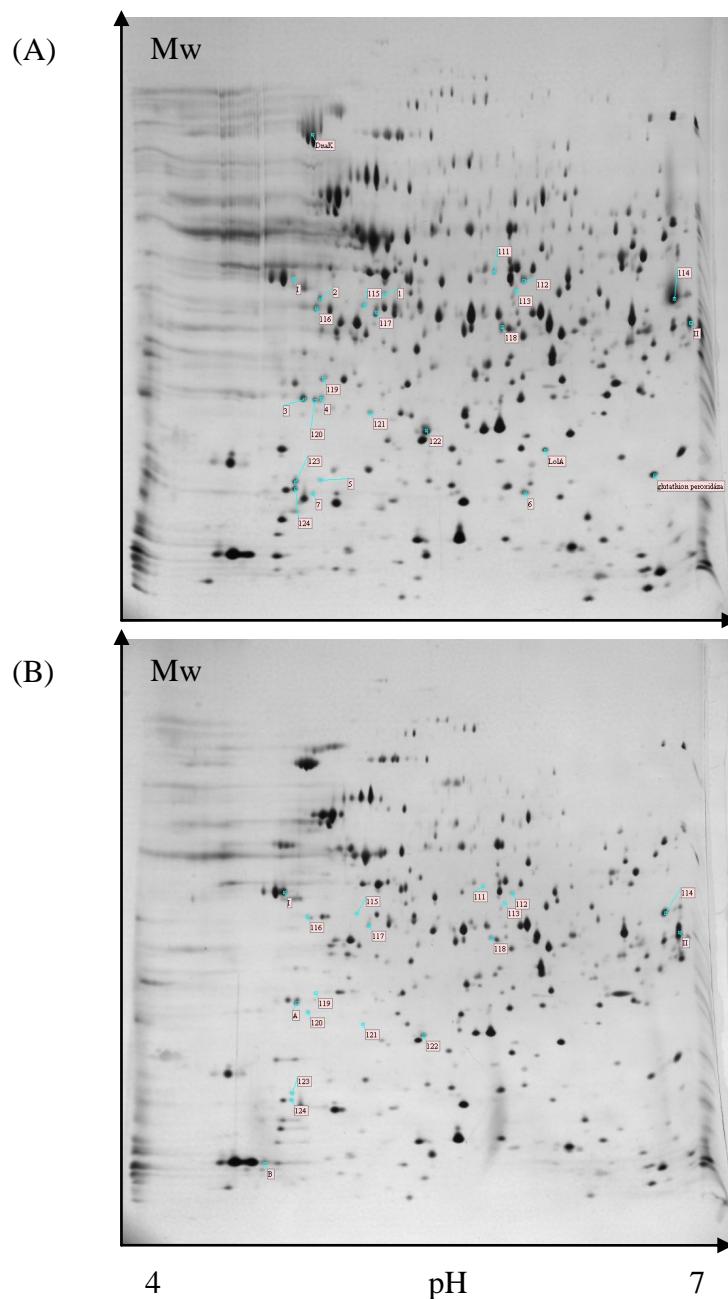
Za neredukujících podmínek v pH 4-7 (obrázek č. 13) bylo nalezeno 50 rozdílných skvrn (dvojnásobek ve srovnání s redukujícími podmínkami). Opět 7 skvrn se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 11 jich bylo nalezeno pouze u mutantního kmene, 21 jich bylo zvýšeno u divokého kmene a 11 u kmene mutantního.

Veškeré nalezené změny v proteinových skvrnách uvádí tabulka č. 11.

Tabulka č. 11 Počet rozdílných skvrn u postupů s použitím polymyxin B sulfátu a filtrů

podmínky	počet rozdílných skvrn				celkem
	pouze u wt	pouze u mutantního kmene	zvýšený u wt	zvýšený u mutantního kmene	
pH 4-7, redukující podmínky	7	2	14	2	25
pH 4-7, neredukující podmínky	7	11	21	11	50

(wt-divoký kmen)



Obrázek č. 12 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím polymyxin B sulfátu (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, redukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

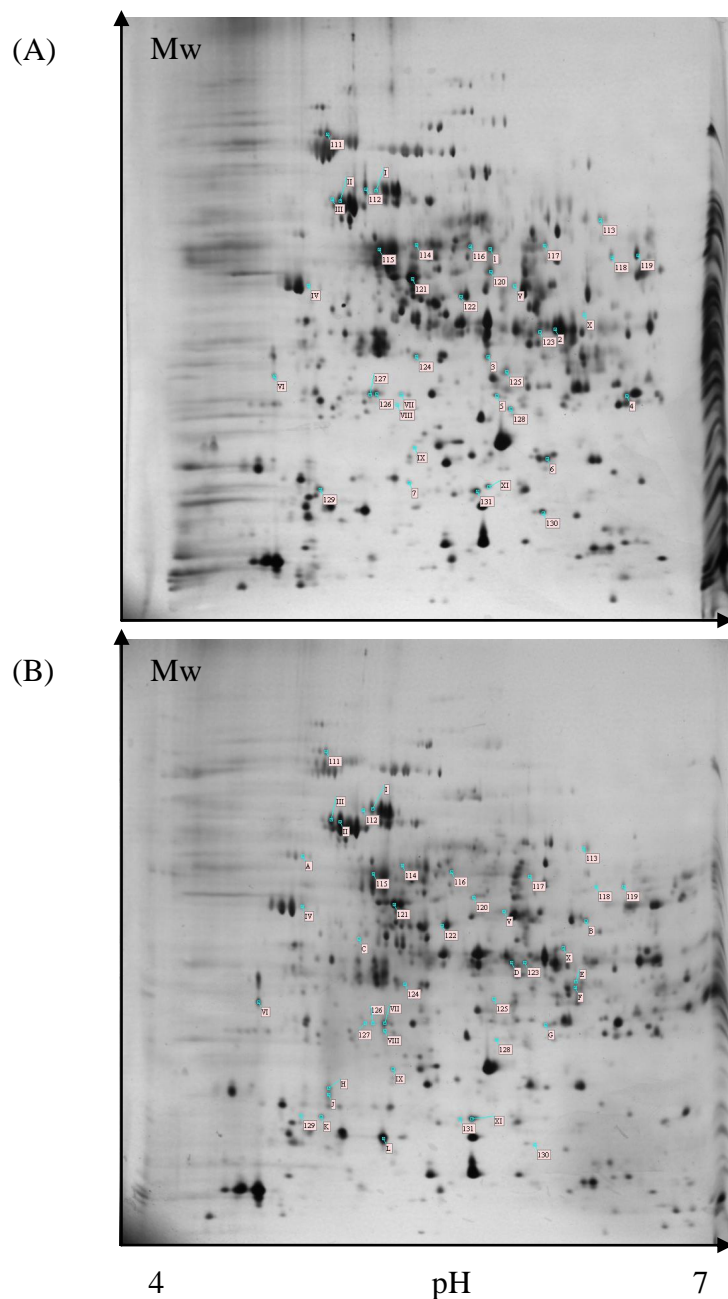
Legenda:

1-7...proteinové skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A,B...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-124...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I,II...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 13 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda s použitím polymyxin B sulfátu (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, neredukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na obrázku jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

1-7...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-L...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-131...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XI...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene

## **5.5 Metoda studeného osmotického šoku**

Tato metoda byla provedena opět ve dvou modifikacích a to jednak bez použití a jednak s použitím filtrů, stejně jak bylo popsáno v případě metody s polymyxinem (viz kapitola 5.4). Oběma postupy jsme připravili vzorky z divokého a mutantního kmene, ze kterých se podařilo získat porovnatelné 2-D proteinové mapy v pH 4-7 i 6-11 jak za redukujících tak i za neredukujících podmínek. Odlišnosti v počtech proteinových skvrn jsou přehledně uvedeny v tabulce č. 12.

Porovnáním příslušných 2-D map v pH 4-7 za redukujících podmínek (postup bez filtrů) bylo nalezeno celkem 83 rozdílných proteinových skvrn. Tři skvrny se vyskytovaly pouze u divokého kmene, zatímco 26 jiných proteinových skvrn bylo patrných pouze u mutantního kmene. Minimálně 2,5x vyšší hodnotu % VOL mělo 19 skvrn u divokého kmene a 35 u kmene mutantního (viz obrázek č. 14). Porovnáním gelů rozdělených v pH 6-11 (redukující podmínky, postup bez filtrů – viz obrázek č. 15) bylo objeveno 22 rozdílných skvrn: 2 byly pouze u divokého kmene, 16 jich bylo zvýšeno u divokého kmene, 4 u kmene mutantního.

Obrázek č. 16 zobrazuje 2-D proteinovou mapu divokého a mutantního kmene za neredukujících podmínek při pH 4-7 (postup bez filtrů). Zde bylo nalezeno celkem 24 odlišných skvrn, což je asi 3,5 krát méně ve srovnání s redukujícími podmínkami). Jedna proteinová skvrna se vyskytovala pouze u divokého kmene, 5 pouze u mutantního kmene, 3 další měly hodnotu % VOL minimálně 2,5x vyšší u divokého kmene a 15 u mutantního kmene. Na 2-D gelech v pH 6-11 připravených za neredukujících podmínek (postup bez filtrů) bylo zjištěno 20 rozdílných skvrn (obrázek č. 17), což je přibližně stejné množství jako za podmínek redukujících. Pouze u divokého kmene se vyskytovala 1 skvrna. Nebyla nalezena žádná skvrna, která by se vyskytovala u mutantního kmene, 6 jich bylo zvýšeno u divokého kmene a 13 u kmene mutantního.

Porovnáním příslušných 2-D map v pH 4-7 za redukujících podmínek (postup s filtry) bylo nalezeno celkem 36 rozdílných skvrn (obrázek č. 18). Pět proteinových skvrn se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 7 pouze u mutantního kmene, 22 skvrn mělo alespoň 2,5x vyšší hodnotu % VOL u divokého kmene a dvě skvrny u mutantního. V bazické oblasti (pH 6-11, obrázek č. 19) bylo nalezeno 65 rozdílných skvrn. Devět z nich se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 5 pouze u mutantního, 24 proteinových skvrn mělo minimálně 2,5x vyšší hodnotu % VOL u divokého kmene a 27 u kmene mutantního.

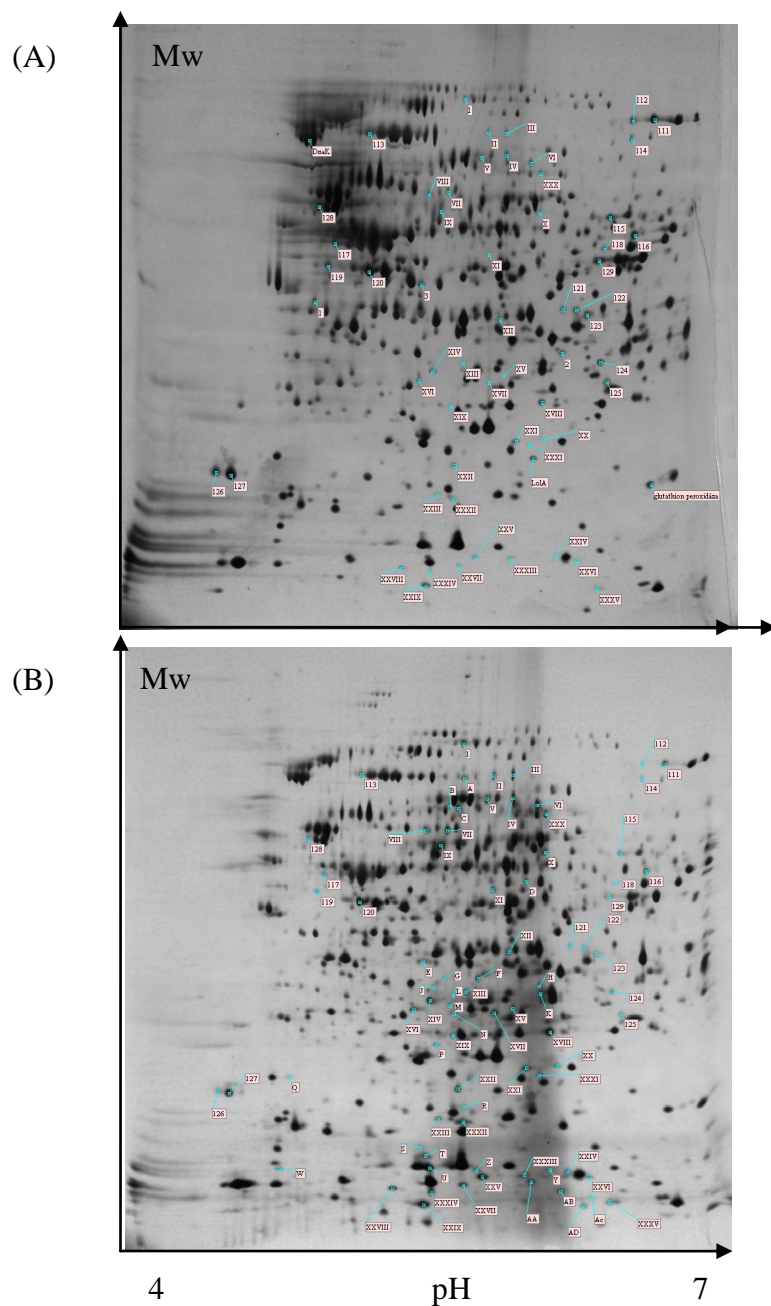
Za neredukujících podmínek u pokusu s filtry při pH 4-7 (viz obrázek č. 20) bylo detekováno 69 rozdílných skvrn (téměř dvojnásobek v porovnání s redukujícími podmínkami). Čtrnáct z nich se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 13 pouze u mutantního, 30 proteinových skvrn mělo minimálně 2,5x vyšší hodnotu % VOL u divokého kmene, 12 u kmene mutantního.

V bazickém rozmezí (pH 6-11, neredukující podmínky, postup s filtry) bylo nalezeno celkem 34 odlišných skvrn (téměř o polovinu méně ve srovnání s redukujícími podmínkami). Sedm proteinových skvrn se vyskytovalo pouze u divokého kmene, 11 skvrn bylo nalezeno pouze u mutantního kmene, 21 z nich mělo hodnotu % VOL minimálně 2,5x vyšší u divokého kmene a 11 u mutantního kmene (viz obrázek č. 21).

Tabulka č. 12 Počet rozdílných skvrn u metody studeného osmotického šoku

metoda	počet rozdílných skvrn				celkem
	pouze u wt	pouze u mutantního kmene	zvýšený u wt	zvýšený u mutantního kmene	
postu bez filtrů, pH 4-7, redukující podmínky	3	26	19	35	83
postup bez filtrů, pH 6-11, redukující podmínky	2	0	16	4	22
postup bez filtrů, pH 4-7, neredukující podmínky	1	5	3	15	24
postup bez filtrů, pH 6-11, neredukující podmínky	1	0	6	13	20
postup s filtry, pH 4-7, redukující podmínky	5	7	22	2	36
postup s filtry, pH 6-11, redukující podmínky	9	5	24	27	65
postup s filtry, pH 4-7, neredukující podmínky	14	13	30	12	69
postup s filtry, pH 6-11, neredukující podmínky	5	1	8	20	34

(wt-divoký kmen)



Obrázek č. 14 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup bez filtrů), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, redukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

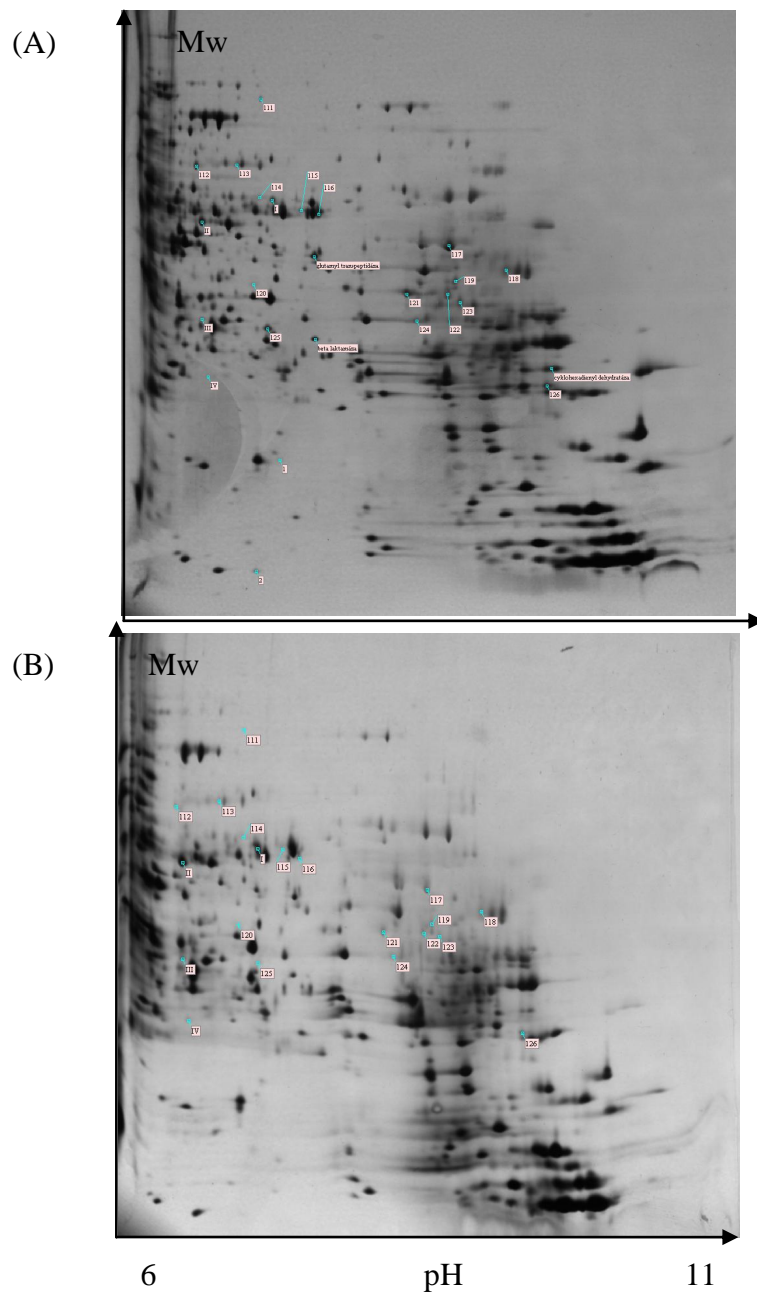
Legenda:

1-3...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-AD...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-129...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XXXV...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



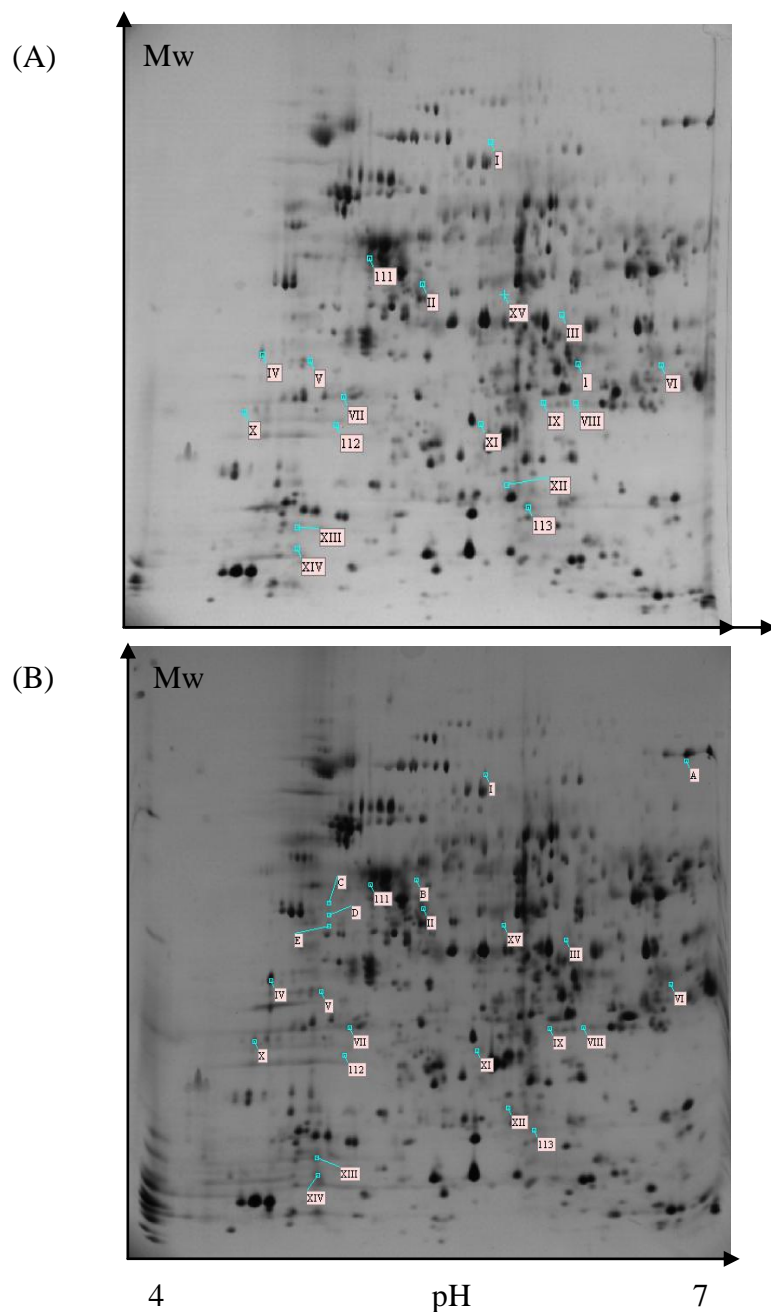
Obrázek č. 15 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup bez filtrů), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, redukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a dále proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

1,2...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

111-126...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-IV...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 16 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny – metoda studeného osmotického šoku (postup bez filtrů), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, neredukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

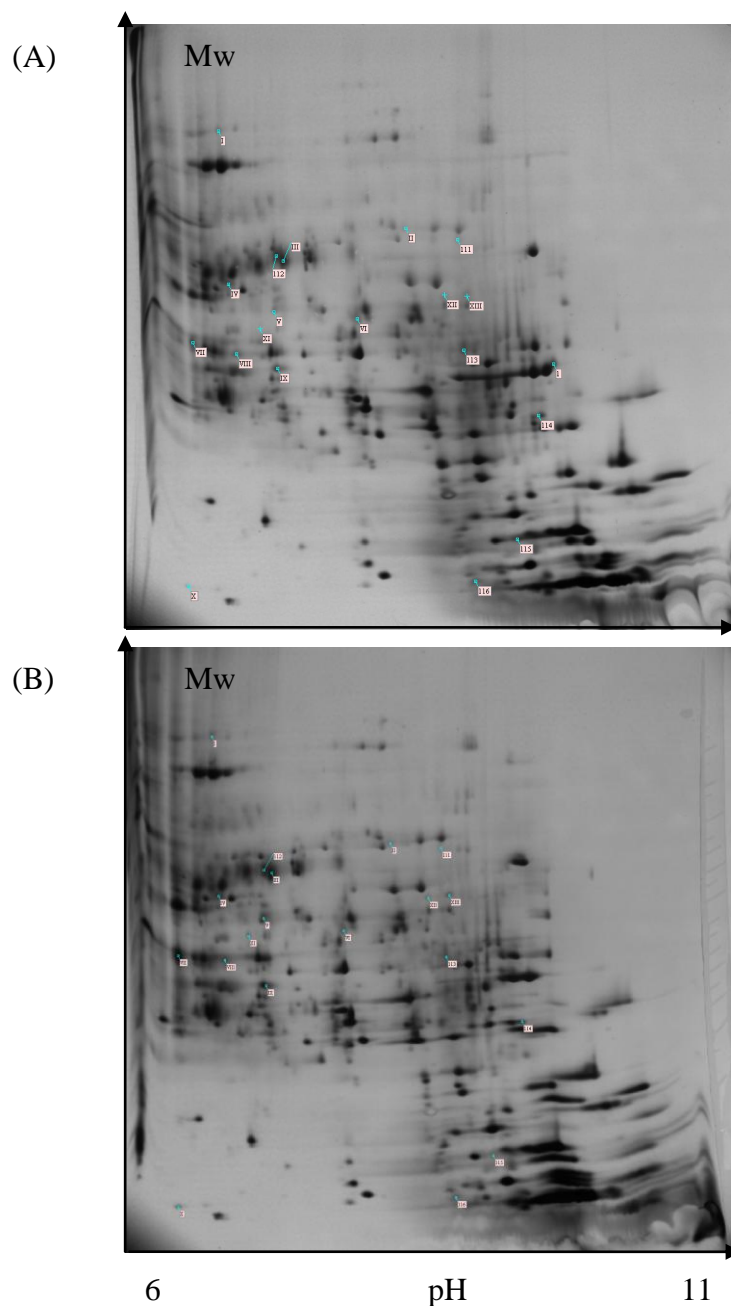
1...skvrna vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-E...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-113...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XV...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene





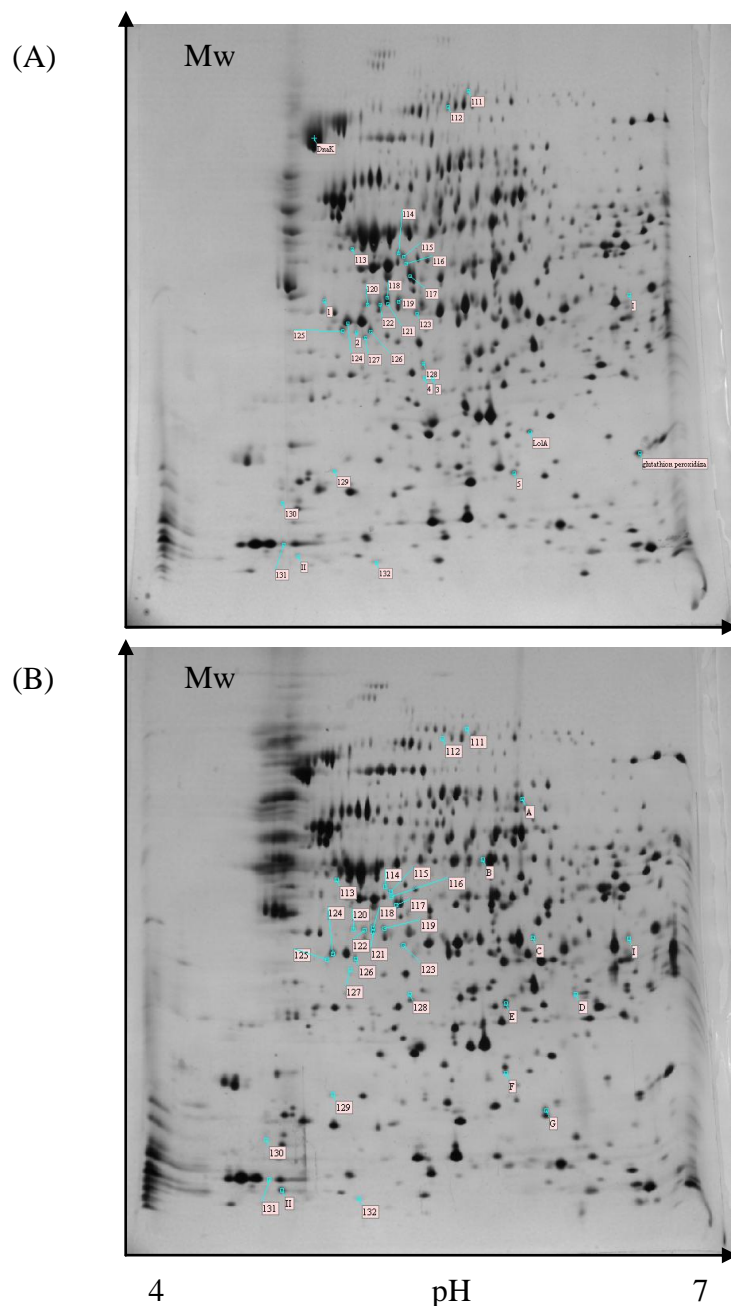
Obrázek č. 17 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup bez filtrů), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, neredukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

1...skvrna vyskytující se pouze u divokého kmene,

111-116...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XIII...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 18 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, redukující podmínky, nanáška 100 µg, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny predikované periplazmatické markery (viz dále) a dále proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

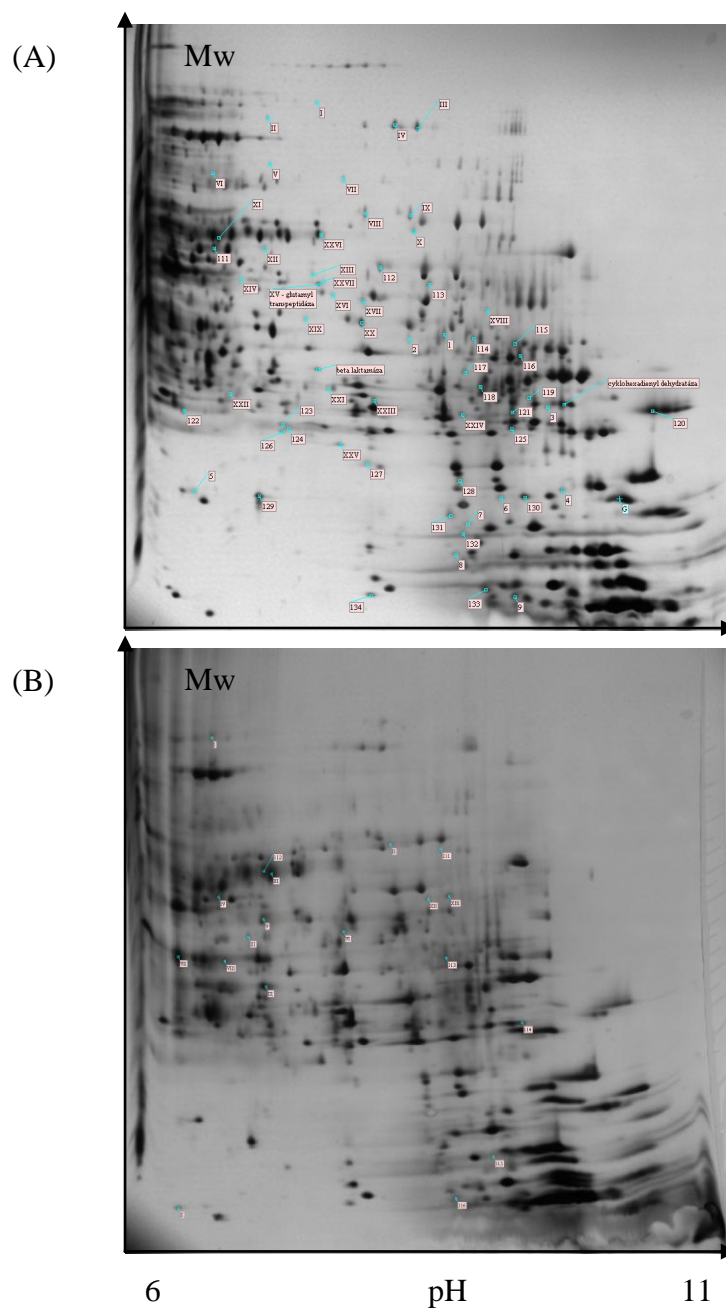
Legenda:

1-5...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-G...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-132...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-II...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 19 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, redukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

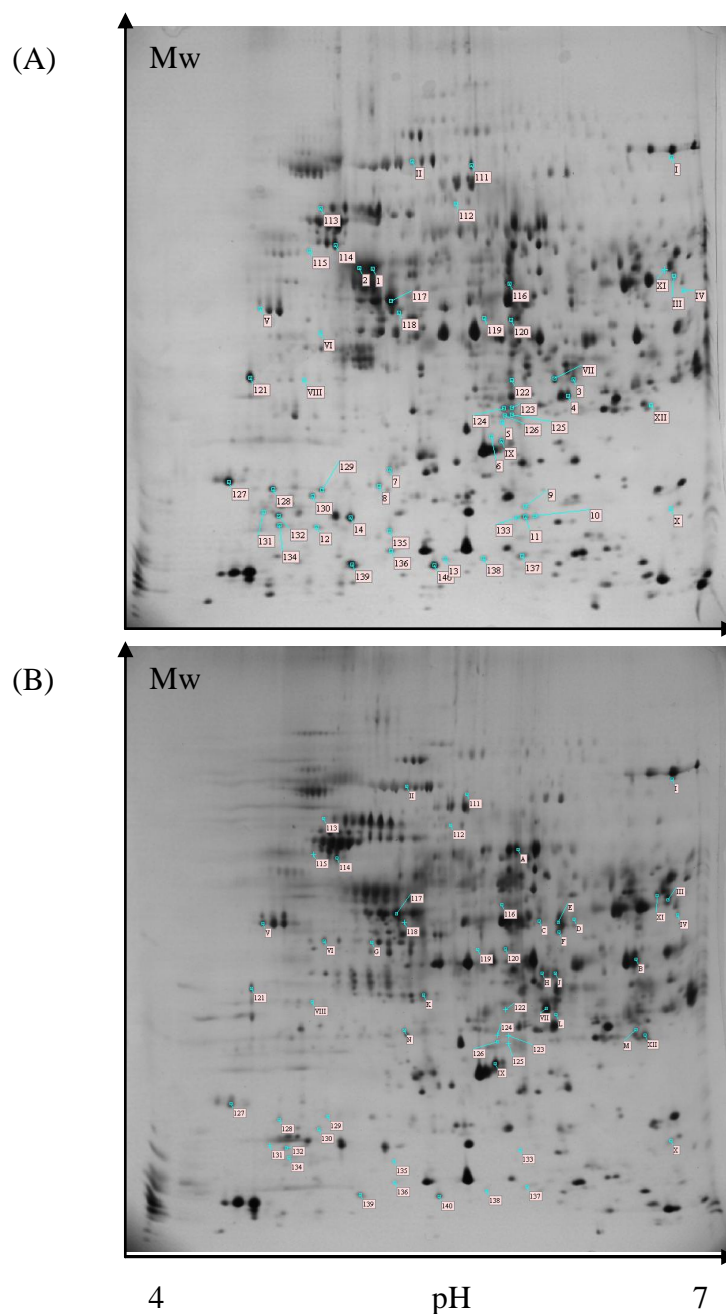
Legenda:

1-9...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-E...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-134...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XXVII...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 20 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 4-7, neredukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

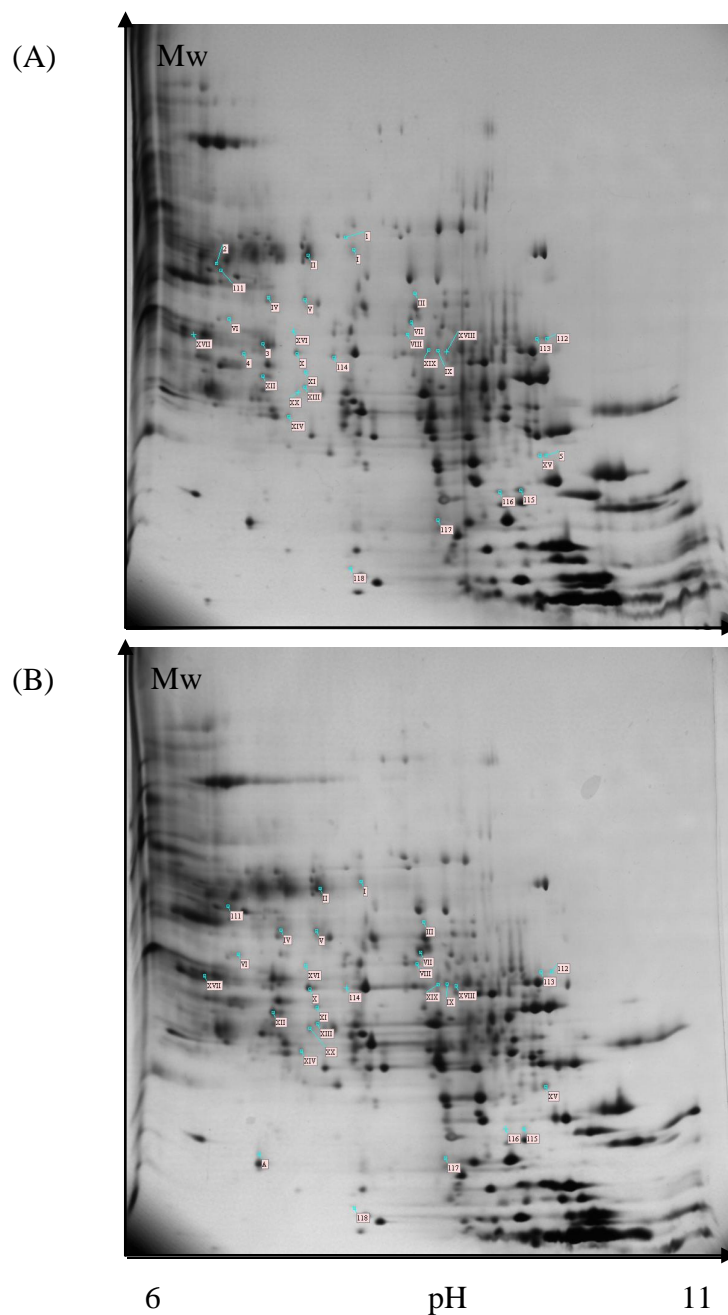
Legenda:

1-14...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A-N...skvrny vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-140...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XII...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene



Obrázek č. 21 2-D proteinová mapa frakce obohacené o periplazmatické proteiny - metoda studeného osmotického šoku (postup s filtry), *F. tularensis* LVS, divoký kmen (A), mutantní kmen (B), pH 6-11, neredukující podmínky, nanáška 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny proteinové skvrny rozdílné v porovnání s druhým kmenem.

Legenda:

1-5...skvrny vyskytující se pouze u divokého kmene,

A...skvrna vyskytující se pouze u mutantního kmene,

111-118...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u divokého kmene,

I-XX...skvrny s minimálně 2,5x vyšší hodnotou % VOL u mutantního kmene

## **5.6 Vyhodnocení testovaných metod pomocí periplazmatických markerů**

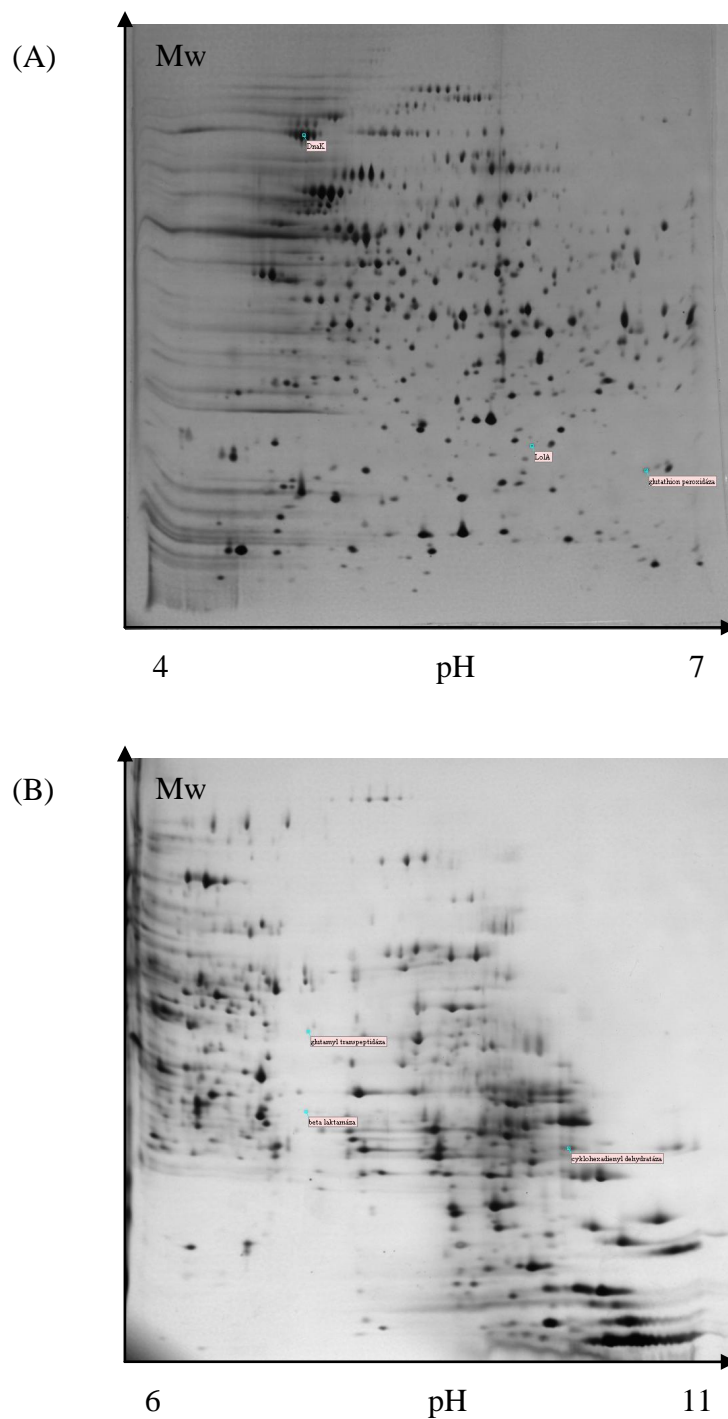
S využitím volně přístupného programu PSORTb ([www.psort.org/psortb/](http://www.psort.org/psortb/)) pro predikci subcelulární lokalizace bakteriálních proteinů byly vybrány proteiny bakterie *Francisella tularensis* s predikovanou periplazmatickou lokalizací. Pomocí referenčních map (dostupných na Ústavu molekulární patologie, či na internetové adrese: <http://web.mpiib-berlin.mpg.de>) se podařilo na všech gelech vyhodnocovaných v této práci nalézt proteinové spoty příslušející celkem šesti proteinům s predikovanou periplazmatickou lokalizací, které jsme označili jako tzv. periplazmatické markery (viz tabulka č. 13). U gelů v pH 4-7 se jedná o chaperonový protein DnaK (z rodiny heat shock proteinů 70), LolA (A podjednotka proteinu patřícího do systému uvolňujícího lipoprotein) a glutathion peroxidázu; u gelů v pH 6-11 pak o  $\beta$ -laktamázu,  $\gamma$ -glutamyl transpeptidázu a cyklohexadienyl dehydratázu.

Tabulka č. 13 Proteiny bakterie *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS, NC\_007880 s predikovanou periplazmatickou lokalizací (dle PSORTb) s vyznačenými námi vyhodnocovanými markery

Název proteinu	Číslo lokusu
<b>Cyklohexadienyl dehydratasa - prekurzor, pseudogen</b>	FTL_0187
Prekurzor TolB proteinu	FTL_0334
Prekurzor superoxid dismutasy (Cu-Zn)	FTL_0380
Solubilní lytická murein transglykosylasa	FTL_0466
<b>Gamma-glutamyltranspeptidasa</b>	FTL_0766
<b>Beta-laktamasa</b>	FTL_0879
Beta-laktamasa třídy A	FTL_0957
Alpha, alpha-trehalasa.	FTL_1150

Trehalasa - pseudogen	FTL_1151
<b>Chaperonový protein DnaK</b>	FTL_1191
<b>Glutathion peroxidasa</b>	FTL_1383
L-aspartát oxidasa	FTL_1388
Putrescin-vazebný - periplasmatický protein	FTL_1582
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa (PPIase)	FTL_1596
Hypotetický protein FTL_1654	FTL_1654
<b>A podjednotka proteinu patřícího do systému uvolňujícího lipoprotein LolA</b>	FTL_1706

Pro porovnání míry obohacení vzorku o periplazmatické proteiny byly vždy u proteinové skvrny pro daný marker odečteny hodnoty % VOL a porovnány s % VOL příslušné skvrny z 2-D map celobuněčného lyzátu (obrázek č. 22). Porovnání bylo provedeno z 2-D proteinových map (pH 4-7 i 6-11) připravených ze vzorků divokého kmene za redukujících podmínek.



Obrázek č. 22 2-D proteinová mapa celobuněčného lyzátu, *F. tularensis* LVS, divoký kmen, pH 4-7 (A) resp. pH 6-11 (B), redukující podmínky, nanáška 100  $\mu$ g resp. 150  $\mu$ g, detekce stříbřením. Na proteinové mapě jsou vyznačeny periplazmatické markery (viz dále).



Při použití chloroformu pro obohacení frakce o periplazmatické proteiny byla hodnota % VOL - u DnaK jen nepatrně zvýšená v porovnání s příslušnou skvrnou z celobuněčného lyzátu, u LolA pak byla téměř třikrát, u glutathion peroxidázy přibližně dvakrát a u  $\gamma$ -glutamyl transpeptidázy až čtyřikrát zvýšená. Naopak u  $\beta$ -laktamázy byla hodnota % VOL snížena přibližně na polovinu hodnoty příslušné skvrny z celobuněčného lyzátu a u cyklohexadienyl dehydratázy je hodnota % VOL u obou porovnávaných vzorků přibližně stejná (viz tabulka č. 14).

Tabulka č. 14 Hodnoty % VOL u jednotlivých predikovaných periplazmatických markerů při postupu s použitím chloroformu

	Protein s predikovanou periplazmatickou lokalizací (dle PSORTb)	% VOL proteinové skvrny- celobuněčný lyzát	% VOL proteinové skvrny- frakce obohacená o periplazmatické proteiny	podíl % VOL proteinové skvrny (periplazma ku celobuněčnému lyzátu)
			chloroform	chloroform /CL
pH 4-7	DnaK	1,9000	2,1808	1,1478
	LolA	0,0467	0,1370	2,9336
	glutathion peroxidáza	0,0791	0,1587	2,0063
pH 6-11	cyklohexadienyl dehydratáza	0,1928	0,2402	1,2459
	$\beta$ -laktamáza	0,0160	0,0065	0,4063
	$\gamma$ -glutamyl transpeptidáza	0,0223	0,0902	4,0448

(CL-celobuněčný lyzát)

Při postupu s polymyxinem bez použití filtrů (viz tabulka č. 15) je hodnota % VOL u DnaK asi 1,3 násobná v porovnání s příslušnou skvrnou z celobuněčného lyzátu, u LolA jsou hodnoty % VOL téměř shodné a u glutathion peroxidázy je hodnota % VOL téměř 1,5 násobná. Hodnota % VOL u cyklohexadienyl dehydratázy i  $\beta$ -laktamázy je nižší než u příslušné skvrny z celobuněčného lyzátu. Pouze  $\gamma$ -glutamyl transpeptidáza má hodnotu % VOL 1,8 násobnou.

V případě použití filtrů v průběhu přípravy vzorku je patrné výraznější nabohacení - hodnota % VOL je u LolA a glutathion peroxidázy více než dvojnásobně vyšší než u téže metody bez filtrů. Hodnota % VOL u DnaK je asi 1,3 násobná v porovnání s příslušnou skvrnou z celobuněčného lyzátu. U cyklohexadienyl dehydratázy,  $\beta$ -laktamázy i  $\gamma$ -glutamyl transpeptidázy nebylo možné zjistit příslušné hodnoty % VOL pro jednotlivé skvrny, protože se nám nepodařilo připravit porovnatelné gely.

Tabulka č. 15 Hodnoty % VOL u jednotlivých predikovaných periplazmatických markerů při postupu s použitím polymyxinu

	Protein s predikovanou periplazmatickou lokalizací (dle PSORTb)	% VOL proteinové skvrny- celobuněčný lyzát	% VOL proteinové skvrny- frakce obohacená o periplazmatické proteiny		podíl % VOL proteinové skvrny (periplazma ku celobuněčnému lyzátu)	
			polymyxin	polymyxin s filtry	polymyxin/CL	polymyxin s filtry/CL
pH 4-7	DnaK	1,9000	2,4872	2,5092	1,3091	1,3206
	LolA	0,0467	0,0473	0,1367	1,0128	2,9272
	glutathion peroxidáza	0,0791	0,1139	0,2973	1,4399	3,7585
pH 6-11	cyklohexadienyl dehydratáza	0,1928	0,1875	—————	0,9725	—————
	β-laktamáza	0,0160	0,0114		0,7125	
	γ-glutamyl transpeptidáza	0,0223	0,0400		1,7937	

(CL-celobuněčný lyzát)

U metody studeného osmotického šoku s postupem bez filtrů byla hodnota % VOL u DnaK snížena ve srovnání se vzorkem celobuněčného lyzátu. Naopak hodnota % VOL LolA, glutathion peroxidázy i cyklohexadienyl dehydratázy byla ve srovnání s lyzátem zvýšená a to více než dvojnásobně. U β-laktamázy je hodnota % VOL téměř 7,5 násobná a u γ-glutamyl transpeptidázy skoro devítinásobná (viz tabulka č. 16).

V případě použití filtrů v průběhu přípravy vzorku je hodnota % VOL DnaK přibližně 1,5 násobná v porovnání s příslušnou skvrnou z celobuněčného lyzátu, u LolA je to téměř 1,7 násobek, u glutathion peroxidázy asi 2,5 násobek, u cyklohexadienyl dehydratázy je to přibližně 2,7-násobek, u γ-glutamyl transpeptidázy 1,5 násobek a u β-laktamázy je to hodnota asi 2,5-násobná v porovnání s příslušnou skvrnou u celobuněčného lyzátu. Vše přehledně shrnuje tabulka č. 16.

Tabulka č. 16 Hodnoty % VOL u jednotlivých predikovaných periplazmatických markerů při metodě studeného osmotického šoku

	Protein s predikovanou periplazmatickou lokalizací (dle PSORTb)	% VOL proteinové skvrny- celobuněčný lyzát	% VOL proteinové skvrny- frakce obohacená o periplazmatické proteiny		podíl % VOL proteinové skvrny (periplazma ku celobuněčnému lyzátu)	
			osmotický šok	osmotický šok s filtry	osmotický šok/CL	osmotický šok s filtry/CL
pH 4-7	DnaK	1,9000	1,5872	2,9230	0,8354	1,5384
	LolA	0,0467	0,0987	0,0791	2,1135	1,6938
	glutathion peroxidáza	0,0791	0,1640	0,1967	2,0733	2,4867
pH 6-11	cyklohexadienyl dehydratáza	0,1928	0,4414	0,5267	2,2894	2,7318
	β-laktamáza	0,0160	0,1182	0,0415	7,3875	2,5938
	γ-glutamyl transpeptidáza	0,0223	0,1958	0,0338	8,7803	1,5157

(CL-celobuněčný lyzát)

## 6. DISKUZE

Virulenci patogenních gramnegativních bakterií mohou významně ovlivňovat enzymy či enzymatické systémy lokalizované v periplazmatickém prostoru. Jedná se například o tzv. Dsb (Disulfide bond formation) systém, který prokazatelně ovlivňuje biogenezi řady bakteriálních toxinů i virulenčních faktorů právě u celé řady gramnegativních bakterií, kde se může vyskytovat v různých modifikacích. (Heras *et al.*, 2009).

U bakterie *Francisella tularensis* subtypu *tularensis* byl nedávno objeven nový faktor virulence – hypotetický lipoprotein kódovaný genem na lokusu *FTT1103* (Qin *et al.*, 2009). Tento lipoprotein sdílí určitou podobnost s DsbA proteiny, které jsou součástí výše zmiňovaného Dsb systému (Qin *et al.*, 2009). DsbA proteiny patří do rodiny thioredoxinů a vykazují thiol-disulfid oxidoreduktázovou aktivitu (Heras *et al.*, 2009), která byla experimentálně prokázána i u výše zmíněného hypotetického lipoproteinu *F. tularensis* (Straskova *et al.*, 2009).

DsbA proteiny katalyzují tvorbu disulfidických můstků v nově vytvořených proteinech po jejich přesunu do periplazmatického prostoru. Přítomnost disulfidických můstků je nezbytná pro správnou konformaci a stabilitu těchto proteinů a tím i pro jejich funkčnost a správnou lokalizaci. Mezi substrátové proteiny pro DsbA patří i celá řada známých faktorů virulence jako jsou např. toxiny, povrchové struktury (adheziny a pili) či sekreční systémy. Vyřazením genu pro DsbA proto obecně dochází k výraznému oslabení virulence patogenních bakterií (Heras *et al.*, 2009).

Studiem potenciálních substrátů DsbA proteinu *F. tularensis* se zabývali Straskova *et al.* (2009). Autoři pomocí kombinace klasického a shotgun proteomického přístupu identifikovali ve vzorcích z membránové frakce bakterie *Francisella tularensis* subtypu *holarctica* devět potenciálních substrátů DsbA proteinu. Přihlédneme-li k široké substrátové specifitě DsbA proteinu, jedná se o poměrně malé množství proteinů a vzhledem k periplazmatickému působení DsbA lze předpokládat, že větší množství potenciálních substrátů bude možno nalézt obdobnou analýzou frakcí obohacených o periplazmatické proteiny. Příprava této frakce však u *F. tularensis* dosud nebyla popsána.

Předkládaná studie se zabývá právě zaváděním vhodné metody pro přípravu frakce obohacené o periplazmatické proteiny bakterie *Francisella tularensis*. Za tímto účelem jsme vyzkoušeli několik postupů popsanych v dostupné literatuře. Základní podstatou této frakcionace je rozrušení vnější bakteriální membrány a stabilizace vnitřní cytoplazmatické membrány a s následným uvolněním periplazmatických proteinů do supernatantu. Z běžně používaných postupů se jedná se o metodu studeného osmotického šoku (Nossal, Heppel, 1966; Copeland et al., 1982; Jensch, Fricke, 1997; Hiniker a Bardwell, 2004; Imperi et al., 2009), postup s použitím chloroformu (Ames et al., 1984; Judd, Porcella, 1993; Jensch, Fricke, 1997; Agudo et al., 2004) či polymyxinu B sulfátu (Jensch, Fricke, 1997; Ren, Thöny-Meyer, 2001; Önder et al., 2008) a postupy vedoucí k tvorbě sféroplastů působením lysozymu v kombinaci s EDTA (Wood, 1978; Copeland et al., 1982; Jensch, Fricke, 1997; Robles-Price et al., 2004; Jarchow et al., 2008; Imperi et al., 2009) či lysozymu v kombinaci s chloridem hořečnatým (Jensch, Fricke, 1997; Imperi et al., 2009).

Metoda studeného osmotického šoku byla poprvé popsána Nossalem a Heppelem (1966). K permeabilizaci vnější bakteriální membrány použili EDTA, pro stabilizaci vnitřní membrány sacharózu. Působením ledově vychlazeného chloridu hořečnatého by pak mělo dojít k osmotickému šoku a uvolnění periplazmatických proteinů do supernatantu (Nossal, Heppel, 1966). Modifikovanou metodu studeného osmotického šoku také s úspěchem použili Hiniker a Bardwell (2004) pro analýzu *in vivo* substrátové specifity periplazmatických disulfid oxidoreduktáz.

Ames et al. (1984) jako první popsali metodu pro jednoduché, rychlé a kvantitativní uvolnění periplazmatických proteinů prostřednictvím působení chloroformu, která by měla podle autorů poskytovat výsledky srovnatelné s výše popsanou metodou osmotického šoku. Proč dochází působením chloroformu k uvolnění pouze periplazmatických proteinů, však není jasné (Ames et al., 1984). Tuto metodu úspěšně využili i Judd a Porcella (1993) pro získání frakce obohacené o periplazmatické proteiny bakterie *Neisseria gonorrhoeae* a Aguda et al. (2004) pro proteomovou analýzu periplazmatických proteinů u DsbA delečního mutantního kmene bakterie *Salmonella typhi*.

Ošetření bakterií polymyxinem bylo poprvé popsáno Kimurou et al. (1992). Polymyxin může zvýšit permeabilitu vnější membrány interakcí s lipopolysacharidem, následně dojde k jeho přesunu z vnější membrány (Jensch, Fricke, 1997). Tento postup

byl využit i pro studium zrání cytochromu c u bakterie *Escherichia coli* (Ren a Thöny-Meyer 2001) nebo při analýzách bakterie *Rhodobacter capsulatus* (Önder et al. 2008).

Metodu založenou na tvorbě sféroplastů působením EDTA a lysozymu použil Wood (1978) pro potvrzení periplazmatické lokalizace terminální reduktázy u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Zatímco EDTA narušuje vnější membránu, sacharóza stabilizuje vnitřní cytoplazmatickou membránu. Lysozym rozkládá peptidoglykan, který je součástí buněčných stěn bakterií, což by mělo významně napomoci uvolnění celého obsahu periplazmatického kompartmentu. Tento postup použili i Robles-Price et al. (2004) při studiu biosyntézy alginátu, exolipopolsacharidu bakterie *Pseudomonas aeruginosa* a Jarchow et al. (2008) k identifikaci potenciálních substrátů periplazmatického chaperonu Skp u bakterie *E. coli*. V současné době je komerčně dostupný kit (PeriPreps Periplasting Kit, EPICENTRE Biotechnologies) pro uvolnění periplazmatických proteinů *E. coli*, který je založen na stejném principu.

Copeland et al. (1982) využili pro identifikaci periplazmatických proteinů bakterie *E. coli* modifikovanou metodu studeného osmotického šoku a také postup založený na tvorbě sféroplastů pomocí EDTA a lysozymu. Autoři uvádí, že studený osmotický šok zajišťuje kvantitativní uvolnění periplazmatických proteinů, ale zároveň může dojít k lýze některých buněk a uvolnění proteinů z okolních membrán. Naproti tomu metoda s použitím EDTA a lysozymu je dle jejich názoru mnohem šetrnější, poskytuje však jen malé výtěžky.

Jensch a Fricke (1997) se ve své studii pokoušeli zjistit přesnou lokalizaci dvou enzymů bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Testovali hned několik postupů z výše popisovaných postupů pro přípravu frakcí obohacených o periplazmatické proteiny. Na základě porovnání přítomnosti proteinů s prokázanou periplazmatickou a cytosolickou lokalizací došli k závěru, že nejúčinnější je metoda studeného osmotického šoku. Zjistili však, že některé proteiny vyskytující se v blízkosti vnitřní strany cytoplazmatické membrány mohou být také uvolněny do periplazmy. Další testované metody – použití chloroformu, polymyxinu, tvorba sféroplastů za použití lysozymu v kombinaci s EDTA nebo chloridem hořečnatým (ten zvyšuje propustnost vnější membrány) - nebyly tak účinné a vedly jenom k částečnému uvolnění periplazmatických proteinů. Podle autorů tyto metody slouží k izolaci pouze omezeného spektra proteinů; použití chloroformu a polymyxinu je vhodnější pro získávání frakce obohacené o hydrofobně vázané proteiny, zatímco promytí chloridem hořečnatým pro izolaci iontově vázaných bílkovin.

Ze závěru této studie vyplývá, že pro potvrzení periplazmatické lokalizace určitého proteinu je třeba aplikovat několik postupů.

Imperi et al. (2009) se zabývali studiem periplazmatického proteomu bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. K získání frakce obohacené o periplazmatické proteiny využili metodu studeného osmotického šoku, tvorbu sféroplastů za použití lysozymu a chloridu hořečnatého a tvorbu sféroplastů pomocí lysozymu a sacharózy. Poslední z výše uvedených metod byla z jejich pohledu nejúčinnější.

K přípravě frakcí obohacených o periplazmatické proteiny s následným využitím k proteomové analýze se nejčastěji využívá postup založený na tvorbě sféroplastů a uvolnění periplazmatických proteinů působením lysozymu a EDTA (Wood, 1978; Copeland et al., 1982; Jensch, Fricke, 1997; Robles-Price et al., 2004; Jarchow et al., 2008; Imperi et al., 2009). Proto jsme se v první řadě zaměřili na tento postup také v rámci naší studie. Opakování však prokázalo velmi nízkou reprodukovatelnost získaných dvourozměrných proteinových map. Důvodem by mohl být lysozym, který při přípravě vzorku zůstává v supernatantu společně s uvolněnými periplazmatickými proteiny a o jehož přítomnosti napovídá výrazná proteinová skvrna na 2-D mapách v oblasti odpovídající jeho molekulové hmotnosti i izoelektrickému bodu. Jinou příčinou by mohla být integrita vzniklých sféroplastů. Je možné, že sféroplasty u *F. tularensis* jsou nestabilní a dochází v průběhu přípravy vzorku k jejich lýze a tím i k nestandardnímu uvolňování cytosolických proteinů a znečišťování dané frakce. O této problematice se zmiňují také autoři Huntley et al. (2007) ve své studii zaměřené na dělení vnější a vnitřní membrány u *F. tularensis*. V našem případě by bylo nutné však tuto hypotézu experimentálně potvrdit, např. mikroskopickým sledováním vzniklých sféroplastů v průběhu přípravy vzorku tímto postupem.

V následující fázi jsme přistoupili k otestování čtyř dalších výše popsaných postupů, používaných k obohacení vzorků o periplazmatické proteiny: studený osmotický šok, metoda s použitím chloroformu, polymyxin B sulfátu a lysozymu v kombinaci s chloridem hořečnatým. Těmito postupy byly vždy připraveny paralelně vzorky z divokého kmene *F. tularensis* LVS 155 a mutantního kmene s delecí genu pro hypotetický lipoprotein, LVS 155Δ1103. U těchto metod byla posuzována míra obohacení u vybraných proteinů s predikovanou periplazmatickou lokalizací (podle programu PSORTb - [www.psort.org/psortb/](http://www.psort.org/psortb/)), tzv. periplazmatických markerů a to porovnáním příslušných proteinových spot na 2-D mapách periplazmatických frakcí

s celobuněčným lyzátem. Dále byly 2-D mapy posuzovány z hlediska počtu případně i charakteru nalezených rozdílných proteinových skvrn mezi vzorky získanými z divokého a mutantního kmene.

Z výše uvedených testovaných postupů se jako nejméně vhodný ukázal postup založený na tvorbě sféroplastů pomocí lysozymu v kombinaci s chloridem hořečnatým. Na získaných 2-D mapách bylo i přes standardní nanášku patrné jen malé množství proteinových skvrn, nejvýraznější pak byla skvrna, která by svou lokalizací opět odpovídala přítomnosti lysozymu ve vzorku. V tomto postupu se používá výrazně vyšší (až pětinasobná) koncentrace lysozymu v porovnání s prvním testovaným postupem založeným na aplikaci lysozymu a EDTA, což pravděpodobně mělo za následek „maskování“ a velmi slabou detekci jen omezeného množství proteinů *F. tularensis*. Na základě těchto zkušeností se jakákoliv aplikace lysozymu pro přípravu frakcí obohacených o periplazmatické proteiny u *F. tularensis* za účelem komparativní proteomové analýzy zdá být nevhodná.

V případě postupu s polymyxin B sulfátem se opakovaně nedařilo připravit 2-D mapy bazických proteinů (pH 6-11). Otázkou však zůstává, zda byl tento problém způsoben náhodou v důsledku systémové chyby v průběhu přípravy vzorku či zda je příčinou polymyxin, který opět zůstává v proteinovém vzorku a způsobuje interference v dané oblasti pH 6-11. K odpovědi by napomohlo další opakování tohoto postupu, které se však z časových důvodů nepodařilo v rámci této práce realizovat. V oblasti pH 4-7 se pak podařilo najít podstatně méně rozdílných proteinových skvrn mezi oběma analyzovanými kmeny, v porovnání s metodami osmotického šoku a chloroformu.

V případě dalších dvou postupů založených na studeném osmotickém šoku a aplikaci chloroformu se podařilo ze vzorků připravit porovnatelné 2-D proteinové mapy v oblasti pH 4-7 i pH 6-11. Oběma postupy bylo nalezeno relativně velké množství rozdílných skvrn mezi oběma kmeny. Mnohé z nich však jsou jen velmi málo intenzivní, a zda se jedná skutečně o rozdílnou tvorbu proteinů v důsledku delece daného genu pro DsbA protein je nutno potvrdit přípravou několika dalších vzorků a provedením komparativní analýzy 2-D proteinových map. Z hlediska sledování míry obohacení sledovaných periplazmatických markerů se pak zdá být účinnější metoda studeného osmotického šoku, kde došlo k výraznějšímu obohacení u čtyř ze šesti sledovaných markerů.

Metoda studeného osmotického šoku byla navíc vyzkoušena ve dvou modifikacích, které se lišily ve způsobu oddělení zbylých intaktních bakterií a sféroplastů od supernatantů s obsahem periplazmatických proteinů. V prvním případě byl tento krok proveden pouze dvojnásobnou centrifugací, v druhém postupu pak byla ještě navíc zařazena filtrace přes jednorázové filtry, která by měla jednoznačně vést k odstranění bakterií (případně sféroplastů) a tím zajistit vzorky s nižším stupněm kontaminace cytosolickými proteiny. Zařazení filtrace pak vedlo většinou k navýšení počtu detekovatelných skvrn, které byly rozdílné mezi oběma porovnávanými kmeny.

Aguda et al. (2004) se ve své proteomické studii zabývali detekcí změn ve spektru periplazmatických proteinů vlivem delece genu pro DsbA protein u bakterie *Salmonella typhi*. Absence působení DsbA proteinů může mít za následek nesprávnou konformaci některých proteinů, což ovlivňuje jejich elektroforetickou pohyblivost a nepřímo i nesprávnou lokalizaci. Standardní postupy pro dvourozměrnou gelovou elektroforézu však zahrnují i redukci prostřednictvím redukčních činidel (DTT, DeStreak aj.). Analyzované proteiny tak získávají jednotný oxidoredukční stav a mnohé očekávané změny tak mohou zůstat skryty. Z tohoto důvodu autoři prováděli 2-DE jak za standardních tak i za neredukujících podmínek, kdy nedochází k redukci disulfidických můstků na thiolové skupiny vlivem podmínek při elektroforéze, ale pouze vlivem DsbA proteinu. Za neredukujících podmínek se jim podařilo nalézt téměř trojnásobný počet rozdílných proteinových skvrn mezi divokým a mutantním kmenem v porovnání s podmínkami standardními. Ze stejného důvodu jsme se rozhodli vyzkoušet přípravu 2-D proteinových map i za neredukujících podmínek. Naše studie nepřinesla však v tomto směru jednoznačné výsledky. Počet nalezených rozdílných skvrn se většinou příliš nelišil nebo byl dokonce i nižší v porovnání s 2-D mapami připravenými za standardních redukujících podmínek. V některých případech byly i proteinové mapy jen obtížně porovnatelné, což může svědčit o problému s reprodukovatelností přípravy 2-D map za těchto podmínek a vyžaduje další opakování případně i optimalizaci postupu, která však byla již nad časový rámec této práce.

Z pěti metod testovaných v rámci této práce se jako nejvhodnější zdají být metoda studeného osmotického šoku a metoda s použitím chloroformu. V další fázi je však nutné oba postupy ještě zopakovat za účelem potvrzení a upřesnění zde uvedených výsledků. Dále je nezbytné ještě i potvrdit reprodukovatelnost obou těchto metod.



Zvolený postup pak bude použit k přípravě série vzorků z divokého i mutantního kmene pro komparativní proteomovou analýzu, která by měla vést k odhalení dalších potenciálních substrátů pro DsbA protein u *F. tularensis*. Předpokládá se, že mnohé s těchto proteinů hrají významnou roli ve virulenci a patogenezí tularemie a mohly by případně být i využity ke konstrukci účinné a bezpečné vakcíny.

## 7. ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce bylo zavést metodu pro přípravu frakce obohacené o periplazmatické proteiny bakterie *Francisella tularensis*. Tato metoda by pak mohla posloužit ke hledání potenciálních substrátů hypotetického lipoproteinu bakterie *Francisella tularensis* s homologií k DsbA proteinu.

Za tímto účelem byly vybrány postupy uvedené v dostupných literárních zdrojích, které se běžně využívají pro získání frakce obohacené o periplazmatické bílkoviny bakterií. Jednalo se o postupy s použitím chloroformu, polymyxin B sulfátu, chloridu hořečnatého a lysozymu, EDTA a lysozymu a o metodu studeného osmotického šoku.

Oba postupy využívající lysozym (v kombinaci s EDTA či chloridem hořečnatým) se z důvodu nízké reprodukovatelnosti neosvědčily. V případě metody s polymyxin B sulfátem pak docházelo k problémům se separací proteinů v bazickém rozmezí pH 6-11.

Postupem založeným na studeném osmotickém šoku a použití chloroformu se podařilo připravit porovnatelné 2-D proteinové mapy v oblastech pH 4-7 i 6-11. Na základě našich výsledků se zdá být účinnější metoda studeného osmotického šoku, která vedla k výraznějšímu nabohacení u čtyř ze šesti sledovaných periplazmatických markerů a pro nález největšího množství rozdílných proteinových skvrn. Oba postupy je však nutné ještě zopakovat a získané výsledky potvrdit.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY A ZDROJŮ

- Agudo, D., Mendoza, M. T., Castanares, C., Nombela, C., Rotger, R.: A proteomic approach to study *Salmonella typhi* periplasmic proteins altered by a lack of the DsbA thiol: disulfide isomerase. *Proteomics*, 2004, roč. 4, s. 355-363
- Ames, G. F-L., Prody, C., Kustu, S.: Simple, rapid and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.*, 1984, roč. 160, s. 1181-1183
- Bouchal, P., Kučera, I.: Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chem. Listy*, 2003, roč. 97, s. 29-36
- Conlan, J. W., Oyston, P. C. F.: Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2007, roč. 1105, s. 325-350
- Copeland, B. R., Richter, R. J., Furlong, C. E.: Renaturation and identification of periplasmic proteins in two-dimensional gels of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1982, roč. 257, s. 15065-15071
- Cordwell, S. J.: Technologies for bacterial surface proteomics. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2006, roč. 9, s. 320-329
- Foley, J. E., Nieto, N. C.: Tularemia. *Vet. Microbiol.*, 2010, roč. 140, s. 332-338, review
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M. J.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 2004, roč. 4, s. 3665-3685, review
- Griffin, K. F., Oyston, P. C. F., Titball, R. W.: *Francisella tularensis* vaccines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2007, roč. 49, s. 315-323, minireview
- Heras, B., Shouldice, S. R., Tostsika, M., Scanlon, M. J., Schembri, M. A., Martin, J. L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, roč. 7, s. 215-225, review
- Hiniker, A., Bardwell, J. C. A.: *In vivo* substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.*, 2004, roč. 279, s. 12967-12973
- Honoré, B., Østergaard, M., Vorum, H.: Functional genomics studied by proteomics. *BioEssays*, 2004, roč. 26, s. 901-915
- Huntley, J. F., Conley, P. G., Hagman, K. E., Norgard, M. V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bact.*, 2006, roč. 189, s. 561-574

- Imperi, F., Ciccocanti, F., Perdomo, A. B., Tiburzi, F., Mancone, C., Alonzi, T., Ascenzi, P., Piacentini, M., Visca, P., Fimia, G. M.: Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics*, 2009, roč. 9, s. 1901-1915
- Jarchow, S., Lück, C., Görg, A., Skerra, A.: Identification of potential substrate proteins for the periplasmic *Escherichia coli* chaperone Skp. *Proteomics*, 2008, roč. 8, s. 4987-4994
- Jensch, T., Fricke, B.: Localization of alanyl aminopeptidase and leucyl aminopeptidase in cell of *Pseudomonas aeruginosa* by application of different methods for periplasm release. *J. Basic Microbiol.*, 1997, roč. 37, s. 115-128
- Judd, R. C., Porcella, S. F.: Isolation of the periplasm of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.*, 1993, roč. 10, s. 567-574
- Łasica, A. M., Jagusztyn-Krynicka, E. K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2007, roč. 31, s. 626-636, review
- Lenčo, J., Hernychová, L.: Proteom a proteomická analýza. In *Vybrané kapitoly z molekulární patologie*. Univerzita obrany, Brno 2008. Kapitola 2.2, s. 26-47, celkem 148 stran
- Macela, A., Stulík, J., Trebichavský, I., Kroča, M., Janovská, S.: *Francisella tularensis*. In *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Grada Publishing, a.s., Praha 2006. Kapitola 3, s. 111-119, celkem 215 stran
- Nossal, N. G., Heppel, L. A.: The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J. Biol. Chem.*, 1966, roč. 241, s. 3055-3062
- Önder, Ö., Turkarslan, S., Sun, D., Daldal, F.: Overproduction or absence of the periplasmic protease DegP severely compromises bacterial growth in the absence of the dithiol:disulfide oxidoreductase DsbA. *Mol. Cell. Proteomics*, 2008, roč. 7, s. 875-890
- Oyston, P. C. F.: *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *J. Med. Microbiol.*, 2008, roč. 57, s. 921-930, review
- Straskova, A., Pavkova, I., Link, M., Forslund, A.-E., Kuoppa, K., Noppa, L., Kroca, M., Fucikova, A., Klimentova, J., Krocova, Z., Forsberg, A., Stulik, J.: Proteome analysis of an attenuated *Francisella tularensis dsbA* mutant:

Identification of potential DsbA substrate proteins. *J. Proteome Res.*, 2009, roč. 8, s. 5336-5346

- Qin, A., Mann, B. J.: Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol.*, 2006, roč. 6, s. 69
- Qin, A., Scott, D. W., Thompson, J. A., Mann, B. J.: Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect. Immun.*, 2009, roč. 77, s. 152-161
- Ren, Q., Thöny-Meyer, L. Physical interaction of CcmC with heme and the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation. *J. Biol. Chem.*, 2001, roč. 276, s. 32591-32596
- Robles-Price, A., Wong, T. Y., Sletta, H., Valla, S., Schiller, N. L.: AlgX is a periplasmic protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 2004, roč. 186, s. 7369-7377
- Sjöstedt, A.: Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2007, roč. 1105, s. 1-29
- Titball, R. W., Petrosino, J. F.: *Francisella tularensis* genomics and proteomics. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2007, roč. 1105, s. 98-121
- Thakran, S., Li, H., Lavine, C. L., Miller, M. A., Bina, J. E., Bina, X. R., Re, F.: Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 2007, roč. 283, s. 3751-3760
- Wood, P. M.: Periplasmic location of the terminal reductase in nitrite respiration. *FEBS Lett.*, 1978, roč. 92, s. 214-218

Internetové stránky:

- [www.psort.org/psortb/](http://www.psort.org/psortb/)
- <http://web.mpiib-berlin.mpg.de/>

Použité obrázky:

1. <http://www.pnas.org/content/103/39.cover-expansion>
2. [http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n12/fig\\_tab/nrmicro1045\\_F4.html](http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n12/fig_tab/nrmicro1045_F4.html)
3. [http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna\\_stena.jpg](http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna_stena.jpg)