

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI  
KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Identifikace membránově lokalizovaných peptidů nativních proteinů  
bakterie *Francisella tularensis*  
(diplomová práce)

Hradec Králové 2011

Bc. Hana Hřebíková

Děkuji Doc. Ing. Lence Hernychové, Ph.D. za velmi cenné rady při sestavování této diplomové práce, Jitce Žákové za trpělivé vedení při práci v laboratoři a také veškerému personálu Ústavu molekulární patologie v Hradci Králové, který mi vždy ochotně poradil a pomohl.

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu*

V Hradci Králové dne 15.8. 2011

Hana Hrebíková

## **Abstrakt**

Bc. Hana Hřebíková

Identifikace membránově lokalizovaných peptidů nativních proteinů bakterie *Francisella tularensis*

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Odborný pracovník v laboratorních metodách

**Cíl práce:** Cílem diplomové práce bylo vyvinout novou metodu vhodnou pro stanovení koncentrace peptidů v biologickém vzorku a identifikace membránově asociovaných proteinů bakterie *Francisella tularensis* (*F. tularensis*).

**Metody:** Odzkoušení metod bylo nejprve provedeno na standardních proteinech alfa kasein a BSA. Proteiny o známé koncentraci byly štěpeny trypsinem a koncentrace získaných peptidů byla měřena modifikovanou a nemodifikovanou metodou mikro BCA (bicinchoninic acid protein assay). Metoda pak byla aplikována na reálný bakteriální vzorek *F. tularensis* kmen FSC200. Bakteriální peptidy byly získány kultivací celých bakterií v různých časových intervalech v roztoku, který obsahoval trypsin. Tato metoda je v literatuře popisována jako „shaving“.

**Výsledky:** Pomocí nemodifikované mikro BCA byla stanovena koncentrace peptidů. Peptidy pak byly separovány HPLC a identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Správnost celého postupu dokazuje identifikace dvou bakteriálních peptidů z proteinu s názvem 17 kDa major membrane protein (ZP\_0227498).

**Závěry:** Další studium navazující na tuto diplomovou práci bude věnováno přípravě frakce obohacené o membránové proteiny metodou „shaving“ a identifikace dalších membránových proteinů *F. tularensis*.

## **Abstract**

Bc. Hana Hřebíková

Identification of membrane localized native peptides of intracellular bacteria *Francisella tularensis*

Diploma thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Specialist in Laboratory Methods

**Background:** The main goal of this diploma thesis was develop new methods suitable for assume of concentration of peptides in biological sample and identification of membrane-associated proteins of bacteria *Francisella tularensis* (*F. tularensis*).

**Methods:** Experimental development was tested on standard proteins like alfa kasein and BSA. These proteins had known concentration and they were treated by trypsin. The concentration of reached peptides were measured by modified and classic method of micro BCA (bicinchoninic acid protein assay). Method was applied on real bacterial sample of *F. tularensis* species strain FSC200. By cultivation of whole bacteria bacterial peptides were prepared. The cultivation was provided in different time intervals in solution, which contained trypsin. This method named shaving was described in literature.

**Results:** The concentration of peptides was measured by classic micro BCA method. Peptides were separated by HPLC and identified by mass spectrometry. Identification of two bacterial peptides from protein named 17 kDa major membrane protein (ZP\_0227498) confirmed right choice of used method.

**Conclusions:** The next step followed this diploma thesis will focused on preparation of membrane-reached fraction by „shaving“ method and identification of another membrane proteins of *F. tularensis*.

**Cíl (zadání) práce:**

Cílem diplomové práce bylo vyvinout novou metodu vhodnou pro stanovení koncentrace peptidů v biologickém vzorku a identifikace membránově asociovaných proteinů bakterie *Francisella tularensis* (*F. tularensis*).

## ZKRATKY

ABC – transportér, který aktivně přenáší látky za spotřeby ATP (ATP Binding Cassette)

ACN – acetonitril

ATP – adenosintrifosfát

BCA – kyselina bicinchoninová

BCG – vakcína proti tuberkulóze (Bacille Calmette Guérin)

BSA – bovinní serum albumin

C + G – cytosin + guanin

CD4+ - povrchové znaky T-lymfocytů

CFU – multipotentní kmenová buňka (Colony Forming Unit)

DTT, DTE – ditiotritol

ELISA – enzymová imunochemická metoda (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

ESI – ionizace elektrosprejem (ElectroSpray Ionization)

FA – kyselina mravenčí

FASTA – jednoduchý zápis sekvence aminokyselin při zadávání do bioinformatických databází

IAA – iodacetamid

IS – vložená sekvence (Insertion Sequence)

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

CHAPS - čistý zwitteriontový detergent (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonát)

CHCA -  $\alpha$ -kyano-4hydroxy skořicová kyselina

LC-MS/MS – on-line propojení kapalinové chromatografie a tandemového hmotnostního spektrometru (Liquid Chromatography – Mass Spectrometry/Mass Spectrometry)

LPS – lipopolysacharid

LVS – živý vakcinační kmen (atenuovaný vakcinační kmen)

MALDI-TOF – ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice – průletový analyzátor (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight)

LPS – lipopolysacharid

LVS – živý vakcinační kmen (atenuovaný vakcinační kmen)

MALDI-TOF – ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice – průletový analyzátor (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of flight)

MS – hmotnostní spektrometr

NAD – nikotinamid adenindinukleotid  
Omp – Outer Membrane Protein  
PAMPs – Pathogen Associated Molecular Patterns  
PIP<sub>2</sub> – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát  
PVDF – polyvinylidenfluorid  
RNA/DNA – ribonukleová/deoxyribonukleová kyselina  
SH – sulfanylová skupina  
SDS – dodecylsíran sodný  
SPE – extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction)  
*S. pyogenes* – *Streptococcus pyogenes*  
TCA – trichloroctová kyselina  
TFA – trifluoroctová kyselina  
SDS – dodecylsíran sodný  
TLR – povrchové receptory T lymfocytů (Toll Like Receptor)  
TRIS – hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethan  
UDP – uridindifosfát



## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>12</b>
1.1	<i>Francisella tularensis</i> .....	13
1.1.1	Charakteristika .....	13
1.1.2	Taxonomie .....	13
1.1.3	Tularémie .....	14
1.1.4	Genom <i>Francisella tularensis</i> .....	15
1.1.5	Proteom <i>Francisella tularensis</i> .....	17
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>19</b>
2.1	Membranom bakterií.....	20
2.1.1	Stavba bakteriální membrány” .....	20
2.1.1.1	Buněčná stěna .....	21
2.1.1.2	Cytoplazmatická membrána .....	22
2.1.2	Typy obecných membránových proteinů .....	22
2.1.2.1	Buněčné membrány .....	22
2.1.3	Membránové proteiny posttranslačně modifikované.....	24
2.1.4	Bioinformatické zdroje pro predikci membránově lokalizovaných proteinů .. .....	25
2.1.5	Funkce membránových proteinů .....	27
2.1.5.1	Transportní mechanismy.....	28
2.1.5.2	Enzymová výbava cytoplazmatické membrány .....	29
2.1.5.3	Imunoreaktivní membránové proteiny.....	29
2.1.6	Využití poznatků o membránových proteinech .....	30
2.2	Membranom <i>Francisella tularensis</i> .....	32
2.2.1	Bioinformatická analýza membránových proteinů <i>Francisella tularensis</i> .....	32
2.2.2	Poznatky z anotace genomu.....	33
2.2.2.1	Enzymatická výbava .....	33
2.2.2.2	Faktory virulence .....	33
2.2.3	Komparativní proteomové analýzy membranům různých kmenů <i>Francisella tularensis</i> .....	34
2.2.4	Imunoreaktivní proteiny <i>Francisella tularensis</i> .....	36
2.2.5	Konkrétní funkce membránových proteinů <i>Francisella tularensis</i> .....	37

2.3	Nástroje užívané pro analýzu membránových proteinů .....	39
2.3.1	Příprava vzorku .....	39
2.3.2	Enzymatické štěpení .....	40
2.3.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	41
2.3.3.1	Stacionární fáze.....	41
2.3.3.2	Mobilní fáze .....	41
2.3.3.3	Nástřik vzorku.....	42
2.3.3.4	Detektor .....	42
2.3.3.5	Vícerozměrná separace .....	42
2.3.4	Hmotnostní spektrometrie.....	42
2.3.4.1	MALDI-TOF .....	43
2.3.4.1.1	<i>Vstupní systémy</i> .....	43
2.3.4.1.2	<i>Iontový zdroj</i> .....	43
2.3.4.1.3	<i>Hmotnostní analyzátor</i> .....	44
2.3.4.1.4	<i>Detektor</i> .....	45
2.3.4.2	ESI .....	45
2.3.4.2.1	<i>Iontový zdroj</i> .....	45
2.3.4.2.2	<i>Hmotnostní analyzátor</i> .....	46
2.3.5	Stanovení koncentrace bílkovin v biologickém vzorku.....	46
2.3.6	Identifikace proteinů v roztoku hmotnostní spektrometrií .....	47
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>49</b>
3.1	MATERIÁL.....	50
3.1.1	Biologický materiál: .....	50
3.1.2	Přístroje a pomůcky: .....	50
3.1.3	Chemikálie: .....	51
3.1.4	Roztoky, pufrý: .....	52
3.1.5	Software: .....	53
3.2	Příprava vzorku.....	54
3.2.1	Redukce disulfidových můstků a alkylace SH skupin.....	54
3.2.2	Odsolení na kolonách OASIS .....	54
3.2.3	MicroBCA assay .....	54
3.2.4	Ověření enzymatického štěpení standardních vzorků .....	56

3.2.5	Kultivace bakterií <i>F. tularensis</i> s/bez trypsinu a měření koncentrace peptidů uvolněných do supernatantu .....	56
3.2.6	Identifikace peptidových fragmentů „gel free“ metodami .....	57
3.2.6.1	HPLC .....	57
3.2.6.2	Hmotnostní spektrometrie.....	58
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>78</b>

# 1 ÚVOD

## 1.1 *Francisella tularensis*

### 1.1.1 Charakteristika

*Francisella tularensis* (*F. tularensis*) je Gram-negativní intracelulární kokobacil, způsobující onemocnění tularémií. Díky nízké infekční dávce, vysoké virulenci a velmi snadném přenosu na člověka je o ní možné hovořit jako o jedné z nejinfekčnějších bakterií. Z těchto důvodů byla *Francisella* zařazena do kategorie A bojových biologických agens. Nejčastější způsob nákazy je při manipulaci s infikovanými zvířaty [1].

První zmínky o tularémii se datují rokem 1911, kdy byla popsána McCoyem. Její název je odvozen od místa objevu, údolí Tulare v Kalifornii. O tři roky později byl popsán další případ tularémie po styku s infikovanými králíky. Tularémie byla zpočátku nazývána jako deer-fly fever a glandulární typ horečky po kousnutí klíštětem, a to z důvodu možnosti přenosu a klinických symptomů. V roce 1921 se Edwardu Francisovi podařilo vyizolovat původce tularémie a na jeho počest byla bakterie pojmenována, *F. tularensis*.

### 1.1.2 Taxonomie

Z taxonomického hlediska ji řadíme do třídy *Gammaproteobacteria*, řádu *Thiotrichales*, čeledi *Francisellaceae* a rodu *Francisella* [2]. *F. tularensis* má vzdálenou patogenní příbuznost s *Coxiella burnetti* nebo *Legionella pneumophila*. Druh *F. tularensis* můžeme dále rozdělit (podle geografického rozšíření, patogenity a virulence) do 3 poddruhů:

- *F. tularensis* subsp. *tularensis* (subtyp A) – primárně se vyskytuje v Severní Americe a je vysoce virulentní agens pro člověka (infekční dávka je méně než 10 CFU) a vede k život ohrožujícímu stavu, pokud se jedná o pulmonální formu a není léčena antibiotiky.

- *F. tularensis* subsp. *holarctica* (subtyp B) – tento typ se vyskytuje hlavně na evropském kontinentu. Má menší infekční dávku a způsobuje mírnější formu tularémie. Eigelsbach a Dowsonová z komerční sovětské vakcíny *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen EG-15 oslabený kmen, který byl základem pro přípravu amerického živého vakcinačního kmene LVS (live vaccine strain). Tento kmen byl používán k ochraně pracovníků bakteriologických laboratoří v USA.

- *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* (subtyp B) – vyskytuje se především v oblasti Asie a ve státech náležících bývalému SSSR. Opět způsobuje mírnější formu tularémie.

- *F. tularensis* subsp. *novicida* – se používá především v laboratořích pro výzkum, a to díky jejím téměř nepatogenním vlastnostem vůči člověku a dobré genové ovladatelnosti. Je patogenní pro myši a zajíce, u kterých způsobuje onemocnění s podobným průběhem jako u lidí.

Tyto poddruhy mají společný genetický základ, virulenci, schopnost produkovat kyselinu z glycerolu a také citrulin uridasovou aktivitu.

### 1.1.3 Tularémie

Tularémie, jinak označována jako zaječí horečka, je zoonotické onemocnění, které je přenášeno především malými hlodavci, členovci a hmyzem. Poslední studie ukazují na důležitost jednobuněčných organismů, které jsou rezervoárem pro vznik epidemiologické nákazy [3]. Přenos tularémie ze zvířete na člověka je zprostředkován stykem s nakaženými zvířaty, sáním klíšťaty, pobodáním hmyzu, ale také po konzumaci kontaminované vody či jídla.

Vstupní cestou infekce může být poraněná kůže, spojivkový vak, plíce a zažívací trakt. Po uplynutí 3 až 6 dnů od nákazy se začínají projevovat první symptomy, které se odvíjejí od vstupní brány infekce. Ve většině případů (90 %) se jedná o tzv. ulcerogladulární formu, kdy infekce do těla pronikla přes kůži nebo sliznici. Vyskytuje se nejčastěji po manipulaci s nakaženým zvířetem. V místě vstupu se utvoří tzv. primární komplex, charakterizovaný oděrkou na rukou a zvětšením regionálních uzlin. Jestliže se přenos uskutečnil prostřednictvím klíštěte, místo primárního komplexu je v souvislosti s oblastí přisátí klíštěte. Další formou je forma okulární. Místem přenosu je spojivkový vak, kam se agens dostane díky aerosolu, který vzniká při manipulaci s infikovaným zvířetem, případně při promnutí oka rukou. Méně častějšími jsou tzv. vnitřní formy – abdominální a pulmonální. Abdominální forma vzniká při požití kontaminované vody či potravy. Primární komplex je přítomný v místě Peyerových plaků. Dříve byla tato forma letální. Jestliže vstupní branou jsou plíce, jedná se o tzv. plicní tularémii, která je nejzávažnějším typem s nejhorší prognózou. Klinickými projevy zprvu připomíná chřipku, bronchitidu či pneumonii. Primární komplex se nachází v horních nebo dolních cestách dýchacích. Tato forma se statisticky vyskytla pouze v 5 % případů.

Klinické projevy mívají v první fázi podobný obraz jako chřipka. Dostavují se vysoké horečky se zvětšením regionálních lymfatických uzlin, bolesti hlavy a kloubů, v pozdější fázi pacient trpí bolestmi na hrudi, které jsou způsobeny rozšířením mikroba do plic a vznikem sekundární pneumonie. Z plic se infekce šíří do jater a sleziny. Místo vstupu infekce bývá ohraničeno otevřeným vředem, jehož plné vyléčení může trvat až 3 roky. Rekonvalescence je velmi dlouhá a důsledky onemocnění v podobě vegetativní nerovnováhy se mohou projevovat po řadu let. Prognóza pro všechny typy tularémie je vcelku příznivá, jestliže dojde k včasnému залечení antibiotiky (streptomycin, jednorázově gentamycin, doxycyklin, spiramycin).

Diagnostika se sestává ze zhodnocení klinických příznaků, epidemiologické anamnézy a laboratorních vyšetření (hematologie, biochemie a především mikrobiologie). Nejcitlivějším průkazem *F. tularensis* je biologický pokus na zvířeti, kdy po 2 – 3 týdenní kultivaci je možné izolovat mikroba z místa primárního komplexu. Pro diagnostiku je možno také použít tzv. tularinový test, který spočívá v intradermální aplikaci 0,1 ml suspenze usmrcených mikrobů a po 48 hodinách odečítáme případnou kožní hypersenzitivitu [4].

#### **1.1.4 Genom *Francisella tularensis***

Přehled 46 projektů, zabývajících se sekvenací genomu *F. tularensis* různých kmenů lze nalézt v databázi GenBank [5]. Kompletní sekvence genomu *F. tularensis* kmen SCHU S4 je uvedena na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ749949> [6].

Řetězec cirkulárního chromozomu SCHU S4, jež je znázorněn na obrázku č.1, je tvořen 1 892 819 páry bazí. Zastoupení G+C bazí (guanin a cytosin) je z 32,9 %. Tento nízký počet je charakteristický pro malé bakteriální genomy. V genomu bylo odhaleno 1 804 kódujících sekvencí. Kódující sekvence zaujímají 79,4 % v genové výbavě. Bylo identifikováno 302 unikátních genů z celkového počtu 1 281 genů. Většina genomu je homologní ke  $\gamma$  – probakteriálnímu genomu. V genomu byly nalezeny duplikované regiony, které nejsou homologní k žádné genové sekvenci uložené v GenBank databázi. Hypotetické proteiny kódované těmito sekvencemi mají nízký obsah G+C bazí. V těchto sekvencích nebyly žádné insertované elementy nebo rRNA geny, které jsou typické pro ostatní malé bakteriální genomy. Později byly popsány jako ostrovy patogenicity.

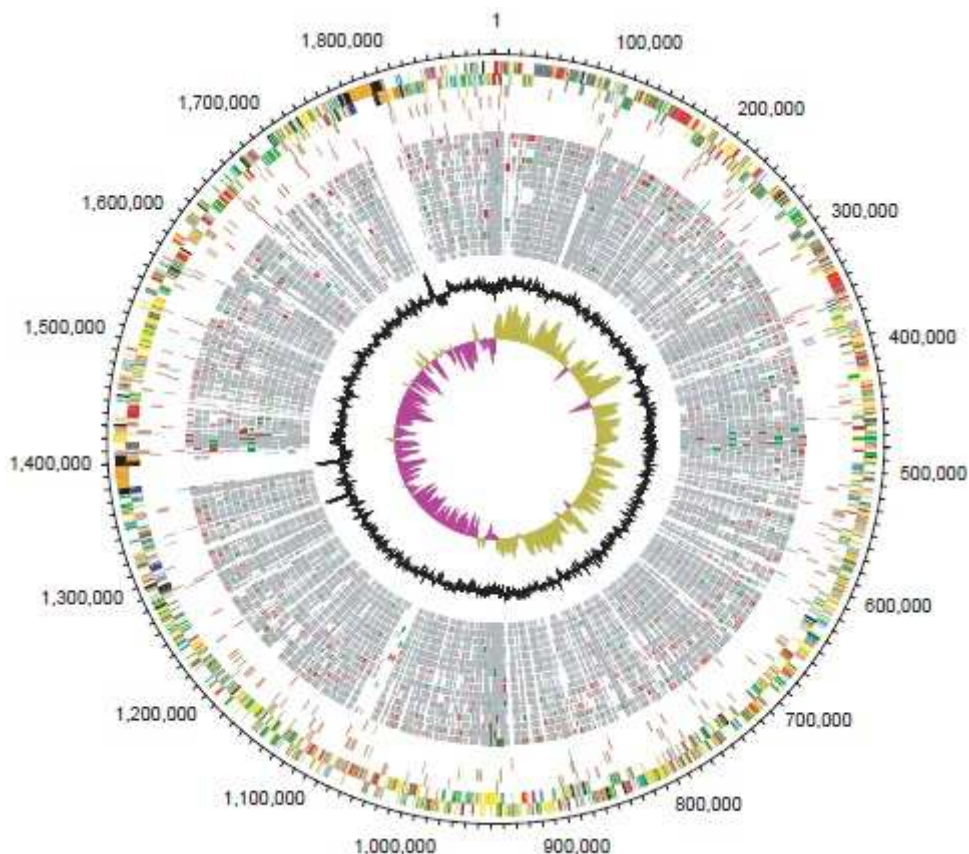
Ostrovky patogenicity jsou tvořeny skupinou 16 – 19 genů, jejichž proteinové produkty pomáhají bakterii při růstu uvnitř fagosomu. Ukázalo se, že tyto geny jsou regulovány vnějším prostředím, jako je množství železa, peroxidu vodíku atd. Tyto ostrovky patogenicity obsahují operon *iglABCD*, který je nezbytný pro intracelulární růst. Jestliže dojde k eliminaci tohoto operonu, je bakterie výrazně oslabena. V kmeni *F. tularensis* subsp. *tularensis* je tato skupina genů duplikovaná v porovnání s méně virulentním subsp. *novicida*, kde se nalézá pouze v jediné kopii [1].

Studie Larssona a Oystona et al. [7], zabývající se proteiny, ležícími na ostrově patogenicity, neobjevila přesnou funkci těchto proteinů. Je ovšem velká pravděpodobnost, že se jedná o signální proteiny a dvojitě svinuté domény. Bohužel podle strukturního uspořádání bylo možné predikovat pouze funkci, ne však identifikovat proteiny.

Genom obsahuje velké množství IS elementů, což jsou krátké DNA sekvence, chovající se jako transpozony. Byl objeven IS630 Tc-1 transpozon, který není typický pro výskyt v prokaryotních organismech. Předpokládá se, že jeho existence ve *F. tularensis* genomu, je podmíněna jeho přenosem z infikovaných hmyzích vektorů. Jedna kopie IS630 byla nalezena v O-antigenu stejně jako je tomu u *Shigella sonnei*. Tento element zde hraje zásadní roli pro virulenci a předpokládá se podobná funkce i u *F. tularensis* [7].

Více než 10% kódujících sekvencí jsou pseudogeny či fragmenty genů, které jsou výsledkem evolučního vývoje. Pseudogeny jsou v mnohém podobné struktuře pseudogenů jiných patogenů jako je *Bordetella pertusis* nebo *Yersinia Pestis*. Ovšem některé pseudogeny jsou charakteristické pouze pro *F. tularensis* a patří sem geny, exprimující proteiny zapojené do transportních mechanismů, metabolismu DNA nebo aminokyselinového metabolismu. Byla identifikována skupina genů, které by mohly kódovat polysacharid k lipopolysacharidu O, což společně s objevenými geny *capB* a *capC* můžeme nalézt u příbuzné bakterie *Bacillus anthracis*. [7]





Obrázek č.1: Mapa cirkulárního genomu *F. tularensis* kmen SCHU S4. Obrázek je převzat z publikace Larsson et.al, 2005 [7].

### 1.1.5 Proteom *Francisella tularensis*

Proteomika je obor, který se zabývá studiem proteomu, což je soubor všech proteinů v organismu. Je expresí genové výbavy organismu zahrnující posttranslační modifikace a alternativním splicingu RNA [8]. Genom a proteom nelze hodnotit jako homologní subjekty, jelikož vzniklý protein po proteosyntéze prodělává různé biochemické a strukturní modifikace, které určí jeho funkci, strukturu, lokalizaci a další vlastnosti typické pro danou nově vzniklou bílkovinu. Proteomové studie se také zabývají proteiny, které indukují imunitní odpověď organismu. Tomuto odvětví se věnuje imunoproteomika a výsledky těchto studií jsou využity při vývoji nových vakcinačních látek [9].

Jelikož dosud nejsou známy mechanismy patogenicity *F. tularensis*, předmětem zájmu v proteomických studiích jsou především proteiny, jež by se mohly těmto mechanismům účastnit. Mezi faktory virulence patří například pili IV protein, ClpB protein a IglC protein, ležící na ostrově patogenicity. Regulace těchto genů je uskutečněna prostřednictvím MglA (Macrophage Growth Locus A) [10]. Funkčně jsou tyto proteiny

součástí bakteriálního pouzdra, mají sekreční funkce, umožňují rozpoznání hostitelské buňky, případně pomáhají adhezenci. Důležitou úlohou těchto proteinů je také přežití uvnitř makrofágů (hostitelské buňky). Prostředí fagosomu je pro *F. tularensis* místem jejího růstu a množení se. Tuto funkci zajišťují IglC a ClpB proteiny.

Zastoupení jednotlivých proteinů v bakterii závisí na subtypu a vnějších podmínkách, ve kterých se nachází. Například humánně avirulentní subsp. *mediaasiatica* a *novicida* mají odlišnou proteomovou výbavu ve srovnání s virulentními subtypy *holarctica* a *tularensis*. Byly prováděny také studie, zabývající se změnami proteinového zastoupení při oxidačním stresu, který byl vyvolán působením peroxidu vodíku. Tato situace měla za následek zvýšené množství chaperonů, jako jsou GroEL, DnaK a stresové proteiny ClpB a SodB [9].

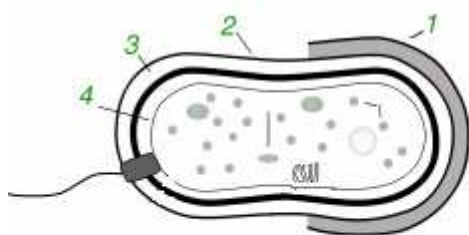
## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

## 2.1 Membranom bakterií

Bakteriální membrána obsahuje tzv. „nebezpečné vzory“, které jsou rozeznávané buněčnými složkami přirozené imunity. Mezi nebezpečné vzory patří všechny solubilní a buněčné mikrobiální struktury odlišující se od struktur eukaryotních. Výjimku tvoří molekulové vzory mikrobů, které nepředstavují pro člověka nebezpečí (přirozená mikroflóra). Na rozdíl od PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), u kterých jsou molekulové vzory spojené s patogenními mikroorganismy [17]. Mikrobiální PAMPs jsou rozeznávány buněčnými membránově vázanými strukturami nebo solubilními molekulami využívanými při přirozené imunitní odpovědi. Klíčovým PAMP je LPS, především jeho složka glykolipid, který velmi dobře aktivuje vznik zánětové reakce organismu. Dalším významným PAMPs jsou bakteriální lipoproteiny, nacházející se v membráně. Biologické působení lipoproteinu je způsobeno cysteinovým zbytkem v N-terminální části molekuly, na který je navázán lipid.

### 2.1.1 Stavba bakteriální membrány

Stavba bakteriální membrány je zásadní pro obecné dělení bakterií na Gram-pozitivní a Gram-negativní. Membrána Gram-negativních bakterií je odlišná ve stavbě, která je znázorněna na obrázku č.2



- 1- kapsula, 2 - vnější membrána  
3 - periplasmatický prostor, 4 - vnitřní membrána

Obrázek č. 2: Stavba Gram-negativní bakterie. Obrázek je převzat z wikipedie [11].

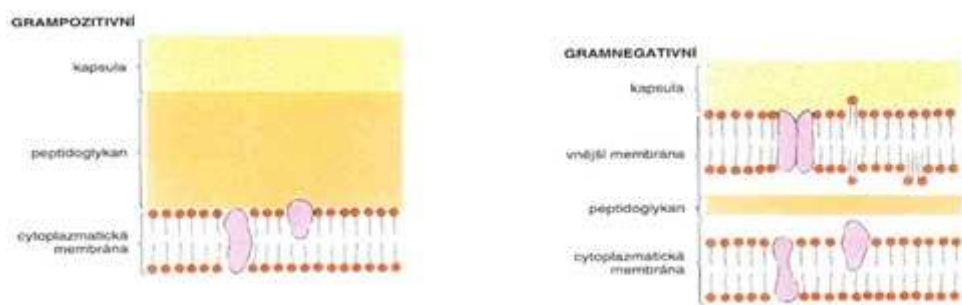
Na povrchu Gram-negativní bakterie může být slizovitý obal, tzv.glykokalyx [12], který umožní bakterii přichytit se lépe na hostitelskou buňku. Glykokalyx je tvořen z glykoproteinů a proteoglykanů. Bakterie se mohou svými pouzdry adherovat na různé povrchy a tvořit s ostatními bakteriemi minikolonie, které jsou velmi odolné při působení

antibiotik i obranným mechanismům imunitního systému. Glykokalyx vytváří např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* a *Bacteroides* [13].

Dalším ochranným prvkem je bakteriální pouzdro, které u virulentních bakterií přispívá k jejich invazivitě. Protilátky tvořené imunitním systémem nepronikají pouzdrem. Navíc je bakterie chráněna proti fagocytóze monocytomakrofágovým systémem. Je tvořeno polysacharidy a polypeptidy. Nalezáme jej u Gram-pozitivních bakterií například u *Streptococcus mutans* a *pneumoniae* [14].

### 2.1.1.1 Buněčná stěna

Nejvyšší vrstvou bakteriální buňky je buněčná stěna, která udává bakterii její specifický tvar. Buněčná stěna se účastní dějů při dělení buňky, kdy vytvoří septum, které oddělí nově vzniklé dceřiné buňky. Nejdůležitější částí buněčné stěny je peptidoglykan, který buněčné stěně zaručuje pevnost. Peptidoglykan (murein nebo mukopeptid) se skládá z vrstev polysacharidových řetězců pospojovaných napříč krátkými peptidy. Peptidoglykan obsahuje střídavě 2 cukry, a to N-acetylgalaktosamin a N-acetylmuranovou kyselinu. Gram-pozitivní a Gram-negativní bakterie se odlišují stavbou buněčné stěny, jak je znázorněno na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Rozdíl mezi Gram-pozitivní a Gram-negativní buněčnou stěnou. Obrázek je převzat z internetového odkazu biomach.cz [15].

U Gram-pozitivní bakterie je stěna jednodušší a je tvořena mohutnou vrstvou peptidoglykanu, v níž jsou vrstvy polysacharidů uloženy nad sebou. Kolmo k povrchu buňky probíhají řetězce kyseliny lipoteichoové, což je polymer ribitolu a glycerolu. Díky jednodušší stavbě stěny propouští snadněji komplex krystalové violeti s jodem, který se naváže na vnitřní struktury a po následném odbarvení pomocí ethanolu je bakterie modře zbarvená.

Gram-negativní bakterie mají svou stěnu tvořenou zevní membránou a pod ní se nachází peptidoglykan. Díky této složitější struktuře se po Gramově barvení jeví tyto bakterie jako červené, a to díky zadržování komplexu krystalové violeti s jodem. Peptidoglykan obsahuje kyselinu diaminopimelovou, která je součástí periplasmatického prostoru [14]. Zevní membrána je analogem pro cytoplazmatickou membránu a obsahuje fosfolipidy, lipopolysacharidy a bílkoviny. Bílkoviny mohou vytvářet kanálky, kterými prostupují živiny do periplasmatického prostoru. Jednou ze složek je i lipopolysacharid A (endotoxin), který je specifický pro danou bakterii a je rozpoznáván imunitním systémem. Ten na přítomnost lipopolysacharidů odpovídá vytvořením protilátky. V periplasmatickém prostoru se nacházejí bílkoviny, umožňující štěpení některých antibiotik, např. beta-laktamasy [16].

### **2.1.1.2 Cytoplazmatická membrána**

Cytoplazmatická membrána je složena z dvojvrstvy fosfolipidů a má charakter tekuté mozaiky. Jsou zde zanořeny i bílkoviny, které slouží k transportu živin do bakteriální buňky, v respiračních pochodech (nahrazuje funkci mitochondrií), k sekreci látek z cytoplazmy do zevního prostředí, a také zde nalezneme bílkoviny, jež jsou součástí rotoru bičků

## **2.1.2 Typy obecných membránových proteinů**

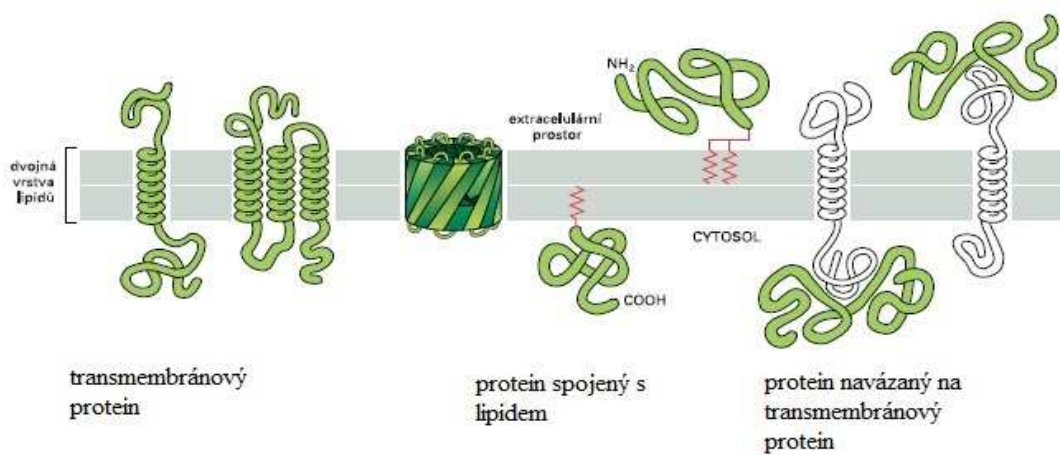
Funkce biologických membrán zahrnují především transport živin a odpadních látek vně nebo dovnitř buňky. Dále se na nich mohou vyskytovat různé enzymy, zajišťující biochemické pochody buňky, např. enzymy oxidativní fosforylace umístěné na mitochondriální membráně.

### **2.1.2.1 Buněčné membrány**

Přestože jsou v buněčných membránách více zastoupeny lipidové složky, specifické funkce zajišťují bílkovinné součásti. Proteiny v membránách mají kromě transportu specifických živin, metabolitu či iontů přes lipidovou dvojnou vrstvu celou řadu dalších úkolů. Některé ukotvují membránu k makromolekulám na jedné či druhé straně. Jiné

fungují jako receptory, které detekují chemické signály v okolí buňky a předávají je dovnitř buňky, a další pracují jako enzymy, které katalyzují specifické reakce.

Proteiny, jež jsou připojeny k membráně přímo (transmembránové nebo lipoproteiny) se nazývají integrální bílkoviny. Ostatní jsou tzv. periferní proteiny a mohou být hydrofóbní doménou zanořeny do dvojvrstvy lipidů, mohou procházet celou membránou (transmembránové), jsou připojené na lipidovou složku nebo jsou vázány na transmembránový protein [17]. Začlenění proteinů do membrány je znázorněno na obrázku č. 4.



Obrázek č.4 : Začlenění membránových proteinů do lipidové dvojvrstvy. Obrázek je převzat z publikace Alberts et al., 1998 [17].

Integrální proteiny jednou či několikrát prostupují buněčnou membránu, přičemž svoji hydrofilní část molekuly mají orientovanou vně membrány, kdežto hydrofóbní část je směřována dovnitř buňky. Jedná se především o receptory, jejichž funkcí je nejčastěji buněčná signalizace a transport. Mezi integrální bílkoviny patří také glykoproteiny, jejichž glykanová část je lokalizována vně buňky. Glykoproteiny a glykolipidy vytvářejí glykokalyx, který hraje důležitou roli při interakcích buňky s vnějším prostředím [18]. Mezi nejznámější integrální proteiny se řadí akvaporiny, aniontové kanály, glykoforiny a různé typy receptorů.

Periferní proteiny membrán jsou napojeny k integrálním proteinům prostřednictvím vodíkové vazby či elektrostatických sil. Stejným způsobem jsou připojeny i k polárním lipidovým hlavám. Periferní proteiny jsou asi ze dvou třetin tvořeny aminokyselinami s hydrofilními nebo neutrálními zbytky aminokyselin. V menší míře jsou zastoupeny aminokyseliny s hydrofóbními zbytky [19].

### 2.1.3 Membránové proteiny posttranslačně modifikované

Posttranslační modifikace proteinů je úprava proteinů po jejich nasyntetizování ribozomem. Proteiny mohou být modifikovány během jejich syntézy (kotrasmace) nebo i po ní. Posttranslační modifikace dodávají proteinům nové vlastnosti, například stabilizují jejich konformace (např. pomocí chaperonů), pomáhají regulovat jejich funkce, přispívají k imunitnímu rozpoznávání.

Nejčastější posttranslační modifikací u prokaryot je odpojení formylové skupiny N-terminálního methioninu enzymem deformylasou [53]. Aby byly peptidy chráněny proti vlivu aminopeptidáz, probíhá acylace. Pro membránové proteiny je typickou úpravou po proběhlé translaci myristilace, která modifikuje N-terminální glycin. Touto cestou jsou modifikovány i signální peptidy. Na konečnou funkci proteinu má však největší vliv fosforylace a glykosylace.

Fosforylace je enzymově katalyzovaná tvorba esterů, amidů či anhydridů kyseliny fosforečné. Nejčastějším způsobem je přenos zbytku kyseliny fosforečné z ATP na substrát. Zanesení nabitě a relativně veliké fosfátové skupiny na protein může výrazně ovlivnit jeho konformaci, a tím i jeho funkce. Fosforylace / defosforylace proteinů se často používá jako přepínač mezi aktivní a neaktivní (či jinak aktivní) formou proteinu. Kinasy i fosfatasy jsou proto součástí mnoha signalizačních drah. Díky těmto modifikacím vznikají různé varianty aminokyselin, které neřadíme do tzv. „dvaceti standardních aminokyselin“, ale pro fungování organismu hrají důležitou roli. Fosforylace ovlivňují biologickou aktivitu proteinů, jejich stabilitu, konformaci i lokalizaci v buňce, zajišťují regulační mechanismy a jsou nezbytné při buněčném dělení, kdy porucha ve fosforylaci aminokyselin resp. proteinů může vést až k nekontrolovatelnému buněčnému dělení. Fosforylace je důležitá pro aktivaci či inhibici enzymů a receptorů, je důležitým regulátorem translace, transkripce a metabolických drah. V eukaryotních organismech dochází k fosforylaci běžně na aminokyselinách s volnou –OH skupinou postranních řetězců, tedy na tyrosinu, serinu a threoninu. Přičemž výskyt fosforylace na serinu a threoninu je častější než na tyrosinu. U prokaryot může k fosforylaci docházet také na histidinu, aspartátu a glutamátu. Je-li fosforylován histidin, vzniká vysoce nestabilní fosfohistidin [20].

Glykosylace vzniká připojením glykanu k polypeptidu. Sacharidové zbytky jsou nejčastěji připojovány na serin/ threonin – v případě tzv. O-glykoproteinů, nebo asparagin v případě N-glykoproteinů. Navázání sacharidů může stabilizovat konformaci proteinů.



Sacharidové složky mnoha proteinů se účastní rozpoznávacích interakcí (protein-sacharidové a nově objevené sacharid-sacharidové interakce). N-glykosylace u eukaryotních systémů probíhá ko-translačně. UDP-aktivované cukry jsou přiváděny dolicholem do membránového systému, kde je navázán fosforylací. V prvním stupni přechází tento komplex do endoplazmatického retikula, druhý stupeň probíhá v Golgiho aparátu, kde již vznikají konečné produkty manosového nebo komplexního typu. Tato modifikace má přímý vliv na funkčnost biologicky aktivních látek, ať to jsou glykoproteiny buněčné stěny nebo sekreční proteiny. Glykoproteiny mohou být například lektiny, stěnové proteiny, lysosomální enzymy, cytokiny, bílkoviny matrix, membránové nebo receptorové proteiny. Syntéza O-glykoproteinů začíná vznikem monosacharidové matrix, vázané na dinukleotid. Takto aktivované monosacharidy vycestovávají do endoplazmatického retikula a posléze do Golgiho komplexu. Posledním krokem je navázání celého komplexu na protein pomocí specifických glykosyltransferas. Nejčastěji se připojují dvě molekuly N-acetylgalaktosaminu na serin nebo threonin. Do O-glykosylovaných proteinů patří například arabinogalaktany, proteiny bohaté na hydroxyprolin, RNA polymeráza II nebo extensiny [21].

#### **2.1.4 Bioinformatické zdroje pro predikci membránově lokalizovaných proteinů**

Bioinformatika spojuje informační technologie s biologickými vědami. Díky této kombinaci je možno studovat pomocí počítačového vybavení různá biologická data, která se dají mezi sebou srovnávat, analyzovat, případně jakýmkoliv způsobem zpracovávat.

Konečným cílem bioinformatiky je odhalení bohatství biologické informace ukryté v množství dat. Pro snadný uživatelský přístup je snahou tvůrců těchto databází, aby splňovaly požadavky jako je přehledné uchovávání dat, tvorba algoritmů a statistických výpočtů pro ujasnění vztahů mezi daty a především použití těchto databází pro různé typy biologických dat, ať už je to RNA, DNA nebo proteiny.

Pro studium proteinů se využívají, jak primární databáze, tak sekundární databáze. Nejjednodušší primární databáze shromažďují sekvence nukleotidových bazí, které lze převést na proteinové sekvence. Mezi primární databáze patří **UniProt** (the Universal Protein Resource) a **NCBI**nr (National Center for Biotechnology Information). UniProt

databáze se skládá ze dvou sekcí (1) **SwissProt** obsahující manuálně anotované proteinové sekvence a (2) **TrEMBL**, který je anotován jen automaticky [22].

Podrobnější data lze tedy nalézt ve SwissProt databázi přístupné na adrese <http://www.expasy.ch/sprot>. Úzce spolupracuje s EMBL a společně vytvářejí TrEMBL, také proteinovou databázi. Tyto dvě databáze dohromady pokrývají všechny "existující" či "smysluplné" proteinové sekvence. Do databází jsou průběžně doplňovány nové informace. V současné době se pravděpodobně jedná o nejkvalitnější molekulárně-biologické databáze. Pro vědecké účely jsou SwissProt i další uvedené databáze volně k dispozici.

**PIR** (Protein Information Resource) je rovněž primární databáze, která je organizována podobně jako GenBank (vyhledávají publikované DNA sekvence). S dalšími organizacemi vytváří PIR-International. Tato databáze je analogická k SwissProtu a je přístupná na adrese <http://www-nbrf.georgetown.edu> [23].

Sekundární databáze (např. COG, Interpro) vznikají z databází primárních, a to pomocí mnohočetného porovnávání (multiple alignment) homologních sekvencí pro zachycení konzervovaných oblastí. Tím se proteiny zařadí do tzv. rodu.

Databáze **COG** (Cluster of Orthologous Groups of proteins) pracuje na základě vyhledávání fylogenetických charakteristik proteinů, které byly získány z kompletních genomů. Každá skupina uvedená v databázi COG obsahuje jen orthologní proteiny (tj. proteiny, které plní stejnou funkci v jiném organismu). Cílem této sekundární databáze je studium evoluce genů a funkční anotace nově nalezených genů. Program je přístupný na stránce <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/> [24]. **Interpro**, <http://www.ebi.ac.uk/interpro/> [54], je integrovaný zdroj dokumentace o proteinových rodinách, doménách a funkčních místech. Metody rozeznávající sekvenční signatury mají různé optimum použití díky rozdílným principům a vlastnostem algoritmů. Pro nejlepší výsledek je proto ideální kombinace všech metod. Interpro kombinuje výhody programů PROSITE, PRINTS, Pfam, ProDom, SMART, TIGRFAMs, PIRSF, SUPERFAMILY, GENE3D a PANTHER. Tyto „poddatabáze“ umožňují porovnávat data proteinových sekvencí; sekvenční matrice; data z fingerprint mapování, u kterých jsou aplikovány poznatky z PSSMs (Position Specific Sequence Matrices); případně pracují na základě skrytých Markovových modelů.

**Signal P 3.0** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [25], patří mezi predikční programy, sloužící k predikci sekrečních a signálních proteinů. Pracuje na principu dvou prediktorů založených na neural work a na skrytých Markovových modelech. Jejich cílem je porovnávání aminokyselinové sekvence s místy štěpení této sekvence různými enzymy. Dalším z predikčních programů je **LipoP**, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) [26],

který sleduje různé lipoproteiny a zkoumá jejich funkce. Sekvence v tomto bioinformatickém zdroji jsou vkládány ve FASTA formátu, který zapisujeme jako řádek nukleotidových bází, na jehož začátku musí být vždy znaménko >. Tento algoritmus slouží k nalezení podobných sekvencí zadané sekvence se sekvencemi v databázi. Hlavní myšlenkou je, že lipoproteiny jsou štěpeny lipoprotein signální peptidázou (Lsp). Místo štěpení se nazývá signální sekvence a je rozdělena do tří oblastí: *n-region* (obsahuje kladné aminokyseliny), *h-region* (jsou zde hydrofóbní aminokyseliny), *c-region* (obsahuje čtyři aminokyseliny, které jsou kolem místa štěpení – lipobox). Tato databáze umí identifikovat lipoproteinové signální peptidy, cytoplazmatické proteiny, místa štěpení signálních peptidy. Pro predikci lokalizace proteinu v buňce využíváme software **PSORT-B**, <http://www.psort.org/psortb/> [55], který informuje o možné lokalizaci proteinu v buňce a je důležitým nástrojem pro genomovou anotaci a farmakologický výzkum. PSORT-B analyzuje proteinové sekvence na složení aminokyselin, zkoumá podobnost proteinů o známé lokalizaci, přítomnost signálního peptidu, na transmembránové helixy a na motivy korespondující se speciální lokalizací. Do predikčních programů náleží také **SecretomeP**, (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) [60], a **TMHMM** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) [27]. Obě tyto databáze pracují na stejném principu, a to na skrytých Markovových modelech.

### 2.1.5 Funkce membránových proteinů

Proteiny mají v bakteriální buňce rozlišné uplatnění. Podle jejich funkce se dělí na:

- **strukturní**, které zajišťují udržení tvaru a podílí se na výstavbě cytoskeletu, tvoří membrány organel a biomembrán
- **katalytické**, jejichž funkcí je udržení homeostázy v buňce, a to prostřednictvím enzymové a hormonální výbavy buňky
- **transportní**, které mají za úkol přenos různorodých látek mezi vnitřní a vnější prostředí buňky
- **pohybové**, jež umožňuje pohyb bakterie
- **obrné**, které obsahují skladbu specifických proteinů. Na tyto proteiny reaguje imunitní systém tvorbou specifických protilátek [28].

### 2.1.5.1 Transportní mechanismy

Membránový přenos látek obstarávají především transmembránové proteiny. Transport probíhá buď po koncentračním spádu, kdy hovoříme o tzv. pasivním transportu, který nevyžaduje přísun energie v podobě ATP. V tomto případě slouží proteiny jako kanály, kterými přenášené látky „protékají“ na opačnou stranu membrány. Rychlost tohoto přenosu závisí na velikosti transportované molekuly; přesto se většinou jedná o nízkomolekulární látky jako jsou ionty a voda. Selektivita kanálů pro přenášené látky je dána průměrem transportovaných částic a elektrickým nábojem aminokyselin, tvořících vnitřní část kanálu. Kanály mohou být buď stále otevřené (příkladem jsou akvaporiny, řídící přenos vody z/do buňky) nebo vrátkové (přenášejí především ionty a jejich průchodnost je určena elektrickými, metabolickými nebo chemickými stimuly). Počet a poloha jednotlivých kanálů se dynamicky mění vzhledem k metabolické potřebě buňky. Tento typ přenosu již vyžaduje dodání energie v podobě ATP. Jedná se o aktivní transport [29].

Aktivní transport je zajištěn membránovými proteinovými přenašeči. Tyto přenašeče, tzv. pumpy, specificky váží přenášené částice a změnou konformace se uskuteční transport na druhou stranu membrány. Samotný přenos může být dvojího druhu. Primární transport vyžaduje přímé dodání energie prostřednictvím hydrolytického rozkladu makroergické vazby v molekule ATP. Tento mechanismus se uplatňuje u sodno-draselné pumpy, vodíkové pumpy a vápníkové pumpy. Sekundární transport, nebo jinak zvaný spřažený transport, transportuje molekuly proti koncentračnímu spádu a kinetická energie jedné částice je využívána pro přenos druhé částice. Tyto částice mohou být přenášeny na stejnou stranu membrány – symport, nebo transport probíhá protichůdně – antiport [29].

Proteiny jsou také využívány při koordinaci vezikul naplněných vysokomolekulárními látkami, dovnitř či vně buňky. Nazýváme je SNARE proteiny a jsou dvojího druhu:

- v-SNAREs - proteinové markery lokalizované na povrchu vezikul
- t-SNAREs – proteinové markery, umístěné na cílovém místě membrány. SNAREs proteiny jsou důležité při spojení vezikuly a membrány.

Mezi transportní bílkoviny bakterií se řadí například poriny, pronikající přes membránu až k peptidoglykanu. Svou strukturou vytváří hydrofóbní pór, kterým protékají malé hydrofobní molekuly dovnitř buňky [29].

### 2.1.5.2 Enzymová výbava cytoplazmatické membrány

V cytoplazmatické membráně se nacházejí především enzymy dýchacího řetězce, oxidativní fosforylace, enzymy, syntetizující fosfolipidy a složky buněčné stěny. U fototrofních bakterií můžeme také nalézt bakteriochlorofyl, přeměňující světelnou energii v chemickou. Získaná energie se uchovává prostřednictvím adenositriřofátu a uvolní se hydrolytickým rozkladem jejich dvou makroergických vazeb. Bakteriální buňka získává energii buď fermentací nebo respirací.

Fermentace, neboli kvašení při němž dochází k zisku energie díky rozkladu glukózy bez přístupu kyslíku. Kvašení je využito v potravinářském průmyslu při výrobě alkoholických nápojů a při mléčném kvašení. U ethanolového kvašení se využívají kvasinky *Saccharomyces cerevisidae*, které přeměňují sacharidy na oxid uhličitý a ethanol. U mléčného kvašení, sloužící ke konzervaci mléka, se uplatňují *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* nebo *Leuconostoc dextranicum*. Dalším důležitým zdrojem uhlíku, který bakterie získá bez přístupu vzduchu, je pentoso-fosfátová dráha. V této cestě se mění glukóza na ribulosa-5-fosfát.

Respirace je narozdíl od fermentace metabolická dráha, při které se glukóza získává za přístupu kyslíku. Enzymy, zajišťující tento proces jsou umístěny na membráně a jsou zapojeny do tzv. dýchacího řetězce. Výhodou oproti fermentaci skýtá respirace především v množství získané energie. Při respiraci se získá 38 molekul ATP, kdežto u fermentace to jsou pouze 2 molekuly [16].

### 2.1.5.3 Imunoreaktivní membránové proteiny

Tyto proteiny se vyskytují na cytoplazmatické membráně a hostitelský organismus reaguje na jejich přítomnost tvorbou specifických protilátek. V posledních letech se řada výzkumů věnuje těmto strukturám z důvodu objasnění patogenních mechanismů některých málo prozkoumaných vysoce virulentních bakterií, jako je tomu v případě *F. tularensis*. Dále jsou uvedeny obecné příklady některých specifických antigenních struktur:

- **Peptidoglykan** – je součástí buněčné stěny a z chemického hlediska ho řadíme mezi glykosidy. Pro savčí buňky vykazuje přímou cytotoxickou aktivitu.
- **M protein** – je jednou z antigenních struktur, které jsou typické pro *Str. pyogenes*. Je lokalizován na cytoplazmatické membráně, proniká jí a oba konce této molekuly

volně ční na obě strany membrány. Jeho funkcí je adheze bakterie na povrch sliznice. Má také ochrannou funkci, kdy brání monocyto-makrofágovému systému fagocytovat bakterii.

- **Kyselina lipoteichoová** – další adherentní protein. Protilátky tvořené proti kyselině lipoteichoové vykazují zkříženou aktivitu s membránami hostitelských buněk. Mohou například reagovat s kardiolipinem a v důsledku tohoto procesu může docházet ke vzniku antikardiolipinového syndromu, projevujícího se zvýšenou náchylností k trombotickým příhodám.
- **F protein** – nositelem receptoru pro molekulu fibronektinu. Je také pravděpodobné, že se podílí na adhezi bakterií na povrch faryngu a kůže [30].

### 2.1.6 Využití poznatků o membránových proteinech

Membránové proteiny mohou být studovány pomocí funkční proteomiky, cíleně zaměřené na subproteomovou analýzu tzv. membranom. Membranom poskytuje informace o struktuře proteinů, membránové lokalizaci, evolučním vývoji, protein-proteinových interakcích, a také o změně složení membránových proteinů v závislosti na metabolických potřebách buňky [31].

Znalosti z oblasti membranomu uvedené do praxe mohou pomoci při diagnostice patologických stavů, při odhalování účinku farmak na buňku, a také při vývoji nových vakcinačních látek.

U zjišťování působení patologických stavů na buněčné struktury, je využívána diagnostika biomarkerů, což jsou objektivně hodnotitelné a ověřitelné proteinové indikátory, jež by měly pro zavedení do praxe splňovat podmínky dostatečné citlivosti, specifčnosti, validity a dostupnosti [32].

Antigenní struktury lokalizované na membránových površích bakterie slouží také jako diagnostický marker, díky kterému je možné odhalit původce onemocnění. Dále je možné se opírat o specifické protilátky, které se vytvářejí proti skladbě antigenů bakterie. Specifita protilátek se odvíjí od daného typu bakterie.

Aby bylo možné diagnostikovat daný antigen, je třeba připravit specifickou protilátku proti tomuto antigenu, která se může získat imunizací pokusného zvířete nebo technologií buněčných hybridomů. Daný antigen lze identifikovat pomocí řady metod, které zahrnují precipitační techniky, aglutinaci na nosičích a dnes nejvíce užívané a také nejcitlivější, imunoenzymatické metody.

Pro stanovení *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) se užívá jeho specifického antigenu antistreptolysin O (ASLO), což je protilátka tvořená proti proteinu přítomnému na cytoplazmatické membráně *S. pyogenes* skupiny A,C a G. Působením těchto organismem tvořených protilátek, dochází k poškození orgánových struktur, a to pod obrazem klinického stavu zvaného revmatická horečka. Pro diagnostiku tohoto klinického stavu se zjišťuje titer protilátek proti ASLO [33].

*Salmonella* má dvě varianty antigenů – bičíkové a somatické. Oba tyto sérotypy mají homologní genom v 96-98%, ovšem odlišují se v závažnosti a symptomech patologických stavů, které způsobují. Pro diagnostiku se také využívá zjišťování přítomnosti specifických antigenních struktur (např. Vi antigen typický pro *Salmonella typhi*). Identifikace těchto antigenů se provádí aglutinací, kde dochází k reakci se specifickými antiséry namířenými proti antigenům. V případě pozitivní reakce je možné vidět shlukování partikulí, na kterých je antisérum navázáno [34].

Znalost skladby proteinů na membráně pomáhá při vývoji vakcinačních látek. Mnohé z těchto proteinů patří do skupiny faktorů virulence a při jejich vyřazení použitím aktivní imunizace, nemůže daný patogen infikovat hostitele. Vakcína může obsahovat oslabené antigeny, a to především protekční antigeny mezi něž patří například tetanický toxoid, pouzdrové polysacharidy pneumokoků a hemofilů.

Vakcíny mohou být různých typů a dělí se na:

- **toxoidy** – jsou bakteriální toxiny, zbavené chemicky (formalínem) jejich patogenních vlastností. Těchto vakcín se používá při očkování proti záškrtu.
- **inaktivované vakcíny** – bakteriální vakcíny jsou připraveny z usmrcených bakterií, které si zachovaly své protekční antigeny, a aby tak mohly imunitní systém ke tvorbě protilátek, jež slouží jako paměťové buňky a při sekundární infekci mohou rychleji reagovat na infekci. Patří zde vakcíny proti černému kašli, kombinované vakcíny proti tetanu a dávivému kašli.
- **chemovakcíny** – jsou očkovací látky připravené pouze z izolovaných protekčních antigenů. Takto se očkuje proti *Haemophilus influenzae*, který obsahuje polyribosylribitol fosfát. Často se kombinuje s tetanickým toxoidem nebo s proteiny *Corynebacterium diphtheriae*. Očkování proti hemofilům, pneumokokům a proti *Salmonella typhi* řadíme do jedné skupiny vakcinačních látek – kapsulární polysacharidové vakcíny.

- **živé atenuované vakcíny** – obsahují živé oslabené kmeny bakterií nebo virů. V porovnání s ostatními způsoby vakcinace je tento druh neúčinnější, co se týká imunitní paměti. Atenuované kmeny jsou vneseny do organismu a v místě zavedení se vytvoří mírná reakce, značící průběh imunitní odpovědi. Používají se nejčastěji pro intracelulární patogeny. Nejvíce používaným očkováním tohoto typu je vakcinace proti tuberkulóze neboli vakcína BCG.

Nové směry ve vývoji vakcinačních látek se zabývají vývinem tzv. DNA vakcín, což jsou upravené plazmidy, které obsahují geny pro protekční antigeny. Po zanesení těchto vakcín do organismu, pronikají do jádra buňky, kterou „donutí“ produkovat příslušný antigen. Uvažuje se také o genových vakcínách, které by po vnesení do organismu produkovaly některé cytokiny, a tím upravili imunitní odpověď [16].

## 2.2 Membranom *Francisella tularensis*

### 2.2.1 Bioinformatická analýza membránových proteinů *Francisella tularensis*

Bioinformatické studie byly provedeny na proteinech *F. tularensis*, které byly identifikovány hmotnostní spektrometrií a byla u nich známa aminokyselinová sekvence. Pro predikci funkce, struktury a lokalizace byly použity níže uvedené algoritmy.

SignalP používá dvě metody neural work, přičemž jedna predikuje signální peptid a druhá místa pro štěpení specifickou peptidázou. Graficky je výsledek znázorněn jako tři souřadnice: C, S, Y. Souřadnice C udává místo štěpení, S vypočítává pro každou aminokyselinu zadané sekvence, Y je derivací C a S skóre a vypočítává ideální místo štěpení, specifičtější C souřadnice [35]. Těmito databázemi byly určeny například signální peptidy TIRAP či MyD88.

Jelikož se velké množství imunoreaktivních proteinů nachází na povrchových strukturách bakterie, je možno k jejich identifikaci použít program PSORT, který dokáže predikovat lokalizaci proteinu. Tento program pracuje na principu srovnávání podobných proteinů a jejich lokalizací, hledá stejné signální peptidy a složení aminokyselin. Pomocí tohoto programu byly analyzovány imunoreaktivní proteiny IglC, MglA, GroEL a další.



SecretomP je využíván pro predikci pravděpodobných sekrečních proteinů. Predikční metoda uděluje každému domnělému proteinu body od 0 do 1. Jestliže má protein nad 0,5 bodů je určen jako sekreční. Kyselá fosfatasa a beta laktamasa byly tímto algoritmem predikovány jako sekretované proteiny [36].

Predikční program PSORT-B je určen pro odhad lokalizace analyzovaného proteinu v bakteriální buňce. Pomocí tohoto programu byly např. predikovány lokalizace proteinů: AcpA, chaperoninový protein DnaK, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenasa, laktát dehydrogenasa a beta-laktamasa [36].

## **2.2.2 Poznatky z anotace genomu**

Jelikož známe kompletní sekvenci genomu *F. tularensis*, je možné studovat a predikovat funkce všech obsažených genů a dále zkoumat patogenní mechanismy této bakterie.

### **2.2.2.1 Enzymatická výbava**

V genomu byly nalezeny geny kódující 350 enzymů, katalyzujících 429 reakcí v metabolismu. Byla predikována produkce sedmi esenciálních aminokyselin – alanin, asparagin, glutamát, glutamin, glycin, fenylalanin a tryptofan). V metabolických pochodech, zahrnujících katalýzu polyaminů jako je putrescin nebo spermin, je funkční porucha, která má jako důsledek sníženou odolnost bakterie v hypotonickém prostředí [7].

### **2.2.2.2 Faktory virulence**

Jedním z mála poznatků, které máme o virulentních mechanismech *F. tularensis*, je fakt, že její růst probíhá uvnitř makrofágů. V genomu se nalézá operon *IglABCD*, který kóduje proteiny *IglA*, *B*, *C*, *D*. Jestliže dojde v těchto regionech k mutaci, mikrob není schopný se adaptovat na vnitřní prostředí makrofágu a hyne. Za normálních funkčních podmínek bakterie dokáže rozrušit stěnu makrofágu a uniknout do cytosolu. Tomuto ději napomáhá fosfolipáza C a D.

*Francisella* je kultivována v kyselém pH, které se postupně zvyšuje díky produkci amoniaku. Díky této metabolické cestě může bakterie přežít uvnitř makrofágů. Je to zajištěno působením L-glutaminas, L-asparaginas a citrulinureidas. Citrulinureidasa je

navíc využívána pro rozlišení subtypů s vyšší (subtyp *tularensis*) nebo nižší (subtyp *holarctica*) virulencí.

Dále byla zjištěna přítomnost transportních systémů, pracujících na principu ABC transportérů. Jsou zařazeny mezi potenciální faktory virulence [7]. Stejně tak jako přítomnost pilu typ IV, jehož funkce není doposud známa, ovšem u jiných patogenních bakterií je součástí virulentních mechanismů [7].

Jedním z důležitých faktorů virulence se ukazuje být získávání železa ve fagosomu. Absorpci železa zajišťuje Fur protein (ferric uptake regulator) stejně jako u velké většiny mikroorganismů [7]. Bylo také nalezeno mnoho genů, regulujících Fur protein – *ftnA*, *fumB*, *acnA*, *sodB* a *iraB*, který se vyskytuje také u *Legionella pneumophila* [7]. *F. tularensis* je schopná narušit fagosom a přejít do cytosolu. Dalo by se tedy předpokládat, že v cytosolu, kde je železo vysoce rozpustné, *F. tularensis* bude využívat komplexy, vážající železo (bacterioferritin nebo siderofory) [58].

### **2.2.3 Komparativní proteomové analýzy membranů různých kmenů *Francisella tularensis***

Důvodem vypracování výzkumných postupů pro srovnání membránově asociovaných proteinů, je především objasnění patogenních mechanismů intracelulární bakterie *F. tularensis*. Srovnání proteomů je výhodnější než srovnání genomové výbavy všech subtypů *F. tularensis*, a to především z důvodu posttranslačních modifikací, které probíhají po proteosyntéze. Genomy subtypů *F. tularensis* jsou z velké části homologní, ale na úrovni proteomů byly nalezeny odlišnosti [9]. Pro vědecké účely se používají především subtypy *tularensis* a *holarctica*, jelikož *novicida* a *mediaasiatica* nejsou schopny infikovat lidi. Předmětem zájmu jsou proteiny, které se vyskytují pouze u jednoho subtypu, nebo jsou v něm více zastoupeny (kvantitativně či ve více proteinových izoformách).

Pro separaci frakce obohacené o membránové proteiny byla využita dvourozměrná elektroforéza a proteiny pak byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. K bioinformatické analýze identifikovaných proteinů pak byly využity algoritmy PSORTb, PROSITE, Pfam a BLAST.

Komparativní proteomová analýza *F. tularensis* subs. *holarctica* a *F. tularensis* subsp. *tularensis* provedená pomocí 2DE odhalila specifickou přítomnost proteinů na 2D gelech (konkrétně 6 proteinů), které byly nalezeny pouze u kmene SCHU S4. Jedná se o

tyto proteiny: hypotetický lipoprotein FT 1260, 3-hydroxyisobutyryát dehydrogenasa FT 1666, sekreční protein FT 0018, konzervovaný hypotetický protein FT 1651, hypotetický protein FT 0903, typ IV pili lipoprotein FT 1157 [37]. Subtypy *tularensis* a *mediaasiatica* vykazovaly značnou podobnost ve složení proteomu.

Lze předpokládat, že by výše uvedené proteiny mohly být zapojeny do virulentních mechanismů *F. tularensis*. Pokud by tato hypotéza byla potvrzena, byly by tyto poznatky využity při vývoji účinné humánní vakcíny. V současné době totiž neexistuje licencovaná vakcína, disponuje se pouze *F. tularensis* kmen LVS (live vacine strain), který je živým oslabeným kmenem *F. tularensis* subsp. *holarctica*, a který byl užíván pro výzkumné pracovníky pracující v riziku potenciální nákazy.

Předpokládá se, že sekreční protein FT0018 bude mít souvislost s transportem molekul, toxických pro bakterii. Komparativní analýza ukázala, že gen, kódující tento protein se vyskytuje i v subtypu *holarctica*, ale je nefunkční. Další protein PilP je jednou z komponent type IV pili (Tfp), což je multifunkční komplex, který se např. účastní pohybu bakteriálních těl a jejich šíření v prostoru, adhezi k hostitelským buňkám či umožňuje translokaci molekul přes vnější bakteriální membránu [38].

Konzervovaný lipoprotein FTT1103, jež patří do thioredoxinové rodiny, který se nachází v obou subtypech, je v *tularensis* kvalitativně změněn. V aminokyselinové sekvenci v subsp. *tularensis* (kmen SCHU S4) tohoto proteinu chybí 8 aminokyselin na N-konci, což odpovídá posunu molekulových hmotností, které jsou patrné na 2D gelech. Dalším proteinem nalezeným v subsp. *holarctica* je lipoprotein VacJ, který je kódován nefunkčním genem v kmenech patřících do subsp. *tularensis*, zatímco ve většině kmenů subsp. *holarctica* je plně funkční. Do skupiny proteinů, které se vyskytovaly v rozdílných proteinových izoformách lišících se posunem v pI, patřily IglC a IglA. Tyto proteiny hrají důležitou roli při množení bakterií uvnitř makrofágů. Proteiny exprimované v nízkých koncentracích byly v předešlých studiích identifikovány jako imunoreaktivní, například hypotetické proteiny FTT1441 a FTT1539, outer membrane protein (Omp) FTT1572 a (OmpH) FTT1747. Uvedené proteiny reagovaly jak se séry pacientů po tularémii, tak i se séry experimentálně infikovaných myší [37].

Komparativní proteomika kmenů s různou virulencí může podstatným způsobem přispět k poznání molekulárních mechanismů, které vstupují do vzájemných interakcí hostitel-patogen a které významným způsobem ovlivňují virulenci či patogenitu mikroorganismu.

## 2.2.4 Imunoreaktivní proteiny *Francisella tularensis*

Pro lepší porozumění mechanismům patogenity se *F. tularensis* byla použita imunoproteomická studie, která umožnila odhalit antigeny přítomné na povrchu této bakterie. Pro studium těchto struktur byla použita lidská séra pacientů infikovaných *F. tularensis* a séra zdravých jedinců. Tomuto výzkumu se věnovala práce Jany Havlasová et al. [39], která místo lidských sér použila séra infikovaných myší a výsledky byly srovnány s výsledky získané od lidí infikovaných tularémií. Výsledek této studie přispěl svou měrou k odhalení imunoreaktivních proteinů indukujících protilátkovou odpověď, potenciální markery využitelné pro vakcínu, a také má diagnostický význam. Pro studium těchto proteinů byla využita 2D elektroforéza, Western blot a hmotnostní spektrometrie. Imunoblotting odhalil reakci mezi antigenem a protilátkou.

Výsledkem tohoto postupu bylo identifikování 50 imunoreaktivních proteinů. U těchto proteinů byla z velké části stanovena funkce pomocí bioinformatických databází. U třinácti proteinů byla predikována funkce účast při buněčných procesech a posttranslačních modifikacích, biosyntézy buněčné stěny, a přenosu signálu. Dalších 12 proteinů plnilo funkce v procesu tvorby a ukládání energie (metabolismus lipidů, sacharidů a nukleotidů). Pět proteinů byly ribosomální proteiny, účastníci se proteosyntézy. Jeden z proteinů se účastnil DNA replikace, rekombinace a opravy DNA.

Při srovnání výsledků u myších sér s výsledky od 9 pacientů s diagnostikovanou tularémií, bylo možno sledovat určité změny ve výsledných proteinech [39]. Tyto výsledky byly porovnávány se dvěma zdravými patientskými séry a se třemi pacienty, jež byli infikováni Lymeskou boreliózou. Z 50 identifikovaných proteinů v myších sérech, jich 25 bylo společných u pacientů s tularémií, přičemž 8 z nich bylo v obou sérech nalezeno ve vysokých titrech. Jednalo se o ClpB protein, protein ve vnější membráně, přenašeč malonyl-CoA-acylu, GrpE protein, oxidoreduktasa, protein s dosud neobjasněnou funkcí, chaperonin a protein s pravděpodobnou sigma modulací. Oproti těmto výsledkům byly ve vyšších titrech nalezeny proteiny jako například možný periplasmatický protein, elongační faktor  $T_s$  a RNA vázající protein.

V *F. tularensis* kmeni LVS byl imunodominantním stimulem glykolipid ve vnější membráně, což potvrdila i provedená studie. Také bylo zjištěno, že 60 kDa chaperonin a 17 kDa lipoprotein zvaný TUL4 mají velký význam pro indukcii tvorby specifických protilátek. Cílem této studie bylo odhalit proteiny, které byly ukotveny na vnější membráně a jejichž přítomnost byla největším podnětem pro vyvolání imunitní odpovědi. Výsledkem

bylo určení 6 pravděpodobných sekrečních proteinů. Do této doby byly popsány pouze dva proteiny hrající důležitou roli ve virulenci *F. tularensis*, a to difosfátkinasa a isocitrátdehydrogenasa. Se stejnou funkcí byla isocitrátdehydrogenasa popsána také u *Leshmania infantum*, kde přítomnost tohoto funkčního genu umožnila bakterii přežít ve fagosomu. Stejnou vlastnost mají i nalezený ClpB protein a RNA-vázající protein, díky kterým může *F. tularensis* přežít uvnitř fagosomu. U dosažených výsledků je nutno počítat s neznámým složením lidských a myších sér. Byla nalezena 50% shoda v protilátkách, ale díky zatím neobjasněné podobnosti mezi těmito dvěma živočišnými druhy, se musí tato výsledná data ověřit dalším výzkumem. Výsledky této studie umožní další postup ve vývoji vakcíny proti *F. tularensis*.

### **2.2.5 Konkrétní funkce membránových proteinů *Francisella tularensis***

Proteiny přítomné v membráně bakterií mohou mít z obecného hlediska celou řadu funkcí, které jsou popsány v kapitole Funkce membránových proteinů. Většina těchto proteinů má především imunoreaktivní potenciál, kterému je věnováno nejvíce pozornosti. Proteiny mají také funkci enzymatickou, transportní či signální. Na membránové proteiny se také pohlíží jako na kandidáty pro vývoj nové humánní vakcíny. Membránové proteiny byly identifikovány jako skupina tzv. Omp a jejich extrakce z membrány byla provedena pomocí sonikace, následovanou ultracentrifugací, případně extrakcí za pomoci detergentu [9]. Mezi tyto proteiny patří například chaperoninový protein DnaK, GroEL, ATP syntasa, FopA, TUL 4 a další. Jsou zde popsány jen některé proteiny:

- FopA – neboli Francisella outer membrane protein, je 43 kDa bílkovina, jež byla identifikována pomocí litiumchloridového extraktu z patientských sér. Tento protein byl rovněž nalezen u *Escherichia coli*. FopA je přímo navázán na peptidoglykanové struktury buněčné stěny [40].
- TUL 4 - je protein o velikosti 17 kDa, jež přímo stimuluje CD4<sup>+</sup> T lymfocytární aktivitu, indukuje produkci interleukinu 2 a interferonu gama. Z biochemického hlediska se jedná o lipoprotein. Není zcela jisté jak konkrétně ovlivňuje

T lymfocyty, ovšem dosavadní úvahy ukazují na možnost indukce prostřednictvím acylace. Oba proteiny (FopA i TUL 4) patří do Omp [41].

- ClpB protein – patří mezi proteiny stresové odpovědi. Má také význam při tvorbě prostorového uspořádání proteinů. Je možné ho nalézt i v bakterii *Salmonella typhimurium*, kde je jednou z důležitých virulentních determinant. V posledních výzkumech tohoto proteinu se vědci snaží jej inaktivovat a zjistit, zda by došlo ke snížení patogenity *F. tularensis* [42].
- pilus typ IV (Tfp) – je to komplex adhezivních proteinů, důležitých pro průnik intracelulárních bakterií dovnitř hostitelských buněk. Tento protein se také vyskytuje v patogenech jako je *Neisseria spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Vibrio cholerae*. Vlákno pilusu je složeno z jednoho hlavního pilu a menších postranních pilů. Je zanořen do membrány a ukotven pomocí PilQ sekretinu. Vytváří se tak pór mezi vnitřním a vnějším povrchem membrány. Jeden protein z komplexu těchto adhezínů, PilA, je možné jej nalézt pouze u vysoce virulentních kmenů *F. tularensis* a naopak není přítomný u LVS kmene [43].
- MglA, MglB protein – obě tyto bílkoviny umožňují intracelulární růst bakterie, a to konkrétně uvnitř makrofágů. Jsou součástí regulátorů genové exprese a jedním z důležitých faktorů virulence. Vykazují homologii k SspA a SspB *E.coli*, jejichž funkcí je zajištění růstu v prostředí chudém na živiny a odolnost vůči kyselému pH [44].
- TIRAP, MyD88 signální proteiny – byly lokalizovány v cytoplazmatické membráně vázané na PIP<sub>2</sub>. Slouží jako adaptivní proteiny pro TLR2-dependentní signální cestu. TLR2 hraje dominantní roli při rozpoznávání *F. tularensis*. TIRAP je důležitou součástí, tzv. bridging receptoru pro MyD88 [45].
- IglC,D – jsou proteiny, které jsou kódovány *iglABCD* operonem a jsou lokalizovány v ostrovech patogenity. Tento operon kóduje také proteiny IglA a IglB, které jsou charakteristické pro mnoho patogenních bakterií a jejich regulace probíhá společně. IglC a IglD jsou typické pouze pro *F. tularensis*. Za jejich regulaci jsou odpovědné MglA proteiny. Výzkumy prokázaly, že proteiny IglC a IglD umožňují bakterii replikaci v makrofázích hostitelské buňky [46]. IglC je navíc důležitý pro únik z fagosomu do cytoplazmy. Oba tyto proteiny chybí v kmeni LVS, a díky tomu není bakterie schopná intrafagosomálního růstu. Tohoto stavu je možné dosáhnout insercí v IglA, což má za následek defekt v expresi IglC.

- GroEL, DnaK – jsou chaperoninové proteiny. Chaperoniny obecně jsou řazeny mezi tzv. heat-shock proteiny, jejichž funkcí je zabránění agregace bílkoviny. Také stimulují monocyty, makrofágy a dendritické buňky k produkci velké škály cytokinů. Oba tyto proteiny se vyskytují u *Mycobacterium tuberculosis* a jsou asociovány s povrchovými strukturami. Množství GroEL proteinu se zvyšuje ve stresových situacích a při infikování hostitelské buňky bakterií. Má prozánětlivou funkci a stimuluje makrofágy prostřednictvím TLR-4 lymfocytů. Primární funkcí DnaK proteinu je indukce dendritických buněk [9].

## **2.3 Nástroje užívané pro analýzu membránových proteinů**

### **2.3.1 Příprava vzorku**

Pro kvalitní výsledek měření je důležité dbát na správnou přípravu vzorku, jelikož díky špatné přípravě je možné očekávat falešné výsledky. Biologické vzorky se vyznačují velkou různorodostí v bílkovinném složení, tudíž se musí zajistit oddělení jednotlivých frakcí, a tím snížit riziko interference. V ideálním případě by měl být vzorek kompletně rozpuštěný, mělo by být zabráněno degradaci stanovovaných proteinů, odstraněny nerozpustné částice (např. lipidy) a nemělo by docházet k chemickým modifikacím (např. karbamylace ureou).

Pro získání čistě proteinového vzorku, je nutné buňku dezintegrovat, a to chemicky nebo fyzikálně. Chemické rozrušení buněk se realizuje např. působením detergentů (anion detergent, SDS) nebo osmotickou lýzou. Z fyzikálních technik se využívá french press, sonikace, případně mechanická homogenizace.

Nejběžnější metodou pro separaci buněčného homogenátu na různé frakce je použití centrifugace nebo ultracentrifugace, volba závisí na velikosti částic, která se separuje. Po centrifugaci je buněčný homogenát rozdělen na supernatant, obsahující menší a lehčí složky, a na sediment. Další alternativou je frakční centrifugace, která je založena na principu opakovaných centrifugací při měnících se otáčkách. Při středních otáčkách se získají celé buňky, jádra a cytoskelet; vysoké obrátky umožní separovat mitochondrie, lysosomy a peroxisomy; u ultracentrifugace se nachází v sedimentu ribosomy,

makromolekuly a viry. Centrifugace v hustotním gradientu se dá použít pro separaci složek extraktu na základě jejich vznášivosti. Vzorek se navrství na gradient sacharózy nebo chloridu cesného (pro DNA, RNA). Každá subcelulární složka se pohybuje v gradientu tak daleko, až se dostane do vrstvy její vznášivosti. Vzniká tak řada pásů, přičemž ty nejbližší ke dnu květy se vyznačují největší hustotou nebo nejmenší vznášivostí [17].

Pro odstranění interferujících látek se využívají precipitační techniky. Jednotlivé typy precipitací se volí podle druhu balastní látky, která se má odstranit. Menší endogenní molekuly jako jsou fosfolipidy či nukleové kyseliny se s výhodou eliminují TCA/acetonovou precipitací. Při použití ultracentrifugace se dosáhne snížení obsahu nukleových kyselin, ovšem hrozí nebezpečí ztráty proteinů o vyšší molekulové hmotnosti, proto lze využít přísadů DNáz případně RNáz. Další látkou, která se podílí na zhoršené interpretaci výsledků, jsou polysacharidy, které mohou způsobit ucpání pórů v gelu a interagovat s proteiny. Tyto interferující látky lze odstranit ultracentrifugací či precipitací. Dalším krokem je solubilizace proteinů, které se docílí použitím rehydratačního pufru. V tomto pufru jsou obsaženy látky, které mají denaturační účinek, a tím pádem eliminují intermolekulární interakce (močovina, thiomočovina); neiontové detergenty, zvyšující rozpustnost (CHAPS, Triton X-100); redukční činidla, odbourávající disulfidické vazby mezi bílkovinami (DTT, DTE).

### **2.3.2 Enzymatické štěpení**

Pro identifikaci separovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie, je potřeba tyto proteiny enzymaticky štěpit. V případě použití enzymatického štěpení se musí dodržovat určité zásady. Je nutno brát ohled na stabilní pH reakčního pufru, na poměr enzym/substrát, teplotu a dobu inkubace. Nejvhodnějším a z hlediska finančního i nejvýhodnějším enzymem užívaným v proteomice je trypsin. Patří mezi serinové endopeptidasy, tudíž katalyzuje štěpení uvnitř řetězce a dává vznik dobře definovatelné fragmenty. Štěpí vždy v přesně určeném místě a to na C-konci kladně nabitých zbytků argininu a lysinů, pokud nenásleduje prolin. Výhodou je, že vytváří peptidy o průměrné délce 10-20 aminokyselin, které je možné stanovovat pomocí MALDI-TOF spektrometru [47]. Vyžaduje prostředí o pH 7,8 a doba jeho inkubace se pohybuje v rozmezí 4 – 24 hodin a to při teplotě 37 °C. Velkou výhodou použití trypsinu je snížení procenta interferencí autolytických píků. Pro zlepšení vlastností trypsinu se chemicky modifikuje, ať



metylací či acetylací, a tím se redukuje jeho termolabilitu a autolýzu. [47] Mimo trypsin jsou v proteomice využívány enzymy jako je chymotrypsin, elastasa, Glu-C či Lys-C.

### **2.3.3 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Tato metoda má v proteomice velký význam, protože umožňuje separaci a následnou analýzu složitých směsí látek, jakými jsou například směsi peptidů po trypsinovém štěpení proteinového vzorku v gelu nebo tzv. "gel free" v roztoku. Z fyzikálně-chemického hlediska probíhá na principu rozdělení složek analyzované směsi mezi dvě nemísitelné fáze – nepohyblivou (stacionární) a pohyblivou (mobilní). Spojení mikroHPLC s hmotnostní spektrometrií je v proteomové analýze jednou z velmi všestranných technik. Identifikace MS přístupem je v tomto případě nutností, protože běžně používané UV detektory nejsou vhodné díky jejich nižší citlivosti způsobené kratší světelnou odezvou danou nízkými průtoky analytu. Spojení mikrokolon s minimalizovaným průtokem s ionizací elektrosprejem dává velmi vysokou citlivost. Je možné i off-line či on-line spojení HPLC s MALDI ionizací [59].

#### **2.3.3.1 Stacionární fáze**

Miniaturizace HPLC je spojena s nano-uspořádáním kolon a dalších kapilár v systému, jejichž průměry se pohybují od 20 do 250  $\mu\text{m}$ . Díky těmto kolonám je také snížen průtok, a to na hodnoty 0,02 – 10  $\mu\text{L}/\text{minutu}$ . Jako stacionární fáze jsou nejčastěji využívány tzv. reverzní fáze (např. silikagel C18), jež potlačují rozšiřování píků. Velikosti částic stacionárních fází se pohybují od velikosti 3 do 10  $\mu\text{m}$  [59]. Tyto rozměry zajišťují minimální mrtvý objem.

#### **2.3.3.2 Mobilní fáze**

Nejčastěji používanou organickou složkou mobilních fází je acetonitril, dále pak methanol, který je vhodnější u off-line nanoESI metod, u kterých zajišťuje vyšší citlivost. Pro okyselení se používá trifluoroctová kyselina, která minimalizuje rozšiřování píků. Stejně výhody má i kyselina mravenčí, která je narozdíl od kyseliny trifluoroctové vhodná i pro spojení s ESI ionizací, a která byla použita v praktické části [59]. Optimální průtokový gradient je závislý na komplexnosti vzorku. Jestliže je zvolen postupně

narůstající gradient, je dosaženo lepšího výsledku. Ovšem díky strmějšímu gradientu je zvýšena citlivost metody.

### **2.3.3.3 Nástřik vzorku**

Při dávkování vzorku pomocí nástřikovacího ventilu je dobré začlenit před vlastní separační kolonu předkolonu. V předkoloně dojde například k zakoncentrování vzorku. Toto instrumentální uspořádání zabraňuje zanášení kolony solemi analytu [59].

### **2.3.3.4 Detektor**

Jak je zmíněno již výše, je výhodné použít spojení s ESI či MALDI hmotnostním spektrometrem. Jejich principy jsou popsány v kapitole 2.3.4.1. a 2.3.4.2.

### **2.3.3.5 Vícerozměrná separace**

Přestože je mikroHPLC schopná analyzovat 2000 – 4000 peptidů za 1 – 2 hodiny, její nevýhodou je identifikace složitých směsí peptidů, které se často vyskytují u celobuněčných lyzátů. Řešením tohoto problému je snížení komplexnosti vzorku, ať již ultracentrifugací či imunoprecipitací. Další možností je využití například iontově-výměnné chromatografie celého peptidového vzorku v prvním rozměru spojeném s jímáním jednotlivých frakcí a následnou analýzou těchto frakcí pomocí LC-MS na reverzní fázi [59].

## **2.3.4 Hmotnostní spektrometrie**

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Je posledním krokem v identifikaci proteinů, analýze posttranslačních modifikací proteinů, odhaluje mutace a DNA sekvenační chyby. Hmotnostní spektrometr umožňuje vytvořit kladné či záporné ionty z analyzované látky. Ionizace probíhá ve vakuu, kde dochází k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice – ionty. Ionizace může být dvojího typu: tvrdá ionizační technika (molekula získá velké množství energie, které má za vliv následnou fragmentaci molekuly) a měkká technika (molekula absorbuje menší množství energie a díky tomu vzniká méně fragmentů

a více deprotonovaných molekul). Tyto ionty jsou pak tříděny podle jejich efektivní molekulové hmotnosti  $m/z$ . Ionty pak detekuje a signál odesílá k počítačovému zpracování. Záznam, jenž je výsledkem analýzy látky, se nazývá hmotnostní spektrum, kde na ose x jsou uvedeny efektivní hmotnosti iontů  $m/z$  a na ose y jejich relativní zastoupení iontů ve směsi. Výhodou hmotnostní spektrometrie je vysoká citlivost, která umožní zachytit látky v množství  $10^{-9}$  g. Další nespornou předností je rychlost analýzy a snadné zpracování dat pomocí bioinformačních softwarů.

Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, převádějícího neutrální látky na kladně či záporně nabitě částice; hmotnostní analyzátor, který slouží k separaci iontů v plynné fázi za vysokého vakua podle poměru hmotnosti a náboje  $m/z$ ; detektor slouží k detekci rozdělených iontů podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Dalšími součástmi je výkonný vakuový systém, zařízení pro dávkování vzorku (sonda), iontová optika sloužící k urychlení a fokusaci iontů a počítač k uchovávání a zpracování dat [48].

### **2.3.4.1 MALDI-TOF**

Dnes téměř nejužívanější technikou hmotnostní spektrometrie je desorpce/ionizace laserem za účasti matrice v kombinace s průletovým analyzátozem. Díky této metodě je možno identifikovat jak proteiny, tak peptidy, oligonukleotidy, syntetické polymery a další. MALDI ionizací vznikají jednou nabitě ionty a dochází pouze k minimální fragmentaci molekul. MALDI-TOF je velmi tolerantní k obsahu soli ve vzorku, tudíž usnadňuje přípravu vzorku, a tím zrychluje analýzu [22].

#### *2.3.4.1.1 Vstupní systémy*

Účelem těchto systémů je vkládání nebo zavádění vzorků do hmotnostního spektrometru, tedy do iontového zdroje. U MALDI-TOF tuto funkci vykonává kovová destička s terčíky na kterých je nanesen vzorek určený k identifikaci.

#### *2.3.4.1.2 Iontový zdroj*

Ionizace u MALDI probíhá po smíchání směsi s nadbytkem vhodné matrice, která je ozářena krátkými laserovými pulsy. Tato ionizace je proto velmi vhodná pro spojení s analyzátozem času letu (TOF). Matrice absorbuje energii laserového pulsu a napomáhá

vzniku iontů v důsledku přenosu protonu z fotoexcitované matrice. Stěžejní úlohou matrice je také izolace jednotlivých molekul analytu, a to vznikem homogenních krystalů, které by měly rovnoměrně pokrýt místo ozařovaného terčíku. Matrice pak přechází sublimací do plynného stavu. Nejčastěji používané matrice jsou nízkomolekulární látky typu slabých aromatických kyselin jako jsou:  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina a kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, pro analýzu proteinů pak 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová kyselina. Pro zvýšení rozlišení se může použít tzv. zpožděná extrakce, kdy se ionty extrahují až po 10-100 ns po aplikaci laserového pulsu, a tím dojde k vyrovnání jejich energií [22].

#### 2.3.4.1.3 Hmotnostní analyzátor

Analyzátor se skládá z průletové trubice, kde na začátku trubice se nachází iontový zdroj s odpuzovací elektrodou a akcelerační mřížkou, a na konci trubice je umístěn detektor. Principem této metody je separace iontů podle hodnoty  $m/z$  a to tak, že ionty o menší velikosti  $m/z$  letí rychleji v oblasti bez pole, než-li ionty o větším  $m/z$ , a tím pádem dopadnou později na detektor. Přes veškeré výhody tohoto postupu je v důsledku energetické disperze počátečních rychlostí iontů rozlišení lineárního TOF analyzátoru dosti omezené. Možností jak zvýšit rozlišení je použití iontového zrcadla (tzv.reflektronu). Tímto zrcadlem se dvojnásobně prodlouží dráha letu iontů, tedy i dobu dopadu na detektor a je tím dosaženo vyrovnání kinetických energií. Tímto způsobem je možné měřit pouze peptidy. Největšími výhodami průletového analyzátoru je jeho vysoká citlivost, výkonnost a teoreticky neomezený limit  $m/z$  analyzovaných iontů.

U TOF analyzátoru je časté tandemové spojení s kvadrupólovým analyzátozem. Toto spojení je výhodné pro studování aminokyselinových sekvencí či posttranslačních modifikací. Toto spojení je konstrukčně realizováno propojením obou analyzátorů prostřednictvím kolizní cely. Princip spočívá v rozlišení prekurzorových iontů a následným výběrem iontu v prvním analyzátoru, druhý analyzátor tento vybraný iont podrobí další fragmentaci. Vzniklé ionty jsou rozlišeny v detektoru [22].

Kvadrupólový analyzátor je složen ze 4 tyčí, jež jsou prostorově uspořádány tak, aby na protilehlé tyče bylo vloženo stejné napětí. Napětí je kombinací střídavé a stejnosměrné složky. Ion, který je přiveden do středu těchto tyčí začne vlivem měnícího se napětí oscilovat. Ion osciluje pouze tehdy, je-li v daný časový okamžik vhodné napětí a iont má určitou hodnotu  $m/z$ . Tento iont projde kvadrupólem a dostane se na detektor.

Ostatní ionty jsou zadrženy na tyčích kvadrupólu. Postupnými změnami vkládaného napětí, tak kvadrupólem projdou všechny ionty [48].

#### 2.3.4.1.4 Detektor

Detekce iontů může probíhat na principu elektronového násobiče, kdy ionty dopadající na povrch elektrody z ní vyrazí elektrony. Tento dopad je dále zesílen systémem dynod. Další typem detektoru je fotonásobič, u něhož ionty dopadají na fosforovou destičku a uvolní energii ve formě fotonu. Opět signál může být zvýšen systémem dynod. Posledním typem je Faradayova klec, u které dopadají ionty na sběrnou elektrodu, čímž způsobí vybití kondenzátoru. Počty vybití jsou úměrné počtům dopadlých iontů. Tento způsob je nejpřesnější.

### 2.3.4.2 ESI

ESI, neboli ionizace elektrosprejem, je typem měkké ionizační techniky, kterou je dosaženo disperze kapalin a aerosolů. Tento typ ionizace není tolerantní k vyššímu obsahu solí a detergentů v analytu, proto je nutné s touto skutečností počítat při přípravě vzorku a vzorky řádně odsolit a přecistit. Ve spojení s kapalinovou chromatografií je rovněž nutné počítat a použitím méně bezvodých mobilních fází a normálních mobilních fází. ESI se nejčastěji používá pro stanovení středně polárních až iontových sloučenin, biopolymerů a pro studium nekovalentních interakcí. Nevýhodou této metody je snížení citlivosti z důvodu velkého množství píků, které mohou být navíc i nepřehledné [48].

#### 2.3.4.2.1 Iontový zdroj

Analyt, který je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, je přiváděn na kapiláru nabitou na 3 – 5 kV. Vznikají tak kapičky nabitého analytu, které jsou rozprašovány za pomoci zmlžujícího plynu. Dochází k odpařování rozpouštědla, přičemž kapičky zmenšují svůj objem a zvyšují svůj povrchový náboj. Kapičky analytu se rozpadají a dochází k tzv. Coulombickému štěpení. Opakováním tohoto procesu dochází k tvorbě vícenásobně nabitých iontů  $[M+H]^{z+}$  a  $[M+H]^{z-}$  [48]. Ve spektru tedy pozorujeme série píků stejného analytu o stejné molekulové hmotnosti s rozdílným počtem nábojů.

#### 2.3.4.2.2 Hmotnostní analyzátor

Pro proteomickou analýzu je velmi výhodné spojení ionizace elektrosprejem s iontovou pastí. Iontová past je složena ze dvou koncových elektrod, které uzavírají středovou elektrodu. Princip iontové pasti spočívá v různých oscilacích iontů v trojrozměrné kombinaci střídavého a jednosměrného napětí. Ionty jsou pulzně přiváděny do iontové pasti, kde jsou zachyceny jen tehdy, mají-li odlišnou hodnotu  $m/z$ , které závisí na hodnotě vkládaného napětí. Poté jsou ionty vypuzovány zvyšující se vysokofrekvenční amplitudou na detektor na základě poměru svého  $m/z$ . Dvnitř iontové pasti je zaváděno helium, které tlumí oscilace iontů, a tím je udržuje ve středu pasti [22]. Iontovou pastí je možné studovat strukturu analytu. Velkou výhodou tohoto spektrometru je možnost uchování vybraného iontu uvnitř iontové pasti, které umožní jeho vícenásobnou fragmentaci.

### 2.3.5 Stanovení koncentrace bílkovin v biologickém vzorku

Pro stanovení koncentrace bílkoviny v biologickém materiálu lze použít tyto postupy: metody dle Biureta, Folina, Lowryho, Bradfordové, Bicinchoninic acid (BCA) nebo postupy využívající fluorescence.

Velmi často používanou metodou je stanovení dle Bradfordové [49]. Velkou výhodou této metody je rychlost a vysoká citlivost, která umožňuje měřit koncentrace proteinů v rozmezí 25  $\mu\text{g/ml}$  až do 200  $\mu\text{g/ml}$ . Tuto metodu nelze použít pro proteiny, které mají zůstat v nativním stavu, jelikož při užití tohoto postupu dojde k denaturaci bílkovin. Další nevýhodou je rozdílná afinita proteinů k činidlu Bradfordové. Princip metody spočívá v reakci barviva (činidlo Bradfordové) a proteinů, které jsou v prostředí kyseliny fosforečné. Výsledkem je kolorimetrická změna výsledného roztoku, jež se spektrofotometricky hodnotí oproti blanku při vlnové délce 595 nm. Jestliže se absorbance pohybuje v rozmezí 0,2 až 0,8 je kalibrační křivka lineární a v tomto rozsahu je zbarvení roztoku přímo úměrné koncentraci bílkoviny ve vzorku.

Vysoce citlivé metody jsou i ty, jež využívají fluorescenčního stanovení například Nano Orange, firmy Invitrogen. Principem fluorescenčních metod je reakce primárních aminoskupin v proteinu (Lys, N-koncová aminoskupina) s orto – ftalaldehydem. Touto metodou je možno měřit bílkoviny v koncentracích pod 10  $\text{ng/ml}$  a citlivost je možno zvýšit hydrolyzou proteinů před vlastním měřením. Pufry s obsahem primárních

aminoskupin (Tris) u tohoto postupu interferují, proto je doporučeno při stanovování použít spíše borátové pufrů. Vzorky se spektrofotometricky měří po přidavku hydroxidu sodného a excitační maximum je při vlnové délce 340 nm. Vzorky měříme pouze jednou, jelikož vícenásobné měření snižuje intenzitu fluorescence [50].

Analýza vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie často vyžaduje znalost koncentrace peptidů. V práci Kapoor et al. [51] jsou popisovány metody kvantifikace peptidů ve vzorku, a to úpravou klasického metodického postupu, užívaného pro BCA metodu. Principem metody BCA je využití sodných solí kyseliny bincichoninové (BCA), která komplexuje ionty mědi, tvořené reakcí peptidové vazby s mědí. Činidlo se připravuje smísením roztoků sodné soli BCA v alkalickém prostředí (50 dílů) a CuSO<sub>4</sub> (1 díl) [50]. U modifikovaného postupu se jedná o přidání zásobního roztoku, obsahujícího směs 0,2 M NaOH a 2 % SDS. 50 μl zásobního roztoku se smíchá s 50 μl vzorku. Poté se nechá směs inkubovat po dobu 5 minut na 95 °C. Po inkubaci se nechá vzorek zchladit na laboratorní teplotu a poté se z něj odebere 25 μl, napipetuje se na mikrotitrační destičku a k tomuto množství se přidá 200 μl BCA činidla. Činidlo se vzorkem se inkubuje 30 minut při 37°C a absorbance je měřena při 570 nm. Tento postup s výhodou eliminuje peptidovou variabilitu u BCA metody, které jsou způsobeny peptidovou délkou a hydrofilickým skóre. Kalibrační křivka je lineární v rozmezí 0,01 až 1 mg/ml [50].

### **2.3.6 Identifikace proteinů v roztoku hmotnostní spektrometrií**

Pracovní postup pro identifikaci proteinů v roztoku pomocí MALDI-TOF je započat technikou peptidové mapování. Analyzovaný protein je štěpen specifickou proteasou, trypsinem. Vzniklé peptidy se stanovují MALDI-TOF spektrometrií. Výsledná hmotnostní spektra se srovnávají s hmotností peptidů vzniklých stejným způsobem známé bílkoviny. Aplikace matrice na destičku se provádí buď smícháním roztoku vzorku s roztokem matrice s následnou nanáškou na kovovou destičku, nebo se nejprve nanese roztok matrice, která se nechá odpařit a pak se nanese malý objem vzorku. Vlastní měření spočívá v dopadu krátkých laserových pulsů na destičku s nanesenými vzorky. Na monitoru je možné sledovat spektra vzniklá po každém dopadu laseru a upravovat jejich poměr mezi signálem a šumem, a tím dosáhnout spekter s nejvyšším rozlišením. Jako první se vždy měří standardy, které zajišťují přesnost vzniklého spektra [48]. Vyhodnocení probíhá prostřednictvím internetových databází ProteinProspectoru, Mascot či Aldente.

Tyto databáze využívají srovnání s NCBI proteinovou databází. Konečným výsledkem analýzy je skóre, určující spolehlivost výsledku, procento pokrytí aminokyselinové sekvence, název proteinu, organismus a teoretickou molekulovou hmotnost.



### **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

## 3.1 MATERIÁL

### 3.1.1 Biologický materiál:

- bakterie *F. tularensis* kmen FSC200 získaná z FOI Umeå, Švédsko

### 3.1.2 Přístroje a pomůcky:

- ABI fólie, optical adhesive film, MicroAmp, Invitrogen, Californie, USA
- Analytické váhy, Mettler Toledo, XP 204, Greinfese, Švýcarsko
- Automatické mikropipety, Eppendorf Research, Hamburg, Německo
- Cell densitometr, CO8000 Cell density meter, WPA Biowave, Cambridge, Velká Británie
- Centrifuga, CL31R Multispeed, JOUAN, Francie
- Centrifuga, BR4i, JOUAN, Francie
- ELISA Reader, multidetektor magic XBC, Paradigm, Beckman-Coulter, Californie, USA
- Extraction cartridges, 10 mg Oasis, Waters Corporation, Milford, USA
- Hmotnostní spektrometr, 4800 MALDI-TOF/TOF<sup>TM</sup>, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA
- Hmotnostní spektrometr CapLC Q-TOF Ultima API; Waters, Manchester, USA
- Hlubokomrazící laboratorní box VX 380E, JOUAN, Francie
- Laminární box S@FE FLOW 1.2, Bio-air Instruments, Siziano, Itálie
- Lázeň digitální bloková 2, Grant, Velká Británie
- McLeod plotny, Ústav molekulární patologie, Hradec Králové
- Mikrotitrační destička, test plate 96 jamková, TPP, Švýcarsko
- Minishaker, IKA, Wilmington, Severní Karolína, USA
- Orbitální třepačka, Cymatics, Naperville, Illinois, USA
- Odstředivka MiniSpin plus, Eppendorf, Hamburg, Německo
- pH metr, inoLab Level 2, Wiessenschaftelich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Německo
- Rychlováhy NAGATA AK 1500, Nagata Seiki Co., Ltd, Niigata-Ken, Japonsko
- Speed Vac, Eppendorf, Hamburg, Německo

- Termomixér, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Vac Elut 20 Manifold, Agilent, Kanada
- Běžný laboratorní materiál: běžný laboratorní materiál: plastové zkumavky, zátky na baňky, plastové pipety, odměrné válce, injekční stříkačky, filtry

### 3.1.3 Chemikálie:

- ACN, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Alfa-kasein, Sigma-Aldrich, St.Louis, Montana, USA
- Quantipro BCA assay kit, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- BSA, albumin from bovine serum, lyophilized powder, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Hydrogenuhlíčitán amonný, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Hydroxid sodný, Merck, Darmstadt, Německo
- Chlorid sodný, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Chlorid vápenatý, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- IAA, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- D-arabinoza, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Deionizovaná voda, Hradec Králové
- DTT, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Chamberlainovo médium, Hradec Králové
- $\alpha$ -kyano-4hydroxy skořicová kyselina, LaserBio Labs, Francie
- Kyselina mravenčí, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Protein Standard, Micro Standard, Sigma-Aldrich, St.Louis, Montana, USA
- SDS, Bio-Rad, Richmond, Kalifornie, USA
- TFA, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- TRIS-HCl, Sigma, St.Louis, Montana, USA
- Trypsin, Promega, Madison, Wisconsin, USA
- Voda pro chromatografii LiChrosolv®, Merck

### 3.1.4 Roztoky, pufry:

#### Uhličitanový pufr (pH 8):

50 mM NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> ( 0,195 g)  
doplnit do 50 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### 0,1 M roztok DTT:

3,1 mg DTT  
doplnit 200 µl deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### 2 mM roztok DTT:

0,62 mg DTT  
doplnit 2 ml roztoku B  
uchovávání při + 4 °C

#### 0,5 M roztok IAA

18,4 mg IAA  
doplnit 200 µl deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### 50% roztok ACN

5 ml ACN  
doplnit do 10 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### roztok B (pH 7,6):

20 mM Tris-HCl (0,32 g)  
150 mM NaCl (0,88 g)  
1 M D-arabinoza (15,01 g)  
10 mM CaCl<sub>2</sub> (0,11 g)  
doplnit do 100 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### 80 % roztok ACN

8 ml ACN  
doplnit do 10 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### 0,1 % roztok TFA

0,01 ml TFA  
doplnit do 10 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### Zásobní roztok:

(0,2 M NaOH, 2% roztok SDS):  
80 mg NaOH  
0,2 g SDS  
doplnit do 10 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

#### roztok proteinového standardu:

dodáváno firmou Sigma-Aldrich  
1 mg/ml BSA  
uchovávání při + 4 °C

#### roztok A (pH 7,6):

20 mM Tris-HCl (0,315 g)  
150 mM NaCl (0,877 g)  
doplnit do 1000 ml deionizované vody  
uchovávání při + 4 °C

roztok matrice pro refletronový mód

10 mg/ml CHCA (100 mg)

50 % ACN (5 ml)

0,1 % FA (0,01 ml)

doplnit do 10 ml deionizované vody

roztok pro HPLC:

2 % ACN (2 ml)

98 % vody pro HPLC (98 ml)

0,1 % FA (0,1 ml)

roztok 1 mobilní fáze:

2 % ACN (2 ml)

0,1 % FA (0,1 ml)

doplnit do 100 ml deionizované vody

roztok 2 mobilní fáze:

80 % ACN (80 ml)

0,1% FA (0,1 ml)

doplnit do 100 ml deionizované vody

### **3.1.5 Software:**

- ProteinLynx Global Server 2.1., Waters, Manchester, USA
- Phenix Genebio v. 2.1, Geneva Bioinformatics, Switzerland
- NCBI Inr databáze, verze 22.10.2008, obsahuje 1754 sekvencí

## 3.2 Příprava vzorku

Při vývoji nové metody pro změření koncentrace membránových peptidů bakterie *F. tularensis* FSC200 byl metodický postup testován na standardních vzorcích, u nichž byla známá počáteční koncentrace. Pro tento účel byl použit alfa kasein a BSA.

### 3.2.1 Redukce disulfidových můstků a alkylace SH skupin

Standards alfa kasein a BSA byly naváženy na analytických vahách (0,5 mg) a rozpuštěny v 0,5 ml 50 mM  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  (pH 8). Vzorky byly redukovány 25  $\mu\text{l}$  0,1M roztoku DTT inkubovány v termostatu 30 minut při 60 °C. Po inkubaci byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Pro alkylation SH- skupin bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  0,5 M roztoku IAA. Inkubace s IAA probíhala 45 minut při 25 °C termomixéru bez přístupu světla.

### 3.2.2 Odsolení na kolonách OASIS

Vzorky se nechaly odsolit pomocí SPE extrakce na kolonkách Oasis pro 10 mg. Kolonky se nejprve aktivovaly promývacími roztoky. První se aplikoval 1 ml 80% ACN, pak se kolonka ekvilibrovala 1ml 0,1 % TFA. Poté se nasadil vzorek, opět se aplikoval 1 ml 0,1 % TFA. Jako poslední krok odsolení se přidal 1 ml 80 % ACN.

### 3.2.3 MicroBCA assay

Pro samotné měření koncentrace proteinů se mohou použít dva postupy, klasický a modifikovaný postup microBCA.

Klasický i modifikovaný postup vyžaduje odsolený vzorek peptidů, který se zpracovává společně s kalibračními standardy. Kalibrační standardy se připravily naředěním proteinového standardu, jehož koncentrace je 1 mg/1 ml. Z tohoto standardu se zhotovil proteinový standard o koncentraci 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tak, že se smíchalo 1,9 ml deionizované vody a 0,1 ml proteinového standardu o koncentraci 1 mg/ml. Tento standard se pak použil na přípravu kalibrační řady pro QuantiProBCA assay kit následovně:

koncentraci 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ :

1200  $\mu\text{l}$  deionizované vody + 800  $\mu\text{l}$  proteinového standardu o koncentraci 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,

koncentraci 10 µg/ml:

1600 µl deionizované vody + 400 µl proteinového standardu o koncentraci 50 µg/ml,

koncentraci 5 µg/ml:

1800 µl deionizované vody + 200 µl proteinového standardu o koncentraci 50 µg/ml,

koncentraci 2 µg/ml:

1920 µl deionizované vody + 80 µl proteinového standardu o koncentraci 50 µg/ml,

koncentraci 1 µg/ml:

1960 µl deionizované vody + 40 µl proteinového standardu o koncentraci 50 µg/ml,

slepá:

2000 µl deionizované vody.

Takto naředěné standardy se pipetovaly v duplikátech na mikrotitrační destičku v množství 150 µl. Příslušné vzorky se naředily do koncentrace, která bude ležet v rozsahu kalibrační křivky, což je 0 – 20 µg. Kontrolní vzorky se ředily deionizovanou vodou 50x a 150x, což znamená, že se smíchalo 147 µl deionizované vody a 3 µl vzorku a 149 µl deionizované vody a 1 µl vzorku (viz obrázek č. 5). Připravil se roztok činidla pro microBCA assay. Jednotlivé složky činidla QA : QB : QC se smíchaly v poměru 25 : 25 : 1. Do každé jamky na mikrotitrační destičce se přidá 150 µl činidla pro microBCA assay.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	STD 1	STD 1	B 150x	B 150x	B 50x	B 50x						
B	STD2	STD2	V1 150x	V1 150x	V1 50x	V1 50x						
C	STD 3	STD 3	V2 150x	V2 150x	V2 50x	V2 50x						
D	STD 4	STD 4	V3 150x	V3 150x	V3 50x	V3 50x						
E	STD 5	STD 5	V4 150x	V4 150x	V4 50x	V4 50x						
F	Blank	Blank										
G												
H												

Obrázek č.5: Schématické rozmístění vzorků na 96 jamkové mikrotitrační destičce připravené pro měření mikroBCA.

Legenda

STD – standarda

B a V1-4 – vzorky

Blank – slepý vzorek

50x a 150x - ředění vzorků

Mikrotitrační destička se přikryla ABI fólií, zakryla víčkem a směs se nechala v termomixéru inkubovat 60 minut při 60 °C a 800 rpm. Po skončení inkubace se destička centrifugovala, 4 minuty při 30 °C na 400 g. Takto stočená destička se nechala analyzovat ELISA readerem. Absorbance se měřila při 562 nm.

Modifikovaný postup ředí vzorky zásobním roztokem, obsahujícím 0,2 M NaOH s 2 % SDS. 50 µl zásobního roztoku se přidá k 50 µl vzorku a směs se zahřála v termobloku na 95 °C po dobu 5 minut. Po zahřátí se směs nechala vychladnout na laboratorní teplotu. Takto připravené vzorky se pipetovaly na mikrotitrační destičku ve stejném množství jako je uvedeno v klasickém postupu.

### **3.2.4 Ověření enzymatického štěpení standardních vzorků**

Standardní vzorky, alfa kasein a BSA byly štěpeny trypsinem, odsoleny a peptidové štěpy byly měřeny hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF/TOF. Tímto postupem bylo pouze ověřeno správné:

- 1) štěpení proteinu trypsinem
- 2) metoda odsolení vzorků
- 3) mez detekce peptidů na hmotnostním spektrometru.

Odsolené peptidové vzorky byly zakoncentrovány na vakuové centrifuze SpeedVac a nakápnuty na MALDI destičku (0.8 µl). Po uschnutí vzorků na ně bylo nakápnuto stejné množství matrice CHCA. Po vykrytalování vzorku s matricí byla MALDI destička vložena do hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním reflektornovém módu s delayed extraction. Ionizace probíhala pomocí Nd:YAG laseru (335 nm). Hmotnostní spektra byla měřena v rozmezí 700-4000 m/z. Kalibrace probíhala interně za využití monoizotopických  $[M+H]^+$  iontů autoproteolytických fragmentů trypsinu (842.5 and 2211.1 Da).

### **3.2.5 Kultivace bakterií *F. tularensis* s/bez trypsinu a měření koncentrace peptidů uvolněných do supernatantu**

Bakterie *F. tularensis* FSC200 narostlé na plotnách Mc Leod se nasadily do 80 ml Chamberlainova média [57]. Po 12 hodinové inkubaci se kultivace ukončila a vzniklá suspenze se nechala 15 minut centrifugovat na 6500 rpm a při 24 °C. Po proběhlé centrifugaci se supernatant odstranil rychlým slitím do odpadu a sediment se resuspendoval v 5 ml předeřhátého Chamberlainova média. Poté se vzorky umístily do inkubátoru a kultivovaly dalších 6 hodin.

Po ukončení kultivace se vzorky centrifugovaly 15 minut na 6500 rpm při 24 °C. Po centrifugaci se supernatant odstranil rychlým slitím do persterilu. Bakteriální sediment se promýval roztokem A (20 mM Tris-HCl a 150 mM NaCl), ohřátým na laboratorní



teplotu. Dvakrát se promývalo 40-ti ml roztoku A a posléze se nechaly zcentrifugovat při 6500 rpm, 15 min při 24°C. Po druhém promytí a vylití supernatantu se přidalo k sedimentu 1 ml roztoku A, ve kterém se resuspendoval bakteriální vzorek. Ten se nechal zcentrifugovat na 7000 rpm, 15 min při 24 °C. Po centrifugaci se supernatant odlil do persterilu. Vzorčky se rozdělily do 8 zkumavek po čtyřech do dvou skupin. V jedné skupině byly bakterie s přidavkem trypsinu a v druhé bez přidavku trypsinu. Bakterie bez přidavku trypsinu sloužily jako kontrola ke skupině s trypsinem. Do vzorků s kontrolou se pipetovalo 500 µl roztoku B (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 M D-arabinoza, 10 mM DTT). U vzorků, do kterých se přidával trypsin, se do roztoku B přidal 1 ml 2 mM DTT (na 40 µg trypsinu). Pak se pipetovalo 500 µl upraveného roztoku B s DTT do čtyř vzorků s bakteriálním sedimentem a resuspendoval se. To samé bylo provedeno s roztokem B u kontrolních vzorků, pH papírkem se zkontrolovalo pH ( $\pm 7,8$ ).

Inkubace s a bez trypsinu se provedla v následujících časových intervalech: 30 minut a 60 minut, při druhém pokusu se vzorky kultivovaly po dobu 0; 10; 20; 30 a 60 minut (kontrolní vzorky se inkubovaly stejnou dobu jako vzorky s trypsinem). Inkubovalo se při 36,8 °C v inkubátoru dle výše uvedených časových intervalů. Po inkubaci se vzorky zcentrifugovaly při 12 000 rpm po dobu 15 minut. Zcentrifugovaný supernatant se odebral a sediment se zlikvidoval přelitím do persterilu. Odebraný supernatant se přefiltroval přes filtr velikosti 0,22 µm. Vzorčky se uložily do mrazícího zařízení, a to při teplotě - 40 °C.

### **3.2.6 Identifikace peptidových fragmentů „gel free“ metodami**

#### **3.2.6.1 HPLC**

Peptidové vzorky byly nejprve odpařeny do sucha pomocí vakuové centrifugy Speed Vac a naředěny do 20 µl roztokem obsahujícím 2% acetonitrilu, 98 % vody pro HPLC a 0.1 % kyseliny mravenčí (FA). Separace byla provedena na kapalinovém chromatografu CapLC (Waters) spojeném on-line s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Ultima API (Waters). Peptidy byly nastříknuty na předkolonu Atlantis dC18 5µm NanoEase Trap Column a pak separovány na koloně Atlantis dC18 3µm, 0.075 × 150 mm NanoEase Column (Waters). Složení mobilní fáze bylo: roztok 1, 2 % acetonitrilu, 0.1 % FA a roztok 2, 80 % acetonitrilu, 0.1 % FA. Separace probíhala v lineárním gradientu

tvořeném zvyšování roztoku 2 z 5 na 35 % v intervalu 120 minut s následným promýváním 90% roztoku 2 po dobu 22 minut při průtoku 0.2 µL/min.

### 3.2.6.2 Hmotnostní spektrometrie

Separované peptidy z CapLC byly on-line přivedeny k ionizačnímu zdroji ESI. Vzniklé ionty byly nejprve skenovány v MS módu a pak dvakrát, třikrát a čtyřikrát nabitě ionty byly automaticky selektovány pro MSMS měření, z každé MS skenu byly vybrány maximálně tři. Jejich fragmentace argonem probíhala v kolizní cele. Data Directed Analysis probíhala po dobu 150 min, v pozitivním ES<sup>+</sup> módu. Naměřená data byla procesována pomocí softwaru ProteinLynx Global Server 2.1 následujícím způsobem: surová data byla vyhlazena (metodou Savitzky-Golay, 3 cykly), deizotopována a vycentrována (v 80 % výšky píku).

#### Vyhodnocení MS dat

Identifikace proteinů byla provedena pomocí softwaru Phenyx Genebio v.2.1 prohledáváním proti proteinové databázi *F. tularensis* subsp. *holarctica* (stažená z NCBI Inr databáze). Pro vyhledávání bylo dále použito následujících parametrů: štěpení trypsinem s povolením maximálně jednoho neštěpeného místa, fixní modifikace cysteinů karbamidoethylací, povolená oxidace methioninu, maximální odchylka *m/z* mateřského iontu 80 ppm.

## **4 VÝSLEDKY**

Cílem této diplomové práce byl vývoj nové metody, která by umožňovala měření koncentrace membránově lokalizovaných peptidů bakterie *Francisella tularensis*. Pro tento úkol byly k dispozici dva možné postupy pro měření koncentrací. Byla srovnána citlivost klasického a modifikovaného postupu pro microBCA assay. Součástí této diplomové práce byla též identifikace naštěpených peptidových fragmentů „gel free“ metodami. Tento LC-MS přístup je vhodný z důvodu přílišné hydrofobicity [9], která znesnadňuje identifikaci membránových proteinů pomocí gelových technik.

Pro zjištění výhodnějšího postupu pro měření koncentrace membránových peptidů bakterie, byly tyto techniky nejprve vyzkoušeny na kontrolních proteinových vzorcích. Jednalo se o alfa kasein a BSA, které byly připraveny dvakrát podle postupu 3.2.1. a 3.2.2.

Nejprve byla změřena bílkovina ve zhotovených kontrolních vzorcích pomocí klasického postupu microBCA assay kitu. Poté se připravila kalibrační řada podle kapitoly 3.2.3. Kontrolní vzorky byly naředěny deionizovanou vodou tak, aby alespoň jedno ředění bylo v rozsahu kalibrační křivky, která se nachází v rozmezí koncentrace 0 – 20 µg/ml. Vzorky byly ředěny 150x a 50x (viz kapitola 3.2.3.). Takto naředěné vzorky se spolu s roztoky kalibrační křivky zpracovaly podle postupu 3.2.3. Výsledné naměřené koncentrace alfa kaseinu i BSA jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Koncentrace alfa kaseinu a BSA naměřené klasickým a modifikovaným microBCA assay

Vzorky	Koncentrace v µg/ml
B 1	771,2
B 2	641,7
K 1	2643,9
K 2	2926,4

Legenda:

B 1 – 1.vzorek BSA

B 2 – 2. vzorek BSA

K1 – 1. vzorek alfa kaseinu

K 2 – 2. vzorek alfa kaseinu

Jelikož měření bylo úspěšné, byl pokus zopakován a byl otestován modifikovaný postup microBCA pro oba proteinové vzorky. Protože byla zjištěna vysoká koncentrace u alfa kaseinu, pro další pokus se tento vzorek zředil deionizovanou vodou v poměru 1:1. Byla připravena kalibrační řada podle postupu 3.2.3. Konečné ředění bylo u vzorků BSA

50x a 150x a pro alfa kasein 300x a 100x. Takto naředěné vzorky byly spolu s roztoky kalibrační křivky zpracovány podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3.

Pro měření modifikovaným postupem byly použity oba vzorky BSA i oba vzorky alfa kaseinu ředěného 1 : 1. Při jejich zpracování se postupovalo podle kapitoly 3.2.3. Výsledné koncentrace alfa kaseinu i BSA naměřené klasickým a modifikovaným postupem jsou uvedeny v tabulce č.2.

Tabulka č. 2: Koncentrace alfa kaseinu a BSA měřené klasickým a modifikovaným postupem

Vzorky	Koncentrace v $\mu\text{g/ml}$
B1	645,8
B2	431,5
K1	2390,6
K2	2663,1
BM1	712,9
BM2	681,8
KM1	2004,0
KM2	2251,5

Legenda:

B1– první vzorek BSA změřen klasickým postupem

B2 – druhý vzorek BSA změřen klasickým postupem

K1 – první vzorek alfa kaseinu změřen klasickým postupem

K2 – druhý vzorek alfa kaseinu změřen klasickým postupem

BM1 – první vzorek BSA změřen modifikovaným postupem

BM2 – druhý vzorek BSA změřen modifikovaným postupem

KM1 – první vzorek alfa kaseinu změřen modifikovaným postupem

KM2 – druhý vzorek alfa kaseinu změřen modifikovaným postupem

Aby bylo možné zjistit mez detekce, byla připravena ředící řada kontrolních vzorků. Díky známe koncentraci kontrolních vzorků (BSA 700  $\mu\text{g/ml}$  a alfa kasein 1000  $\mu\text{g/ml}$ ), byla ředící řada zvolena následovně:

BSA bylo ředěno na koncentrace 700 $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ , 300  $\mu\text{g/ml}$  a 100 $\mu\text{g/ml}$ . Alfa kasein byl ředěn v koncentracích 1000  $\mu\text{g/ml}$ , 800  $\mu\text{g/ml}$ , 600  $\mu\text{g/ml}$ , 400  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorky byly ředěny deionizovanou vodou a to v těchto objemech:

BSA 700  $\mu\text{g/ml}$

odebráno 50  $\mu\text{l}$  vzorku

500 µg/ml

ze 700 µg/ml BSA odebráno 60 µl, které se smíchaly s 24 µl deionizované vody

300 µg/ml

ze 700 µg/ml BSA odebráno 36 µl, které se smíchaly s 48 µl deionizované vody

100 µg/ml

ze 700 µg/ml BSA odebráno 12 µl, které se smíchaly s 72 µl deionizované vody.

Alfa kasein 1000 µg/ml

odebráno 50 µl vzorku

800 µg/ml

z 1000 µg/ml alfa kaseinu odebráno 64 µl, které se smíchaly s 16 µl deionizované vody

600 µg/ml

z 1000 µg/ml alfa kaseinu odebráno 48 µl, které se smíchaly s 32 µl deionizované vody

400 µg/ml

z 1000 µg/ml alfa kaseinu odebráno 32 µl, které se smíchaly s 48 µl deionizované vody

200 µg/ml

z 1000 µg/ml alfa kaseinu odebráno 16 µl, které se smíchaly s 64 µl deionizované vody

100 µg/ml

z 1000 µg/ml alfa kaseinu odebráno 8 µl, které se smíchaly s 72 µl deionizované vody.

Vzhledem k výsledkům z minulého měření koncentrací se rozhodlo pro ředění vzorků 150x, 50x; kromě koncentrace 100 µg/ml, které byly ředěny 50 a 25x. Na miktrotitrační destičku se pipetovalo v případě ředění 150x 1 µl vzorku a 149 µl deionizované vody, v případě ředění 50x 3 µl vzorku a 147 µl deionizované vody, v případě ředění 25x 6 µl vzorku a 144 µl deionizované vody. Takto připravené vzorky se spolu s roztoky kalibrační křivky zpracovaly podle postupu popsáném v kapitole 3.2.3. Naměřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č.3: Ředící řada alfa kaseinu a BSA pro měření jejich koncentrace klasickým a modifikovaným postupem microBCA assay

Vzorky	Koncentrace v $\mu\text{g/ml}$
B1 700 $\mu\text{g/ml}$	657,0
B1 500 $\mu\text{g/ml}$	437,4
B1 300 $\mu\text{g/ml}$	57,8
B1 100 $\mu\text{g/ml}$	117,9
B2 700 $\mu\text{g/ml}$	671,9
B2 500 $\mu\text{g/ml}$	491,8
B2 300 $\mu\text{g/ml}$	331,9
B2 100 $\mu\text{g/ml}$	105,6
BM1 700 $\mu\text{g/ml}$	695,7
BM1 500 $\mu\text{g/ml}$	526,9
BM1 300 $\mu\text{g/ml}$	475,9
BM1 100 $\mu\text{g/ml}$	189,9
BM2 700 $\mu\text{g/ml}$	592,0
BM2 500 $\mu\text{g/ml}$	651,8
BM2 300 $\mu\text{g/ml}$	529,6
BM2 100 $\mu\text{g/ml}$	220,2

Vzorky	Koncentrace v $\mu\text{g/ml}$
K1 1000 $\mu\text{g/ml}$	970
K1 800 $\mu\text{g/ml}$	1021,3
K1 600 $\mu\text{g/ml}$	767,3
K1 400 $\mu\text{g/ml}$	351,9
K1 200 $\mu\text{g/ml}$	378,6
K1 100 $\mu\text{g/ml}$	209,6
K2 1000 $\mu\text{g/ml}$	958,2
K2 800 $\mu\text{g/ml}$	1191,5
K2 600 $\mu\text{g/ml}$	991,7
K2 400 $\mu\text{g/ml}$	476,9
K2 200 $\mu\text{g/ml}$	430,7
K2 100 $\mu\text{g/ml}$	125,9
KM1 1000 $\mu\text{g/ml}$	862,8
KM1 800 $\mu\text{g/ml}$	713,2
KM1 600 $\mu\text{g/ml}$	685,6
KM1 400 $\mu\text{g/ml}$	436,7
KM1 200 $\mu\text{g/ml}$	331,3
KM1 100 $\mu\text{g/ml}$	211,6
KM2 1000 $\mu\text{g/ml}$	661,1
KM2 800 $\mu\text{g/ml}$	863,3
KM2 600 $\mu\text{g/ml}$	700,9
KM2 400 $\mu\text{g/ml}$	552,9
KM2 200 $\mu\text{g/ml}$	414,9
KM2 100 $\mu\text{g/ml}$	195,3

Legenda:

B1 – 1. vzorek BSA měřený klasickým postupem

B2 – 2. vzorek BSA měřený klasickým postupem

BM1 – 1. vzorek BSA měřený modifikovaným postupem

BM2- 2. vzorek BSA měřený modifikovaným postupem

K1 – 1. vzorek alfa kaseinu měřený klasickým postupem

K2 – 2. vzorek alfa kaseinu měřený klasickým postupem

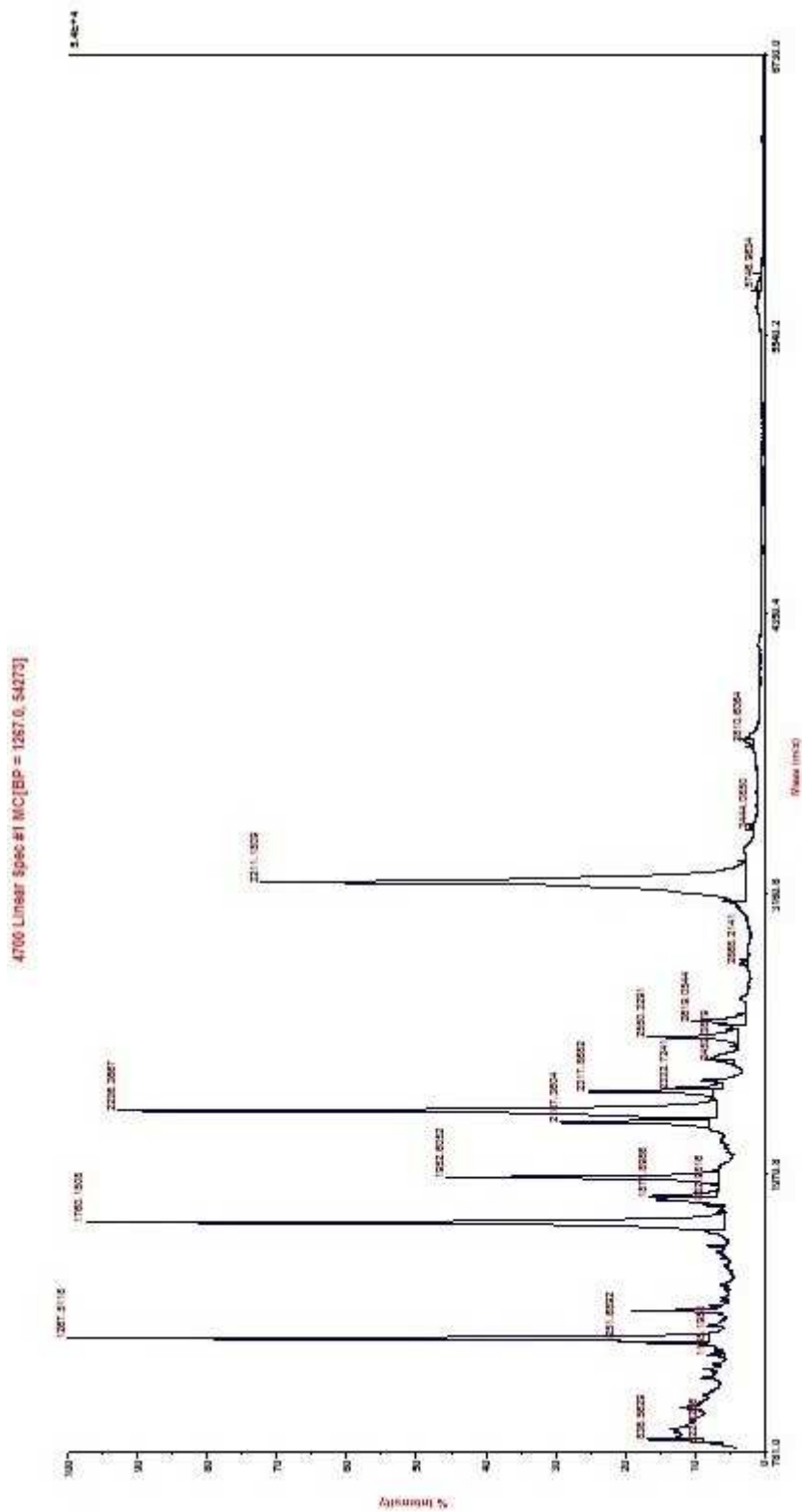
KM1 –1. vzorek alfa kaseinu měřený modifikovaným postupem

KM2 – 2.vzorek alfa kaseinu měřený modifikovaným postupem

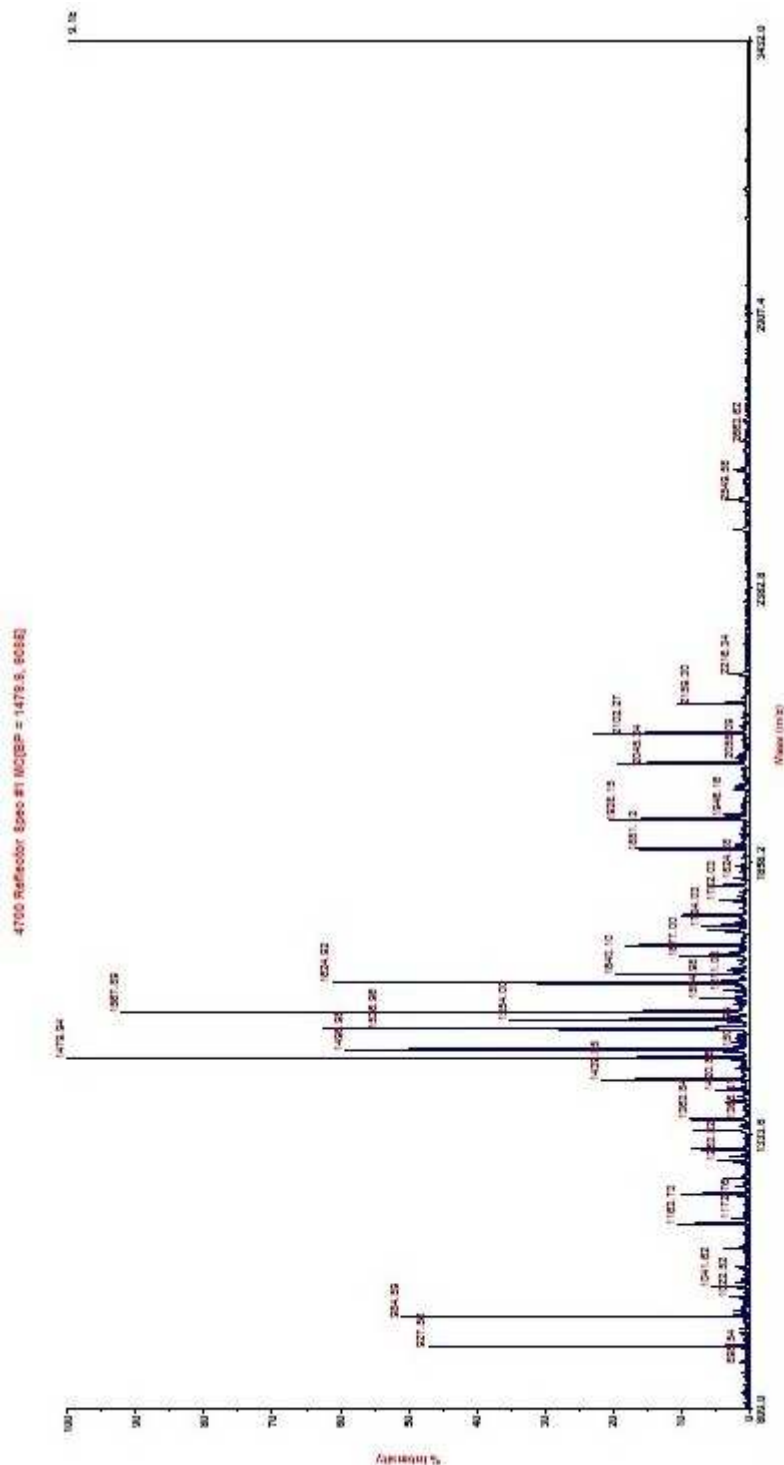
Standardní vzorky, alfa kasein a BSA byly štěpeny trypsinem, odsoleny a peptidové štěpy byly měřeny hmotnostním spektrometrem MALDI-TOFTOF. Tímto postupem bylo pouze ověřeno správné štěpení proteinu trypsinem, metoda odsolení vzorků a mez detekce peptidů na hmotnostním spektrometru.

Odsolené peptidové vzorky byly zakoncentrovány na vakuové centrifuze SpeedVac a nakápnuty na MALDI destičku (0.8  $\mu$ l). Po uschnutí vzorků na ně bylo nakápnuto stejné množství matrice CHCA. Po vykrystalování vzorku s matricí byla MALDI destička vložena do hmotnostního spektrometru. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním reflektroevém módu s delayed extraction. Ionizace probíhala pomocí Nd:YAG laseru (335 nm). Hmotnostní spektra byla měřena v rozmezí 700-4000 m/z. Kalibrace probíhala interně za využití monoizotopických  $[M+H]^+$  iontů autoproteolytických fragmentů trypsinu (842.5 and 2211.1 Da). Výsledná spektra jsou uvedena na obrázcích č. 6 (alfa kasein) a č.7 (BSA).





Obrázek č. 6: Hmotnostní spektrum trypsinem štěpeného alfa kaseinu. Hmotnostní spektrum bylo změřeno v pozitivním reflektornovém módu MALDI-TOF/TOF.



Obrázek č. 7: Hmotnostní spektrum trypsinem štěpeného BSA. Hmotnostní spektrum bylo změřeno v pozitivním refletronovém módu MALDI-TOF/TOF.

Jelikož se ukázalo, že s modifikovaným postupem měly výsledné hodnoty koncentrací větší odchylku než u klasického postupu, bakteriální vzorky byly měřeny jen podle klasického postupu pro microBCA assay.

Bakteriální vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.5. V prvním pokusu trypsin působil na bakteriální vzorky působit po dobu 30 a 60 minut. Stejnou dobu byly kultivovány i vzorky, které nebyly ošetřeny trypsinem. Tyto vzorky spolu s proteinovým standardem (BSA) byly odsoleny podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. Poté bylo provedeno měření bílkoviny pomocí microBCA assay. Vzorky byly ředěny 50x, 25x a 10x deionizovanou vodou, což znamená, že při ředění 50x byly v mikrotitrační destičce smíchány 3  $\mu$ l vzorku a 147  $\mu$ l deionizované vody; při ředění 25x se smíchalo 6  $\mu$ l vzorku a 144  $\mu$ l deionizované vody; při ředění 10x se smíchalo 15  $\mu$ l vzorku a 135  $\mu$ l deionizované vody. Tyto objemy se napipetovaly na mikrotitrační destičku společně se 150  $\mu$ l činidla microBCA assay kitu. Takto připravené vzorky se spolu s roztoky kalibrační křivky zpracovaly podle postupu popsáném v kapitole 3.2.3. Výsledné koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Koncentrace bakteriálních peptidů změřených microBCA klasickým způsobem

Vzorky	Koncentrace peptidových fragmentů v $\mu$ g/ml
BSA 500 $\mu$ g/ml	71,9
V 1	31,7
V 2	53,0
V 3	78,7
V 4	83,9

Legenda:

- V1 – vzorek s 30 minutovou inkubací bez trypsinu
- V2 – vzorek s 60 minutovou inkubací bez trypsinu
- V3 – vzorek s 30 minutovou inkubací s trypsinem
- V4 – vzorek s 60 minutovou inkubací s trypsinem

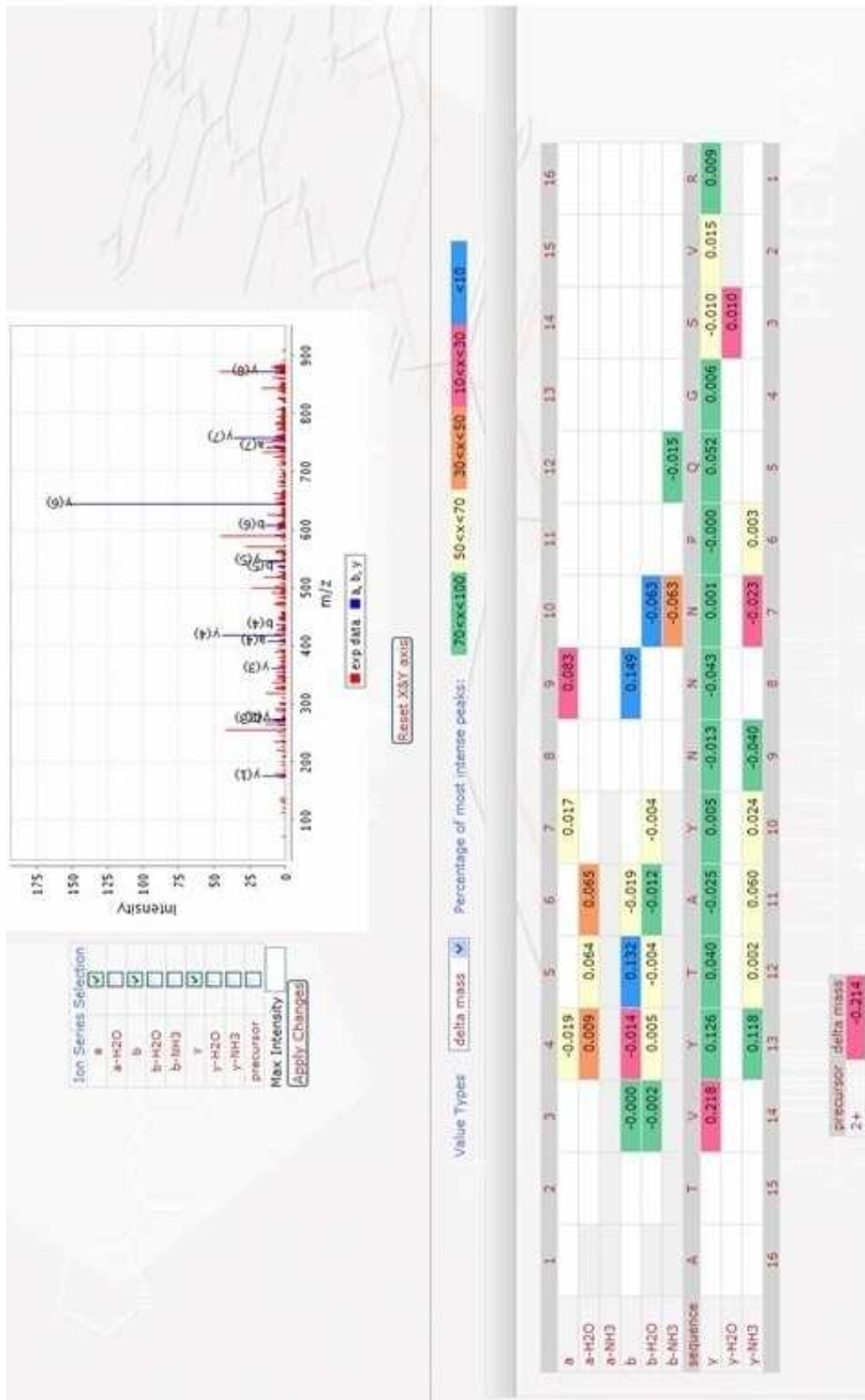
V této tabulce je názorně vidět, že bakteriální suspenze, která byla podrobena delší proteolýze trypsinem vykazuje vyšší hodnoty uvolněných peptidových fragmentů. Identifikaci předcházela separace kapalinovou chromatografií, jejíž postup je uveden v kapitole 3.2.6.1. Takto separovaný vzorek byl analyzován pomocí hmotnostní

spektrometrie, jejíž postup je uveden v kapitole 3.2.6.2. V hmotnostním spektru vzorku po 60 minutové inkubaci byly nalezeny dva peptidy, **ATVYTAYNNNPQGSVR** a **DTAAATATTEQAAAVSKPTAK**, z 17 kDa major membrane proteinu *F. tularensis* kmen FSC200. Hmotnostní spektra byla hodnocena pomocí programu Phenix Genebio v. 2.1 a k prohledávání byla použita NCBI Inr databáze. Na výstupu z programu Phenix je zobrazena aminokyselinová sekvence proteinu (obrázek č. 8), zeleně označena část patřící identifikovanému peptidu, dále je např. uvedena pozice peptidu v sekvenci (71-86), p-value ( $2.41 \times 10^{-28}$ ), z-skóre (11.23) a pokrytí aminokyselinové sekvence (11%).

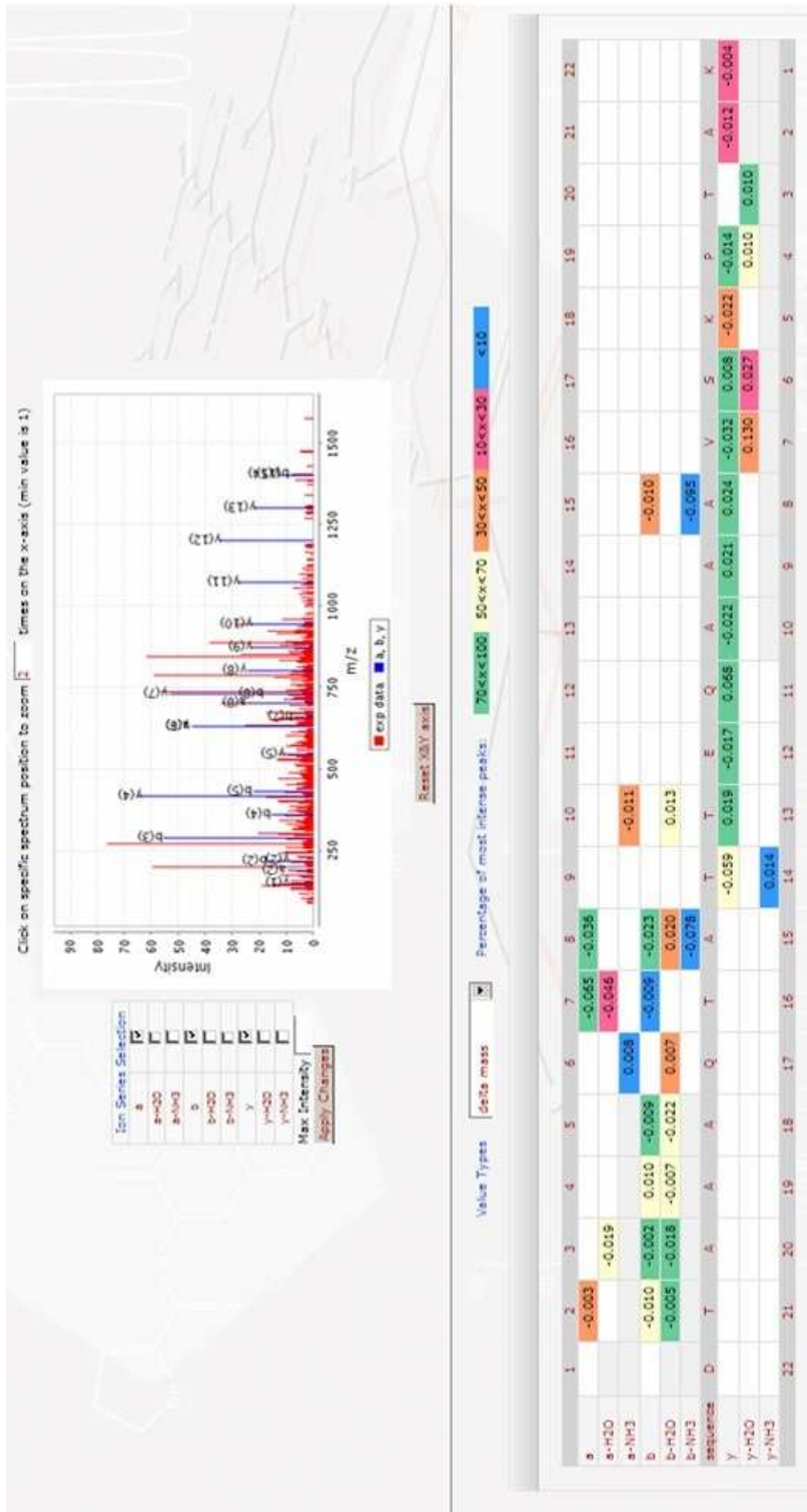


Obrázek č. 8: Zobrazení výsledku identifikace peptidu ATVYTAYNNNPQGSVR ze 17 kDa major membrane proteinu *F. tularensis* kmen FSC200. Na výstupu z programu Phenix jsou zobrazeny parametry identifikace peptidu z dat naměřených hmotnostním spektrometrem Q-TOF

Na obrázku č. 9 je uvedeno MSMS fragmentační spektrum identifikovaného peptidu (ATVYTAYNNNPQGSVR) společně s tabulkou, udávající série iontových fragmentů nalezených ve spektru. Obrázek č. 10 znázorňuje MSMS fragmentační spektrum druhého identifikovaného peptidu, DTAAATATTEQAAAVSKPTAK.



Obrázek č.9: MSMS spektrum bakteriálního peptidu ATVYTA YNNNPQGSVR. Pod spektrem se nachází tabulka se sériemi iontových fragmentů, nalezených v MSMS spektru.

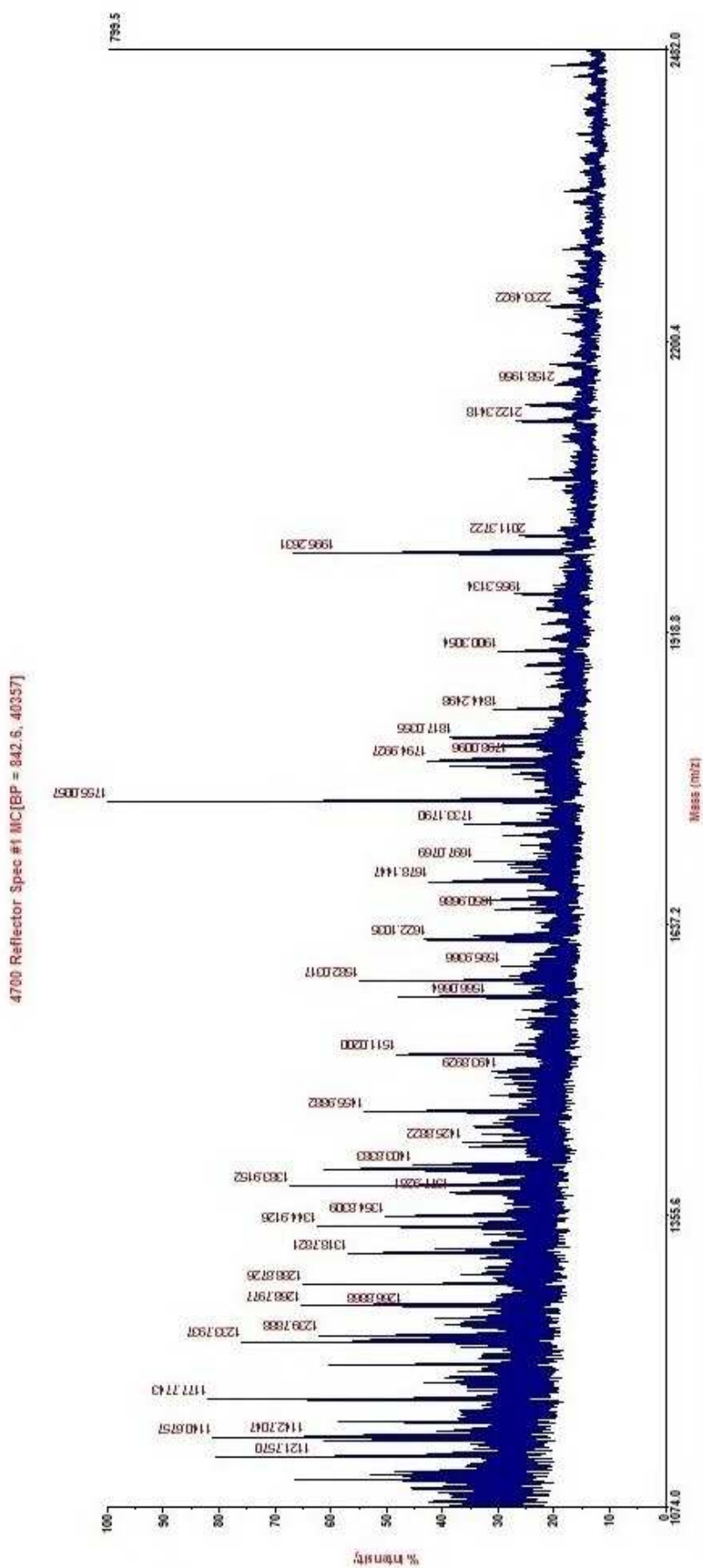


Obrázek č. 10: MSMS spektrum bakteriálního peptidu DTAAATATTEQAAA VSKPTAK. Pod spektrem se nachází tabulka se sériemi iontových fragmentů, nalezených v MSMS spektru.

Protože měření bylo úspěšné, byl pokus opakován se změnou časových intervalů působení trypsinu. Byly zvoleny následující časové intervaly: 10, 20, 30 a 60 minut. Ve stejných intervalech byly kultivovány vzorky, které nebyly ošetřeny trypsinem. Vzorky byly připraveny podle protokolu popsaného v kapitole 3.2.5. Po kultivaci byly vzorky a kontrolní proteinový vzorek BSA o koncentraci 500 µg/ml zbaveny soli postupem uvedeným v kapitole 3.2.2. V získaných vzorcích byla změřena koncentrace peptidů pomocí microBCA assay kitu. Vzorky byly ředěny 25x a 10x. Při ředění 25x bylo smícháno 6 µl vzorku a 144 µl deionizované vody, při ředění 10x bylo smícháno 15 µl vzorku a 135 µl deionizované vody. Takto naředěné vzorky byly pipetovány v objemu 150 µl na mikrotitrační destičku. K vzorkům se přidalo 150 µl činidla pro microBCA assay kit. Další postup je popsán v kapitole 3.2.3. V tomto experimentu se však nepotvrdila vzrůstající koncentrace peptidů v časových intervalech kultivace bakterie a také nebyly potvrzeny rozdíly mezi vzorky kultivovanými s trypsinem a bez trypsinu (koncentrace peptidů ve vzorcích po kultivaci s trypsinem nebyla vyšší než u vzorků kultivovaných bez trypsinu). Jedním z důvodů mohlo být použití kolonek OASIS při odsolování vzorků, kdy docházelo k uvolnění polymeru a ztrátám biologického materiálu. Řešením by mohlo být použití kolonek Empore C18-SD dodávané firmou Supelco. Z časových důvodů nemohl být experiment zopakován. Bude tedy nutné v dalších experimentech ověřit, zda: (1) uspořádání experimentu je optimální, (2) v časových intervalech kultivace bakterie s trypsinem dochází ke zvyšování koncentrace peptidů, (3) koncentrace peptidů po kultivaci bakterie s trypsinem je vyšší než po kultivaci bez trypsinu.

Pro identifikaci uvolněných peptidových fragmentů bylo použito spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, jejíž postup je uveden v kapitole 3.2.6. V hmotnostních spektrech se objevovaly intenzivní píky trypsinu, které rušily interpretaci spekter. Tento problém lze vyřešit použitím trypsinu navázaného na magnetické částice. Po proteolýze lze trypsin snadno odstranit.

Přesto byly ve vzorku, který byl inkubován 60 minut nalezeny peptidy, jež nebyly nalezeny ve spektrech naměřených u kontrol bez působení trypsinu. Výřez spektra s 60 minutovou inkubací je na obrázku č. 11.



Obrázek č. 11: Hmotnostní spektrum bakteriálního vzorku po 60 minutové inkubaci s trypsinem. Hmotnostní spektrum bylo změřeno v pozitivním reflexionovém módu MALDI-QTOF.



## **5 DISKUZE**

Tato diplomová práce se zabývala vývojem nové metody, která by umožnila měření koncentrací membránově lokalizovaných peptidů intracelulární bakterie *F. tularensis*. Pro srovnání byly k dispozici dva postupy, které by byly pro toto stanovení vhodné. Součástí tématu byla také identifikace uvolněných peptidů z bakteriální membrány, a to pomocí on-line metody kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

Důvodem pro vypracování těchto metod je snaha porozumět patogenním mechanismům *F. tularensis*, které jsou zatím stále nejasné. Anotace genomu prokázala skupinu genů (tzv. ostrov patogenicity), která má podstatný vliv na expresi bílkovin, jež mají prokázaný virulentní potenciál. Pro příklad jsou to proteiny IglC, ClpB a typ IV pili. Nejdůležitější funkcí proteinů IglC a ClpB je umožnění růstu bakterie uvnitř fagosomu hostitelské buňky [9]. Předpokládá se, že ovlivněním těchto proteinů by mohlo dojít k oslabení kmene *F. tularensis*, což by mělo vliv na vývoj humánní vakcíny proti této bakterii. Při studiu virulentních mechanismů je užitečnou pomůckou komparativní proteomová analýza, která srovnává humánně virulentní a avirulentní kmeny *F. tularensis*. Hledají se jak kvalitativní, tak kvantitativní změny v proteomu kmenů *tularensis*, *holarctica* a *mediaasiatica*. Při tomto srovnání bylo nalezeno 6 unikátních proteinů specifických pro kmen *tularensis*, a to konkrétně: hypotetický lipoprotein FT 1260, 3-hydroxyisobutyryl dehydrogenasa FT 1666, sekreční protein FT 0018, konzervovaný hypotetický protein FT 1651, hypotetický protein FT 0903, typ IV pili lipoprotein FT 1157 [37]. Nyní se studuje jejich případný virulentní potenciál.

V experimentální části se srovnávaly dva postupy pro měření koncentrací naštěpených peptidů dvou kontrolních vzorků, alfa kaseinu a BSA. Pro tento účel byla vybrána metoda microBCA a dva přístupy, klasický a modifikovaný. Modifikovaný postup byl popsán ve dvou publikacích [51,52]. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1 a 2. Srovnáním klasického a modifikovaného postupu byl vyvozen závěr, že modifikovaný postup měl ve výsledcích mnohem větší odchylku od změřené koncentrace, než-li klasický postup. Proto se použil klasický postup pro změření bakteriálních vzorků.

V druhé části byly připraveny bakteriální vzorky, které se v různých časových intervalech inkubovaly se specifickou proteasou, trypsinem. Tento postup byl zvolen vzhledem k vlastnostem, které mají jak membránově lokalizované proteiny, tak trypsin. Ve studii, zabývající se expresí bakteriálního proteomu, bylo zjištěno, že trypsin štěpí ty proteiny, jež jsou v membráně vázány s vysokou afinitou. Proto je možné tyto proteiny nazývat membránově lokalizované. Takto naštěpené proteiny můžeme analyzovat

LC-MS/MS přístupem. Tento postup byl zvolen vzhledem k malé koncentraci peptidů bakteriálních vzorků, získaných po kultivaci s trypsinem. Tato koncentrace je natolik nízká, že nebylo možné použít 2DE elektroforézu, která je nejčastěji voleným proteomickým přístupem. Vzorky po působení trypsinu byly odsoleny kolonkami OASIS, avšak tento postup nebyl reprodukovatelný. Odsolení vzorků by mělo být zopakováno pomocí kolonek Empore C18-SD (Supelco). Analýza vzorků pomocí hmotnostního spektrometru MALDI TOFTOF ukázala, že po delší době inkubace (60 minut) nacházíme v MS spektru více peptidů v porovnání se spektrem vzorku kultivovaného 30 minut (obrázky č.11 a 12). Trypsin přítomný ve vzorcích v nadbytku rušil analýzu na hmotnostním spektrometru, proto by bylo vhodné použít v dalších experimentálních uspořádáních enzym imobilizovaný na magnetické kuličky. Zadáním výsledného spektra do Phenix Genebio v. 2.1 prohledáváním proti NCBI nr databázi byly identifikovány dva peptidy z 17 kDa major membrane proteinu *F. tularensis* kmen FSC200. Jedná se o peptidy ATVYTAYNNNPQGSVR a DTAAAQTATTEQAAAVSKPTAK.

17 kDa major membrane protein byl identifikován jako lipoprotein, který stimuluje imunitní systém k produkci T-lymfocytů. Je to hydrofilní integrální lipoprotein. Ve své aminokyselinové sekvenci obsahuje tetrapeptid leucin-alanin-serin-cystein, což je rozpoznávací sekvence pro lipoproteinovou signální peptidasu. Byl pojmenován jako TUL4 [56]. Spolu s FopA proteinem patří do Omp. Oba tyto lipoproteiny jsou vysoce imunogenní a hrají významnou roli v patogenních mechanismech Gram-negativních bakterií. [41]. Pro jeho identifikaci je možné použít bioinformatické databáze LipoP, jejímž principem je specifické štěpení lipoproteinů lipoproteinovou lipasou, PSORT-B, predikující celulární lokalizaci, SignalP, predikující místo štěpení signální peptidasy, případně BOMP, který predikuje integrální proteiny Omp.

## **6 ZÁVĚR**

Závěrem lze říci, že vývoj nové metody pro stanovení koncentrace peptidů se zdařil. Cílem práce bylo především porovnat mezi sebou klasický a modifikovaný postup, vedoucí ke stanovení koncentrací peptidů, které byly naštěpeny proteolytickým enzymem trypsinem. Bylo zjištěno, že výhodnějším postupem je klasický, který měl ve srovnání s modifikovanou metodou menší chybovost. Součástí diplomové práce byla také identifikace těchto peptidů pomocí neželových technik přístupem HPLC-MS/MS. Podařilo se dokázat, že trypsin, který působil na bakteriální vzorky nejdéle, uvolnil do suspenze nejvíce membránově lokalizovaných peptidů, z nichž dva se podařilo identifikovat pomocí softwarové databáze Phenix Genebio v. 2.1 prohledáváním proti NCBI Inr databázi. Konkrétně se jedná o peptidy z 17 kDa major membrane proteinu *F. tularensis* kmen FSC200, ATVYTAYNNNPQGSVR a DTAAAQTATTEQAAAVSKPTAK . Výsledek práce je možno použít v dalších studiích, zabývajících se stanovováním koncentrace peptidů 17 kDa major membrane proteinu *F. tularensis* kmen FSC200. Bude však nutné (1) optimalizovat uspořádání experimentu a časové intervaly, ověřit zda dochází ke (2) zvyšování koncentrace peptidů ve zvolených časových intervalech kultivace bakterie a (3) zda koncentrace peptidů po kultivaci bakterie s trypsinem je vyšší než po kultivaci bez trypsinu.

## **7 LITERATURA**

1. Roger D. Pechous, Travis R. McCarthy and Thomas C. Zahrt: Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development, Microbiology and Molecular Reviews, Dec.2009, 684-711
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=263>, 2011-06-18
3. A. Macela a kolektiv autorů: Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií, Grada Publishing, 2006, str. 112
4. <http://www.zdn.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/tularemie-epidemiologie-klinicke-formy-a-lecba-128588>, 2011-06-18
5. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&orig\\_db=&ter=francisella+tularensis&cmd=Search](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=bioproject&orig_db=&ter=francisella+tularensis&cmd=Search)), 2011-07-21
6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AJ749949>, 2011-06-15
7. Pär Larsson, Petra C.F Oyston, Patrick Chain, May C Chu, Melanie Duffield, Hans-Henrik Fuxelius, Emilio Garcia, Greger Hälltorp et al. : The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, Nat. Genet. 37, 2005, 153–159
8. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Proteom>, 2011-07-25
9. Sara L.N. Kilmury, Susan M. Twine: The *Francisella tularensis* proteome and its recognition by antibodies, Frontiers in Microbiology, 2011, Volume 1
10. Nadia Anwar, Ela Hunt : *Francisella tularensis novicida* proteomic and transcriptomic data integration and annotation based on semantic web technologies, BMC Bioinformatics, 2009
11. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Gramnegativn%C3%AD\\_bakterie](http://cs.wikipedia.org/wiki/Gramnegativn%C3%AD_bakterie), 2011-07-28
12. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glykokalyx>, 2011-07-28
13. <http://lekarske.slovníky.cz/pojem/glykokalyx>, 2011-28-07
14. <http://www.molbio.upol.cz/stranky/vyuka/MB/3.pdf>, 2011-08-27
15. [http://biomach.wz.cz/mikrobiologie\\_bakterie.htm](http://biomach.wz.cz/mikrobiologie_bakterie.htm), 2011-06-12
16. M. Votava: Lékařská mikrobiologie obecná, Neptun 2005
17. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky, Espero Publishing, 1998
18. [fybiomuni.ic.cz/Biostranky/download/06\\_Membrany.doc](http://fybiomuni.ic.cz/Biostranky/download/06_Membrany.doc), 2011-06-12
19. [http://cs.wikipedia.org/wiki/Membr%C3%A1nov%C3%BD\\_protein](http://cs.wikipedia.org/wiki/Membr%C3%A1nov%C3%BD_protein), 2011-06-12

20. Lenka Michalcová, Studium fosforylace proteinu pomocí CELIF, Brno 2010, Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity, vedoucí práce Mgr. Jan Preisler, PhD., str.21
21. Miloslava Netopilová, Jaroslav Dršata: Vybrané kapitoly z patobiochemie I. díl; 2008; učební text pro studenty Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, Karolinum
22. Kolektiv autorů 2008: Vybrané kapitoly z molekulární patologie. Skripta pro studenty DSP Molekulární patologie, Univerzita obrany, Fakulta voj. Zdravotnictví
23. <http://www-nbrf.georgetown.edu>, 2011-06-18
24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG> , 2011-06-18
25. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, 2011-06-18
26. <http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP> , 2011-06-18
27. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, 2011-06-18
28. Jana Mantlová: Možnosti stanovení proteinového profilu bakterií; Zlín 2010; bakalářská práce vypracovaná na Technologické fakultě Univerzity Tomáše Bati, vedoucí práce Mgr.Iva Doležalková
29. [http://www.zoologie.upol.cz/osoby/fellnerova/pdf\\_nuevo/MembranyTRANSPORT2010\\_10.pdf](http://www.zoologie.upol.cz/osoby/fellnerova/pdf_nuevo/MembranyTRANSPORT2010_10.pdf), 2011-06-20
30. [http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/streptococcus\\_pyogenes.php](http://www.biotox.cz/toxikon/bakterie/bakterie/streptococcus_pyogenes.php), 2011-06-21
31. <http://www.membranome.org> , 2011-06-21
32. [www.pmfhk.cz/Prednasky/uplatneni.pdf](http://www.pmfhk.cz/Prednasky/uplatneni.pdf), 2011-21-06
33. [http://www.zbynekmlcoch.cz/info/ostatni\\_obory/aslo\\_co\\_je\\_to\\_zvysena\\_hodnota\\_prici\\_na\\_a\\_lecba\\_normalni\\_hodnota.html](http://www.zbynekmlcoch.cz/info/ostatni_obory/aslo_co_je_to_zvysena_hodnota_prici_na_a_lecba_normalni_hodnota.html), 2011-06-21
34. Petra Pospíšilová: *Salmonella* a gastrointestinální trakt člověka; Brno 2009; bakalářská práce vypracovaná na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity;vedoucí práce Ing.Martin Krska CSc.
35. Martin Brychta, Vypracování inform.systému pro zpracování proteomických dat při budování proteinové databáze *Francisella tularensis* LVS, Hradec Králové 2005, diplomová práce vypracována na Ústavu molekulární patologie, Univerzita Obrany, vedoucí práce Prof.RNDr.Aleš Macela, DrSc.
36. Klara Konecna, Lenka Hernychova, Marketa Reichelova, Juraj Lenco et al.: Comparative proteomic profiling of culture filtrate proteins of less and highly virulent *Francisella tularensis* strains, *Proteomics* 2010, 4501-4511



37. Ivona Pavkova, Marketa Reichelova Par Larsson et al. : Comparative Proteome Analysis of Fractions Enriched for Membrane-Associated Proteins from *Francisella tularensis* Subsp. *tularensis* and *F. tularensis* Subsp. *holarctica* Strains, 2006, Journal of Proteome Research
38. Drake SL, Sandstedt SA, Koomey M.: PilP, a pilus biogenesis lipoprotein *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as high-molecular-mass multimer, *Mol Microbiol.* 1997 Feb;23(4):657-68.
39. Jana Havlasová, Lenka Hernychová, Martin Brychta, Martin Hubálek, Juraj Lenco, Pär Larsson: Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia, 2005, *Proteomics*
40. Manchur, Mohammed Abul; Kikumoto, Mei; Kanao, Tadayoshi; Takada, Jun; Kamimura, Kazuo: Characterization of an OmpA like outer membrane protein of the acidophilic iron oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans*; 2011; *Extremophiles* Vol. 15; Issue 3
41. Jason F. Huntley, Patrick G. Conley, Kayla E. Hagman, and Michael V. Norgard: Characterization of *Francisella tularensis* Outer Membrane Proteins; *J Bacteriol.* 2007;189(2): 561-574
42. J. Wayne Conlan, Hua Shen, Igor Golovliov, Carl Zingmark: Differential ability of novel attenuated targeted deletion mutants of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* strain SCHU S4 to protect mice against aerosol challenge with virulent bacteria: effects of host background and route of immunization; 2010; *Vaccine*
43. Anna-Lena Forslund, Emelie Näslund Salomonsson, Igor Golovliov: . The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*; 2010; *BMC Microbiol.*
44. Anna Brotcke, David S. Weiss, Charles C. Kim, Patrick Chain et al. : Identification of MglA-Regulated Genes Reveals Novel Virulence Factors in *Francisella tularensis*; 2006; *Infect Immun*
45. Leah E. Cole, Michelle H. W. Laird, Anna Seekatz, Araceli Santiago, Zhaozhao Jiang: Phagosomal retention of *Francisella tularensis* results in TIRAP/Mal-independent TLR2 signaling; 2010; *J Leukoc Biol*
46. Jeanette E. Bröms, Moa Lavander, and Anders Sjöstedt: A Conserved  $\alpha$ -Helix Essential for a Type VI Secretion-Like System of *Francisella tularensis*; 2009; . *J Bacteriol*

47. [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_906-914.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_906-914.pdf), 2011-02-19
48. <http://holcapek.upce.cz/>, 2011-03-01
49. Milan Navrátil, Lenka Uvírová, Petr Nádvorník, Marie Kubaláková, Jana Klukáčková: Základní praktická cvičení z molekulární biologie; 2004, Olomouc
50. [www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bam/KBCBAMStanoveniproteinu08-09.ppt](http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/bam/KBCBAMStanoveniproteinu08-09.ppt), 2011-07-30
51. Kapoor KN, Barry DT, Rees RC, Dodi IA, McArdle SE, Creaser CS, Bonner PL.: Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay. *Anal Biochem.* 2009, 393, 138-40
52. Jacek R Winiewski, Alexandre Zougman, Nagarjuna Nagaraj & Matthias Mann: Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6, 359 - 362 (2009)
53. <http://cs.wikipedia.org/wiki/Fosforylace>, 2011-08-03
54. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>, 2011-08-03
55. <http://www.psort.org/psortb/>, 2011-08-03
56. A. Sjøstedt, A. Tarnvik, G. Sandström: The T-Cell-Stimulating 17-Kilodalton Protein of *Francisella tularensis* LVS Is a Lipoprotein; *Infection and immunity*, Sept. 1991, p. 3163-3168
57. Chamberlain RE, Evaluation of live tularemia vaccine prepared in chemically defined medium.; *Appl Microbiology*; 1965; 13:232-5
58. Crosa LM, Crosa JH, Heffron F.: Iron transport in *Francisella tularensis* in the absence of a recognizable TonB protein still requires energy generated by the proton motive force; *Biometals.* 2009; (2):337-44
59. Yasushi Ishihama: Proteomic LC-MS system using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry; *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005) 73–83
60. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/> 2011-06-18