

**Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Metabolická zdatnost a genová exprese u  
populace erytromycin rezistentních buněk  
Escherichia coli rostoucích v kontinuální  
kultuře v přítomnosti a nepřítomnosti  
antibiotika**

**Zuzana Hájková**

**Praha 2007**

Vedoucí práce: RNDr. Jaroslav Weiser CSc.

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně, a že jsem použila pouze prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury

*Harlowa Euzen*

Děkuji svému školiteli RNDr J. Weiserovi CSc. za vedení diplomové práce, za cenné podněty a připomínky, dále všem, kteří mi poskytli pomoc při práci, jmenovitě Silvií Bezouškové, Denise Petráčkové, Ladislavě Kalachové, Zuzaně Technikové, Šárce Nezbedové, Jiřímu Janečkovi, jakož i celému MBU AV ČR.

Diplomová práce vznikla v letech 2005-2007 v rámci grantového projektu GA ČR 310/03/0292, 2003-2006. Proteomová analýza adaptivních mutací u bakterií resistentních k antibiotikům sledovaných při dlouhodobých kultivacích.

## Fitness and gene expression of the erythromycin resistant Escherichia coli population growing in continuous culture in the presence and absence of the antibiotic

### Abstract:

Antibiotic resistance of bacteria is a common phenomenon today. Apparently this is a consequence of antibiotics overuse. One possible solution to prevent spreading of the resistance is to reduce the usage of antibiotics. This is, however, a very problematic issue.

Acquiring of resistance genes usually imposes a penalty to bacterial fitness, meaning that the bacterium is handicapped under normal conditions without the selection pressure of the antibiotic. However, it has been shown that bacteria can overcome this handicap thanks to mutations and raise their fitness so that they even outpace the original strain. This study targets this phenomenon in detail.

We have been growing erythromycin resistant E.coli strain in continuous culture in presence of erythromycin for c. 100 hours. For comparison, we also carried out a parallel cultivation without the antibiotic. We regularly monitored the process by sampling and measuring the optical density. No constant trend in physiology of the culture was observed; instead, the results were highly varying in time.

We selected four samples for evaluation of fitness parameters, namely doubling time, living population size, resistance and rate of translation. We analysed cell free proteins from the samples using 2D electrophoresis, scanned the gels and used the PD Quest program to compare protein profiles of the samples. That concluded the first part of experiments. In the second part we considered clones sampled from the colonies in the 68<sup>th</sup> hour. The clones were differing in resistance to erythromycin. We have evaluated these clones for the same parameters as in the first part. By comparing protein profiles of clones we observed that they differed both quantitatively and qualitatively. 17 proteins were present in the original sample (in 68<sup>th</sup> hour) but missing from the clones. Furthermore, the more resistant clone missed another 3 proteins compared to the other one. We suspect that these differences in protein profiles contain the key to understanding the mechanism of increased fitness and resistance of bacteria.

This will be a subject of further intensive research.

### Klíčová slova:

Escherichia coli

Erythromycin

Zdatnost/ Fitness

2D elektroforéza

Proteiny

Kontinuální kultivace

Rezistence

### Key-words:

Escherichia coli

Erythromycin

Fitness

2D electrophoresis

Proteins

Continual cultivation

Resistance

## **Obsah:**

Seznam použitých zkratk.....	7
Úvod.....	8
Cíl práce .....	9
Přehled literatury	
1. Antibiotika a rezistence.....	10
2. Růst bakterií a jejich zdatnost.....	16
3. Kultivační systémy.....	18
4. Proteomika.....	20
Materiál a metody.....	27
Výsledky	
Fyziologie bakteriální kultury.....	44
Proteom.....	50
Studium klonů s odlišnou rezistencí k erytromycinu.....	53
Diskuse .....	65
Souhrn .....	69
Seznam použité literatury .....	70

## Seznam použitých zkratk

2DE	dvojměrná elektroforéza
A.U.	intenzita spotu
CFU	počet buněk (počet kolonií)
E	erytromycin- kontinuální kultivace E.coli v médiu s erytromycinem
ELFO	elektroforéza
K	kontrola- kontinuální kultivace E.coli v médiu bez erytromycinu
LB	médium podle Luria-Bertani
M	klon citlivější k erytromycinu, E.coli
M9	minimální médium pro E.coli
Mr	Molární hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
OD	optická denzita
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pI	Izoelektrický bod
SSP	číslo proteinu
Rlu	relativní luminiscence
V	klon více rezistentní k erytromycinu, E.coli

## Úvod

V současné době je velkým problémem stále se šířící rezistence bakterií k antibiotikům. Rezistentních kmenů rychle přibývá a proto je třeba hledat stále nová, dosud ještě účinná antibiotika a současně i zvyšovat podávané dávky.

Je zřejmé, že na vzniku rezistence se z velké části podílí nevhodné a nadměrné užívání antibiotik. Je tedy konečným řešením omezit užívání antibiotik? Dát částečnou odpověď na tuto otázku se pokouší i tato studie.

Antibiotika se používají ve velké míře nejen v medicíně ale také v zemědělství a potravinářství. Proto dochází k jejich akumulaci v přírodě, kde se dostanou do styku s žijícími bakteriemi. Podobným problémem je masivní šíření multiresistencí v nemocnicích a ostatních zdravotnických zařízeních, kde se tak výrazně zužuje spektrum efektivně použitelných antibiotik.

Je obecně známo, že rezistence k antibiotikům je u bakterií doprovázena jejich sníženou růstovou zdatností (fitness) a jsou tak v bakteriální populaci v nevýhodě vůči jedincům k antibiotikům citlivým. Toto zjištění je základem hypotézy předpokládající, že omezení nadužívání antibiotik by mělo vést k převládnutí citlivých bakterií v populacích díky jejich vyšší růstové zdatnosti. Nicméně v posledních letech minulého století bylo prokázáno, že selekční tlak antibiotika může vést u značné části bakteriální populace ke vzniku adaptivních mutací, zvyšujících zdatnost takto alterovaných jedinců při zachování rezistence k příslušnému antibiotiku.

Jak tyto mutace vznikají a co způsobují jsme se snažili ověřit v následujících experimentech. Bakterie jsme kultivovali za současného selekčního tlaku antibiotika a sledovali chování populací, které se měnily v časovém průběhu. Zjišťovali jsme jejich fyziologické vlastnosti a hledali souvislosti s expresí jejich genů..

Klíčem budou pravděpodobně proteiny, neboť proteiny jsou odrazem genomu, a rezistence, tak jako každá vlastnost bakterií je zakódována v jejich genech, ať už je získaná či přirozená.

Projekt může přispět nejen k obecnému poznání vzniku adaptivních mutací a jejich vlivu na fyziologii bakteriální populace, ale může mít i praktický význam při hledání terapeuticky účinných koncentrací antibiotik bránících vzniku invazivních, multiresistentních populací patogenních bakterií.



## Cíl práce

Práce je součástí rozsáhlého projektu, na němž se podílí řada lidí a jehož cílem je prostudovat fitness- zdatnost a genovou expresi u populace erytromycin rezistentních buněk *E.coli* rostoucích v přítomnosti a nepřítomnosti antibiotika v turbidostatu.

Jako modelový organizmus byla vybrána *E.coli* s mutací *env A*, neboť tato mutace zvyšuje propustnost membrány pro makrolidová antibiotika a kmen je a resistentní k erytromycinu (mutace v proteinu L4). V bakterii je vnesený plazmid pLUX2, který nese reportérový systém na bázi bakteriální luciferázy se STOP kodonem vloženým na začátku genu *luxB*, který umožňuje měření relativní přesnosti translace. Systém kontinuální kultivace byl zvolen proto, že nejvíce napodobuje podmínky v tlustém střevě teplokrevných živočichů, v nichž tato bakterie přirozeně žije. V průběhu kontinuální kultivace, která probíhala v přítomnosti a nepřítomnosti subinhibiční koncentrace erytromycinu jsme odebírali vzorky (cca každých 10 hod) a v dalších experimentech už pracovali pouze se čtyřmi vybranými vzorky u kterých byla provedena základní fyziologická charakteristika a proteomová analýza.

Cílem mé diplomové práce bylo zaměřit se na vliv antibiotika na expresi proteinů v kultuře, která prošla zhruba 70 generacemi (68 hod kultivace). Po této době kultivace v přítomnosti erytromycinu bakteriální populace obsahovala buňky resistentní k 10-50 ug/ml antibiotika. Rezistenci k erytromycinu jsem zjišťovala na gradientových plotnách. Z kolonií na gradientových plotnách jsem z populace ze 68 hod odebrala 2 klony (M, V) - lišící se výrazně mírou rezistence.

V analýze bakteriální fitness jsem použila klasické techniky bakteriální fyziologie. Odebrané vzorky jsem kultivovala v Batch-kultivaci, která umožnila stanovit generační dobu a počty živých buněk, které jsem získala vyšetím na agarové plotny. Měřením luminiscence jsem se pokusila ověřit přesnost translace u klonů a směsných kultur.

S čistými populacemi klonů M a V, které by teoreticky měly obsahovat pouze buňky jednoho, nebo druhého typu jsem nadále pracovala. Pro analýzu proteinových profilů celé populace z 68 hodiny a klonů z této hodiny připravených, jsem použila vysokorozlišovací 2D elektroforézu proteinů. Cílem analýzy bylo porovnat kvantitativní a kvalitativní změny proteinových profilů v závislosti na stupni rezistence mezi klony a směsnou populací z 68 hod. Tato data byla korelována s fyziologickou zdatností a relativní rychlostí translace u obou klonů a směsné populace.

## Přehled literatury

### 1. ANTIBIOTIKA A REZISTENCE

Antibiotika jsou produkty sekundárního metabolismu organismů, přičemž jejich význam pro producenta není zatím zcela objasněn. Jejich producenty jsou rostliny, živočichové, houby a zejména pak plísně a bakterie. V nízkých koncentracích potlačují životní funkce citlivých organismů.

Mají nezastupitelnou roli v humánní medicíně, jejich použití je však daleko širší, neboť zahrnuje i zemědělství, potravinářství a veterinární medicínu.

Po chemické stránce to jsou nízkomolekulární organické látky, většinou složitých vzorců. Často obsahují cykly, benzenová jádra nebo aminokyseliny. (KAPRÁLEK 2001 )

#### 1.1. Přehled nejvýznamnějších antibiotik

Ke klinicky nejvýznamnějším antibiotikům patří betalaktamy, aminoglykosidy, tetracykliny, makrolidy, linkosamidy, chloramfenikol, peptidová antibiotika, ansamyciny a chinolony. Antibiotika se mohou rozdělovat podle chemické struktury, původu, nebo podle místa účinku.

Z hlediska místa účinku první skupinou jsou antibiotika inhibující syntézu buněčné stěny bakterií. Pro skupinu betalaktamů je společným znakem betalaktamový kruh, který se váže do aktivního místa PBP (penicillin binding proteins) transpeptidázy. To je enzym, který spojuje peptidové řetězky peptidoglykanu (mureinu), hlavní složky buněčné stěny bakterií. Proto jsou zcela netoxické pro člověka.

Nejdříve objevené a používané betalaktamy jsou Peniciliny, které kromě betalaktamového kruhu obsahují ještě kruh thiazolidinový. Z běžně používaných sem patří benzylpenicilin (penicilin G), a phenoxymetylpenicilin (penicilin V), z penicilinů odolných vůči stafylokokové betalaktamáze je to oxacilin a methicilin, z aminopenicilinů amoxicilin a ampicilin, z ureidopenicilinů piperacilin a z karboxypenicilinů ticarcilin.

Další skupinou betalaktamů jsou cefalosporiny, které místo thiazolidinového kruhu obsahují kruh dihydrothiazidinový. Rodějí se do 4 generací. Od první ke třetí generaci stoupá účinek na gramnegativní bakterie a na grampozitivní klesá. Stoupá také odolnost k betalaktamázám. Cefalosporiny 4. generace jsou pak vysoce účinné na grampozitivní i gramnegativní bakterie a nejodolnější vůči betalaktamázám.

Monobaktamy a mají pouze betalaktamový substituovaný kruh, karbapenemy jsou strukturou podobné penicilinům.

Kromě betalaktamů jsou známy ještě další skupiny antibiotik, které působí na syntézu buněčné stěny, ale v jiném místě. Vankomycin je nejvýznamnějším glykopeptidem. Je to v současnosti jediné antibiotikum účinné i na multirezistentní kmeny *Staphylococcus aureus*. Váže se na terminální D-alanyl D-alanin a brání zesíťování peptidoglykanu, má ale značnou toxicitu.

Následující antibiotika působí tak, že blokují proteosyntézu u bakterií. Aminoglykosidy zahrnují širokou skupinu antibiotik kam patří streptomycin, spektinomycin, kanamycin, neomycin, gentamicin, amikacin a další. Základem je alkohol inositol. Aminoglykosidy zabraňují vzniku iniciačních komplexů od nichž se rozvíjí syntéza polypeptidů. Dosti časté jsou nežádoucí účinky. Hlavně nefrotoxicita a neurotoxicita.

Tetracykliny, jak už napovídá název obsahují čtyři šestičlenné kondenzované cykly. Váže se na menší ribozomovou podjednotku a zabraňují vazbě komplexu aminoacyl-tRNA. Mají široké spektrum účinnosti, ale také časté vedlejší účinky.

Chloramfenikol se váže na velkou ribozomovou podjednotku a inhibuje činnost peptidyltransferázy a tím i vznik peptidické vazby. Dnes se pro značnou toxicitu uplatňuje jen jako antibiotikum druhé volby. (KAPRÁLEK 2001)

Další významnou skupinou antibiotik interferujících s proteosyntézou jsou makrolidy. Základem makrolidů je velký 12-16 členný cyklus. Podle jedné představy se erytromycin, oleandomycin a spiramycin váží na 50 S podjednotku, přesněji řečeno na její 23S rRNA. Tím zabrání její interakci s iniciačním komplexem obsahující malou podjednotku a tedy i vzniku funkčního ribozomu. Podle jiného názoru makrolidy způsobují odštěpení peptidyl-tRNA z fungujícího ribozomu. (JAKUBŮ a URBÁŠKOVÁ 1999). Obecně se přijímá první představa.

Linkosamidy jsou odvozeny od prolinu, blokují vazebné místo A na ribozomu. linkomycin a clindamycin mají velmi nízkou toxicitu.

Další skupina antibiotik ruší funkci buněčné membrány.

Poslední skupina antibiotik inhibuje syntézu a funkci nukleových kyselin. Ze skupiny ansamycinů je to především rifampicin. Váže se na  $\beta$  podjednotku bakteriální DNA-dependentní RNA polymerázy a blokuje syntézu mRNA. Neovlivňuje však již běžící transkripci.

Velká skupina Chinolonů působí na bakteriální topoizomerázu II- gyrázu, která za spotřeby ATP zavádí superhelicitu do molekuly DNA. Funkci gyrázy nezbytnou při replikaci blokuje kyselina oxolinová a nalidixová nebo fluorochinolony vazbou na podjednotku A. (Podjednotku B blokuje novobiocin). (KAPRÁLEK 2001 )

## **1.2. Rezistence na antibiotika**

Éra antibiotik začala zavedením penicilinu do léčebné praxe ve čtyřicátých letech. Výsledek byl ohromující a penicilin byl ozdoben adjektivem „zázračný“, na smrt nemocní se jakoby zázrakem uzdravovali. (KAPRÁLEK 2001 )

Následovalo období hledání nových antibiotik a nových producentů a jejich šlechtění tak aby výtěžky antibiotik byly co největší. Ale přišlo zklamání: Už v padesátých letech se objevil stafylokok rezistentní na penicilin. Od té doby rezistentních bakteriálních kmenů neustále přibývá stejně jako přibývají nové a nové varianty antibiotik, které jsou ještě účinné. (KAPRÁLEK 2001 )

Problém je zejména ten, že rezistence se mezi mikroorganismy šíří rychleji než zavádění nových antibiotik do lékařské praxe. Dalším velkým problémem jsou multirezistentní kmeny v nemocnicích– původci nozokomiálních nákaz, které pro oslabeného pacienta mohou často znamenat smrtelné nebezpečí (VANDENBROUCKE a GRAULS 1993). Co je příčinou rezistence bakterií? Je to především jejich velká proměnlivost. Uvážíme-li jak rychle se bakterie množí (a jak snadno dochází k mutacím) je velmi pravděpodobné, že se dříve či později objeví bakterie, která je k danému druhu antibiotika rezistentní. Každé antibiotikum zavedené do klinické praxe má limitovaný práh účinnosti. A to umožňuje selekci jedinců, jež mají vlastní či získaný rezistenční mechanismus. (WALSH 2003 ) Selekcí tlakem antibiotika pak velmi rychle v populaci převládne a z původně citlivého kmene je najednou kmen rezistentní. (KAPRÁLEK 2001)

Časová linie pro vývoj klinicky signifikantních rezistencí je multifaktoriálně závislá na některých parametrech jako jsou: kvantita užívání antibiotika, jak široce je předepisováno, frekvence, s jakou dochází ke snížení hladiny, umožňující selekci rezistentních organismů, rezervoáry již existujících rezistenčních mechanismů, počet mutací požadovaných pro vznik rezistenčního cílového místa a fitness rezistenčních organismů (WALSH 2003 ). Rezistence je však vlastnost, která se nepřenáší jen vertikálně, ale i horizontálně a to dokonce i mezi nepříbuznými kmeny bakterií. Přenos se uskutečňuje jednak konjugací, kdy se z jedné buňky do druhé přenáší plazmid, který kóduje rezistentní geny. K přenosu je nezbytné aby buňka měla sexuální pilus. Může však docházet i k přenosu transdukci

přenos bakteriofágem) nebo transformací kompetentních buněk. (K posledně jmenovanému případu v přírodě dochází zřídka.) (KAPRÁLEK 2001 )

A konečně za rezistenci je do jisté míry zodpovědný sám člověk. Děje se tak přemírou užívání antibiotik nejen v lékařství, ale i v zemědělství odkud se dostávají do prostředí. Navíc jsou antibiotika poměrně stabilní a v přírodě se rozkládají pomalu.

Kde se vzaly geny kódující rezistenci? Některé bakterie jsou vůči některým antibiotikům přirozeně rezistentní. (Např. Gramnegativní bakterie jsou méně citlivé k betalaktamázám než Grampozitivní.) Tato rezistence je podmíněna druhovými vlastnostmi. Rezistence, která vzniká u původně citlivých bakterií je rezistence získaná. Geny kódující rezistenci se obvykle blíže podobají genům, které kódují základní biosyntetické funkce jako jsou například biosyntéza buněčné stěny nebo proteosyntéza. Vznikly nejspíše mutací esenciálních genů a brání tak bakterii před antibiotiky, jejichž zásahovým místem jsou právě esenciální geny.

Současný většinový názor předpokládá, že jejich zásobárnou jsou půdní bakterie, které je získaly v průběhu celé milióny let trvající evoluce jednak jako obranu proti okolním producentům antibiotických látek, jednak sami jako producenti antibiotik, chránící před jejich účinkem vlastní buňku. (SPRATT 1994 )

#### 1.2.1. Základní mechanizmy

Jako základní mechanizmy zajišťující rezistenci bakterií na antibiotika se uvádějí tyto:

- Bakterie získá schopnost degradovat nebo pozměňovat antibiotikum specifickými enzymy (například štěpení betalaktamů betalaktamázi)
- Změní se průchodnost bakteriálních obalů tak, že antibiotikum do buňky neproniká nebo proniká ve snížené míře (například *S.aureus* je rezistentní na gentamicin a tetracykliny ztrátou příslušného transportního systému přes cytoplazmatickou membránu.)
- Buňka zvýší eflux- aktivní odčerpávání antibiotika z buňky speciálními transportními systémy. (Časté u rezistence na tetracykliny.)
- Pozměnění cílového místa buď mutací v genu kódujícím normální cílovou molekulu, nebo přijetím transpozonu, který kóduje pozměněnou cílovou molekulu a nebo přijetím plazmidu, který kóduje enzym pozměňující cílové místo. Výsledkem je snížená afinita cílené molekuly k antibiotiku. (Například rezistence na makrolidová antibiotika methyloací 23SrRNA.)

- Buňka zvýší syntézu cílového místa. (Například rezistence *E.coli* na betalaktamy zvýšením genové doze genu *ftsI* kódujícího penicilin vázící protein PBP. (KAPRÁLEK 2001 )

Rezistenční geny mohou být kódovány jednak chromozomálně a jednak extrachromozomálně. Z extrachromozomálně kódovaných mutací mají největší význam mutace nesené na plasmidech, neboť jsou přenosné z buňky na buňku. Pro vznik plazmidů nesoucích rezistenční geny jsou významné transpozony.

Dalším genetickým elementem podílejícím se na přenosu resistencí jsou integrony. Skládají se z inzerčního místa *attI* a integrázového genu *intI*.

### 1.2.2. Rezistence k erytromycinu

Erytromycin inhibuje proteosyntézu účinkem na funkci ribozomu. Váže se na vrchol peptidu odchozího kanálu v 50S podjednotce a zastavuje proteosyntézu blokem přístupu nascentního peptidu do tunelu. Metabolické modifikace, které umožňují buňkám zvládnout situaci zahrnují: Změnu v cílovém místě, modifikaci antibiotika, pozměněný transport antibiotika. (WEISBLUM 1995 )

Erytromycinová rezistence ribozomu může nastat modifikací rRNA, mutací ribozomálního proteinu L4 a L22 (obklopující tunel pro RNA) nebo jisté rRNA podjednotky jenž tvoří proteinový východ z tunelu.

Biochemické studie ukazují, že ribozomy obsahující mutantní L4 protein nevážou erytromycin a jsou defektivní v peptid vazebné formaci. Naproti tomu, ribozomy nesoucí pozměněný L22 protein stále vážou antibiotikum a mají nezměněnou peptidyl transferázovou aktivitu. Následná cryo-EM rekonstrukce udává, že L4 mutantní protein zapřičiňuje zúžení vstupu do tunelu jenž patrně brání vazbě erytromycinu, naproti tomu změna L22 zapřičiňuje rozšíření tunelu, jenž dovoluje antibiotiku vázat se aniž inhibuje vstup nascentního peptidu do zvětšeného tunelu.

Genetické analýzy napovídají, že erytromycin rezistentní fenotyp asociuje se změnami L4 proteinu a může být modifikován mutací v malé podjednotce. (O'CONNOR et al. 2004) Klinické izoláty makrolidy-rezistentních stafylokoků byly popsány ve Francii, Japonsku a USA krátce po zavedení erytromycinu do klinické praxe v r.1953. V současnosti je rezistence k erytromycinu nejčastěji připisována posttranskripční modifikaci 23SrRNA adenin-specifickou N-metyltransferázou specifikovanou třídou genů nesoucích jméno *erm* (erythromycin ribosome methylation) V poslední dekádě bylo nalezeno a charakterizováno asi 30 *erm* genů z různých zdrojů. (WEISBLUM 1995 )

Přesnost translace je ovlivněna také aminoglykosidickými antibiotiky a antibiotiky s cílem na 50S, oxazolidiny jenž stimulují přečtení stop kodonu a posunové mutace během dekódování. (O'CONNOR et al. 2004 )

### 1.2.3. Nadúžívání antibiotik a problémy v terapii

Obecně antibiotika působí tak, že inhibují životní funkce bakterie, ale zároveň musí být co nejméně toxická pro makroorganismus. Jak už bylo dříve řečeno, betalaktamy jsou zcela netoxické, přesto se můžou po jejich podání objevovat vedlejší účinky, zejména alergické reakce. Naproti tomu po užívání chloramfenikolu mohou nastat závažné zdravotní komplikace, které mohou vést až k trvalému poškození organismu. Proto je třeba vždy pečlivě zvážit závažnost pacientova stavu a z něj pak vycházet při volbě antibiotika.

Předně, antibiotikum nepodáváme při léčbě respiračních viróz, nebo onemocnění, kde postačí jiný vhodný lék. Vždy musíme brát v ohled celkový zdravotní stav pacienta a případné negativní důsledky, které může podání antibiotikum přinést. Zejména nutnost pravidelného dávkování bývá pacienty často podceňována. Nebo také předčasné vysazení antibiotika, může vést k návratu onemocnění. (Po vymizení klinických příznaků je obvykle nutné ještě 1-3 dny v terapii pokračovat.) (VOTAVA 2001 ) V úvahu bereme také interakce antibiotik s jinými léky, nebo s jiným antibiotikem. Například erytromycin se nesmí kombinovat s betalaktamy nebo linkosamidy, protože se navzájem antagonizují. Rapidní evoluce rezistentních bakterií a alarmující zpomalení vývoje nových antibiotik, obrací pozornost na kombinační léčbu (multidrug treatment).

Kombinace léčiv jsou důležitým prostředkem proti šíření rezistence bakteriálních patogenů. A kromě toho také umožňují pochopení mikrobiální ekologie a evoluce. Ačkoliv jsou efekty kombinovaných léčiv na bakteriích značně prostudovány, relativně málo je známo o jejich dopadu na rozdílnou selekci mezi citlivými a rezistentními populacemi. (CHAIT et al. 2007 )

Přítomnost antibiotika uděluje výhodu rezistentním mutantům v kompetici s citlivou wilde-type populací. Kombinace léčiv jsou klasifikovány jako synergistické, doplňkové a antagonistické, podle toho, zda kombinací léčiv je jejich efekt zesílen, zůstává stejný, nebo je menší než jejich předchozí individuální aktivita. V některých případech je efekt kombinovaných léčiv dokonce menší než efekt jen jednoho léčiva samostatně, to nazýváme hyperantagonistickou interakcí. Kombinace určitých antibiotik využívaných při selekčním tlaku na rezistentní populace bakterií může mít zcela protichůdné efekty i na jejich „fitness“. (CHAIT et al. 2007 )

## **2. RŮST BAKTERIÍ A JEJICH ZDATNOST**

### **2.1. Růstová rychlost**

Během svého životního cyklu se heterotrofní mikroorganismy setkají se stanovišti, která se zjevně liší spektrem a koncentrací dostupných živin a navíc prostředí lišící se parametry jako je pH a teplota. Podívejme se například na situaci ve střevě. Bakterie, především mrtvé tvoří až 1/3 fekálií a 1 g fekálií obsahuje kolem  $10^9$  živých bakterií. Největší část bakterií v tlustém střevě připadá na nesporulující striktní anaeroby (99%). Nejnámější obyvatel tlustého střeva je *E.coli* (1%), která se účinně se podílí na regulaci mikrobiálního společenstva tlustého střeva, především produkcí kyseliny mléčné. (KAPRÁLEK 1999) Když *E.coli* opustí své přirozené anaerobní prostředí bohaté živinami- střevo teplokrevných živočichů a lidí, s bohatou nabídkou uhlíku a energických složek, musí se adaptovat na deficit živin druhotného prostředí, kde je koncentrace uhlíku a energických složek obvykle v nízkých mikromolárních nebo dokonce nanomolárních hladinách a dostupnost uhlíku a energických zdrojů omezená růstem heterotrofních mikrobů.

Je zřejmé, že mikroorganismy mohou úspěšně přežívat v obou prostředích pouze když mohou náležitě měnit a adaptovat své růstové vlastnosti. (KOVÁROVÁ et al. 1998 ) Hladiny enzymů podílejících se na replikaci, transkripci a translaci se mění přímo úměrně s růstovou rychlostí. V buňkách bakterií nezávisí rychlost proteosyntézy na tom, jak rychle pracují ribozomy ale na jejich počtu. Rychlost činnosti ribozomu je totiž konstantní (asi 800 ak/min). V podmínkách, které podporují pomalejší růstovou rychlost je počet ribozomů redukován. Výhoda této buněčné strategie je nasnadě, uvážíme-li že během rychlého růstu je více než polovina objemu buňky tvořena komponenty proteosyntézy. Během pomalého růstu, např. v chudém médiu, je udržována hladina minimálního počtu ribozomů, které nepracují, ale budou aktivovány za příznivých podmínek pro růst. (WADA 2000)

Po změně podmínek obohacením média se zvýší syntéza RNA, poté proteosyntéza a nakonec syntéza DNA. Buňky se rychle adaptují v nových podmínkách, zvýší svůj objem a zahájí buněčné dělení. Po omezení přísunu živin klesá rychlost syntézy podle téhož vzorce. Sít' akumulace RNA ustane téměř okamžitě, následována poklesem proteosyntézy a DNA syntézy a dělení buněk je zastaveno. (MAČVANIN 2003 )



## 2.2. Fitness (zdatnost)

Fitness, překládáno do češtiny nejčastěji jako zdatnost, plodnost, životaschopnost, vyjadřuje cenu jedince z hlediska evoluce, tedy schopnost jedince předat své geny dalším generacím. Zároveň je ale chápána jak okamžitá fyziologická schopnost umožňující zdatnějším jedincům v bakteriální populaci převládnout nad méně zdatnými.

Získání rezistence přijetím rezistenčních genů nebo mutací má obvykle za následek snížení fitness. Hovoříme o takzvaných nákladech rezistence. Znamená to, že rezistence k antibiotikům redukuje fitness bakterie v nepřítomnosti antibiotika. (SANDER et al. 2002) Tato zátěž může být kompenzována jinou mutací během evoluce rezistentní bakterie, která bakteriální fitness opět zvyšuje. (BJORKMAN et al.) Takovou mutaci pak nazýváme „kompenzační.“ (SANDER et al. 2002 ) Adaptivní evoluce je řízena genovou substitucí ve specifických lokusech kódujících určitý fenotyp. V důsledku změny v prostředí, původně zvýhodňující určitou alelu, bude nahrazena nově zvýhodněnou alternativní alelou. (LEVIN et al. 2000 )

## 2.3. Přesnost translace

Ve všech organismech, je genom udržován a exprimován s pozoruhodnou přesností. Avšak celková přesnost genové exprese není tak vysoká, jak by bylo teoreticky možné. Přesnost každého procesu zahrnuje kompromis, který přizpůsobuje evoluční fitness organismu. Příliš vysoká přesnost by neumožňovala přizpůsobování organismu novým podmínkám a přirozenou evoluci také díky nepřijatelným energetickým nárokům provázejícím její udržení.

Replikace genomu, která přenáší genetickou informaci z generace na generaci je extrémně přesná s frekvencí chyb nižší než  $10^{-8}$  v bakteriích a  $10^{-10}$  v eukaryích, což je do značné míry tím, že replikace DNA má sofistikovaný opravný mechanismus, schopný úpravy a opravy. Frekvence chyb v transkripci in vivo v *E.coli* je odhadována na  $1,4 \times 10^{-4}$  na nukleotid tedy kolem  $4 \times 10^{-4}$  na kodon, a tedy značně nižší než v replikaci. Přesný překlad mRNA je nezbytný předpoklad pro přenesení informace DNA do proteinů. (O'CONNOR et al. 2004 ) Životnost mRNA je relativně krátká (jen několik minut). To umožňuje bakterii velmi rychle měnit spektrum syntetizovaných bílkovin, jako odpověď na signály z vnějšku. Na vazebné místo mRNA rychle přisedá ribozom a zahajuje translaci.

Frekvence chyb v translaci in vivo je odhadována řádově na  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  Chyba v translaci může nastat po chybné aminoacylaci zejména tRNA syntetázou, výběrem nesprávné tRNA v ribozomu, nebo rámcovým posunem během translace. (OGLE

a RAMAKRISHNAN 2005 ) Míra chyb v inkorporaci během translace je asi  $10^{-4}$ . (O'CONNOR et al. 2004 )

Vlivem některých antibiotik dochází ke zvyšování počtu chyb v translaci.

Během překládání mRNA do řetězce aminokyselin, které je ovlivněno antibiotiky, nastane na 30S ribozomové podjednotce změna v 16SrRNA. Jsou popsány také mutace v 50S ribozomálních proteinech a 23S a 5S rRNA jež modulují přesnost translace.

X-ray krystalová struktura 50S podjednotky a 70S ribozomu ukazuje, že některé z mutant 50S komponent mají potenciální změny v interakci 50S podjednotky s tRNA a elongačním faktorem. Společně tento výsledek naznačuje, že interakce v oblasti tRNA vně antikodonu s ribozomem může mít také vliv na čtení kodonu. (O'CONNOR et al. 2004 ) Objev, že streptomycin umožní růst určitých auxotrofů, dokonce i v absenci normálně požadovaných živin, vedl k myšlence, že antibiotikum může indukovat chyby v překládání. Enzymy, zahrnuté v syntéze vyžadovaných metabolitů, byly v těchto auxotrofech defektní, protože obsahovaly v jejich genech předčasný stop kodon, umožňující produkci funkčního proteinu a růst v absenci metabolitu (suprese prostředím z nesmyslné mutace).

Paralelní studie in vitro ukázaly, že streptomycin zapříčiňuje rozsáhlé misinkorporace chybných aminokyselin nesprávně zařazených podle templátu.

To vedlo k názoru, že ribozom má dekodující místo, které nějak rozpozná kodon-antikodonovou interakci a streptomycin by mohl ovlivňovat jeho rozpoznávání. (OGLE a RAMAKRISHNAN 2005 ) SmR (streptomycin rezistentní) mutanty fungují na základě kompenzace efektu streptomycinu. Takto vznikla „podmíněná streptomycinová závislost“ auxotrofních mutantů *E.coli*. Tyto mutanty vykazovaly fenotyp závislý na streptomycinu v absenci metabolitu, který nejsou schopny syntetizovat. Streptomycin byl pak vyžadován k umožnění produkce enzymu přečtením nesmyslné mutace. (OGLE a RAMAKRISHNAN 2005 )

### 3. KULTIVAČNÍ SYSTÉMY

Mikrobiální růst buněk může být studován v laboratoři v batch nebo kontinuální kultivaci nebo fed-batch systému. Přesto že poslední technika vyřešila některé problémy, které mají první dvě jmenované, nikdy nebyla rutinně používána.

V experimentální batch kultuře je sledována buď spotřeba substrátu nebo zvyšování koncentrace biomasy jako funkce času. Základní podstatou v tomto systému je, že buněčné prostředí a tedy i buněčné složení a fyziologický stav se během experimentu mění. Naproti

tomu v kontinuální kultuře je rovnovážná koncentrace substrátu ustálena nezávisle na hustotě kultury a čase. To dovoluje udržet v rostoucí kultuře stálé podmínky prostředí a tím je kultura ve stabilním fyziologickém stavu. Proto v ideální kontinuální kultuře mohou být získána přesnější, a statisticky významnější data než z batch-kultury. (OGLE a RAMAKRISHNAN 2005 ) V laboratoři, se pro kontinuální kultivaci používají dvě zařízení. Chemostat a turbidostat. (KAPRÁLEK 1999)

Zařízení zvané chemostat je nádoba, která má vstupní otvor pro přítok sterilního media z rezervoáru a odtokový otvor, pro odtok media obohaceného o živé buňky a buněčný odpad. Název "chemostat" zavedli Novick a Szilard. (NOVICK a SZILARD 1950) V praxi je chemostat doplněn různými zařízeními pro aeraci kultury a ochranu před kontaminací. Odtok je často kontrolován prostřednictvím sifónu. Rychlost buněčného dělení v chemostatu může být měněna patřičnou úpravou rychlosti odtoku, ale rovnováhy bude dosaženo tehdy, když počet nově vzniklých buněk dělením bude přesně odpovídat počtu buněk v odtoku. Tato rovnováha je vymezena téměř výlučně koncentrací limitní živiny v rezervoáru. (DYKHUIZEN a HARTL 1983 ) Změnou rychlosti průtoku se mění koncentrace základní živiny v kultivátoru a tím i rychlost množení buněk. Chemostat tedy udržuje kontinuálnost kultury prostřednictvím konstantního přítoku živin, jiné zařízení pro kontinuální kultivaci udržuje konstantní hodnoty jiným parametrem.(DYKHUIZEN a HARTL 1983 ) Zařízení turbidostat udržuje konstantní turbiditu kultury prostřednictvím fotobuňky, která reguluje přítok živin negativní zpětnou vazbou. (BRYSON a SZYBALSKI 1952 )

Regulačním činitelem je zde rychlost růstu kultury, která sama řídí rychlost přítoku čerstvého prostředí. Při dosažení předem stanovené horní hranice hustoty buněk v kultivátoru kontrolované fotobuňkou, se zvýší rychlost přítoku a tím i úbytek buněk jejich vyplavením. Pokles hustoty buněk na určitou spodní hranici přivodí zastavení nebo zpomalení průtoku a tím i nárůst počtu buněk na původní hustotu. Všechny živiny jsou v nadbytku a proto žádná z nich není limitující.

Méně známá zařízení obsahují pH auxostat, který udržuje konstantní pH, další zařízení je založeno na specifických elektrodách, které udržují konstantní hladinu kyslíku, nitrát, nebo amoniak, nebo je růst kontrolován zpětno-vazebným přítokem etanolu.

Pro kontinuální kultivaci je důležitá zřed'ovací rychlost  $D$ , která udává jaká část buněk se vymění v průběhu jedné hodiny:  $D = \frac{Q}{V}$  kde  $Q$  je přítok proudící za časovou jednotku a  $V$  je objem kultury.

Teoretický základ pro pochopení dynamiky kompetice limitujících zdrojů v chemostatu vyvinul Monod a studoval Herbert. (OGLE a RAMAKRISHNAN 2005 )Kinetické experimenty provedené v batch-kultuře často spoléhaly na data získaná nepřímou metodou. To proto, že přesné stanovení růstu kontrolovaného koncentrací substrátu bylo a stále je obtížné, zatímco stanovení specifické růstové rychlosti je o něco jednodušší. Specifická růstová rychlost byla obvykle měřena v rozdílných substrátových koncentracích, které, byly postupně odhadnuty buď výpočtem z produkované biomasy a faktoru růstového výtěžku nebo jednoduše výpočtem ze známých faktorů roztoku. K získání kinetických dat, buď specifickými nebo nespecifickými analytickými technikami, bylo použito měření koncentrace růstem kontrolovaného substrátu.

(KOVÁROVÁ et al.1998 )

Studie kultivace v chemostatu je využívána zejména pro určování funkčního efektu známých mutací.

Jeden z důležitých aspektů chemostatu je, že organismy v něm reprezentují vyvíjející se nebo alespoň potenciálně se vyvíjející systém.

Mutace s nízkou frekvencí by se měly teoreticky lineárně zvyšovat, kvůli rekurentním (vratným) mutacím, za předpokladu, že ani nemutantní ani mutantní organismy nemají selektivní výhodu. (DYKHUIZEN a HARTL 1983 )

Všechno dosavadní pojednání o růstu a množení bakterií se týkalo růstu a množení v laboratoři, v čisté kultuře, za kontrolovaných, konstantních podmínek. Situace v přirozeném prostředí, kde se bakterie v přírodě vyskytují (voda, půda, makroorganismus) je odlišná. Poznatky získané v laboratoři platí i zde, ale analyzovaný systém je daleko složitější. Většina bakterií se za normálních okolností v přirozeném prostředí množí jen pomalu, případně vůbec, zůstávají ovšem v metabolicky aktivním stavu. Proto je daný ekosystém považován za otevřený, průtočný systém v ustáleném stavu, tedy v čase se příliš nemění, který je z ustáleného stavu občas vychylován vlivem různých zásahů, při čemž se buď vrací zpět do původního ustáleného stavu, nebo do stavu nového. Kromě toho jsou zde přítomny i jiné organismy, bakterie požírající. V přírodě to jsou například prvoci, v těle makroorganismu působí jejich likvidaci imunitní systém (KAPRÁLEK 1999)

#### **4. PROTEOMIKA**

Třebaže termín proteomika byl poprvé formulován až v r. 1996, první experimenty s monitorováním proteinové exprese pomocí 2DE proběhly už v roce 1975. Proteiny byly

separovány nejdříve podle náboje izoelektrickou fokusací, a poté podle velikosti s použitím sodium dodecyl sulfát polyakrylamidového gelu elektroforézou (SDS-PAGE) (DUTT a LEE 2000) Ačkoliv tedy byla 2-D elektroforéza používána už v průběhu 70-tých let, skutečný rozmach a důležitost této techniky přinesl až vývoj mikroanalytických technik schopných identifikovat proteiny v množstvích získaných z 2-D gelů. První takovou technikou bylo Edmanovo sekvencování. Současné techniky však jsou mnohem produktivnější a citlivější než bylo Edmanovo sekvencování. V poslední době jsou peptidy charakterizovány hmotnostní spektrometrií. (MS).

#### **4.1. Základní techniky**

Experimentální metody v bakteriální proteomice můžeme rozdělit do dvou skupin.

Za prvé 2D elektroforéza nebo jiné separační techniky, která umožňují rozdělit komplexní proteinovou směs v biologickém vzorku a za druhé, vývoj citlivých technik, umožňujících identifikaci a analýzu malého množství proteinů získaných z 2D elektroforézy (CASH 1998 ) Dále je nutná kombinace proteomiky s genetikou, molekulární biologií, proteinovou biochemií a biofyzikou. (FEY a LARSEN 2001) Nezbytné je rovněž zapojení bioinformatiky k organizaci a zpracování proteomických dat jak pro genomické informace, tak pro data získaná z „microarray“ analýzy. Další snahou informatiky je ustanovit efektivní spojení mezi hladinami proteinů a hladinami nukleových kyselin informující o genech a genových systémech. (DUTT a LEE 2000)

##### **Příprava proteinových vzorků**

K přípravě bakteriálních proteinů pro 2DE analýzu se používají různé metody. Mnoho proteomických studií používá hrubou přípravu rozpustných buněčných proteinů rozrušením bakteriálních buněk. V závislosti na účelu experimentu mohou být bakterie narostlé v tekutém živném médiu nebo na pevném mediu. Bakterie, narostlé v tekuté kultuře, jsou sedimentovány centrifugací a rozbity mechanicky, ultrazvukem nebo účinnými detergenty. Při přípravě vzorků je důležitá je zejména solubilizace proteinů a prevence proteolytického štěpení. Problémy mohou vzniknout při rozrušování bakteriálních buněk. Lyze s neiontovými detergenty v přítomnosti 8M močoviny a inhibitorů proteolýzy může být použita k rozrušení buněk Gram-negativních bakterií. Gram-pozitivní bakterie mají silnější peptidoglykanovou buněčnou stěnu než Gram-negativní bakterie a k jejich rozbití je nutné prodloužené vystavení ultrazvuku nebo mechanické techniky. Tepelný šok v 0,3% SDS může být použit k solubilizaci proteinů

pro 2DE analýzu za předpokladu vynechání močoviny z lytického pufru za účelem prevence proteinové karbamylace ve vysoké teplotě. SDS je pak odstraněno z proteinu předcházející izoelektrickou fokusací za přídavku vysoké koncentrace detergentu. Problémy bývají zejména se solubilizací membránových proteinů. Úspěchu lze dosáhnout extrakcí membránových proteinů *E.coli* s organickými rozpouštědly a následná solubilizace s detergenty. (FEY a LARSEN 2001) Kontaminace nukleovými kyselinami které mohou interferovat s proteinovou migrací v prvním rozměru, jsou odstraněny inkubací vzorku v přítomnosti DNAáz a RNAáz. Proteinové vzorky jsou před nanesením vzorku centrifugovány při 10000xg pro odstranění nerozpustných proteinů (CASH 1998)

### 2D-elektroforéza

V prvním rozměru se téměř výlučně používá izoelektrická fokusace-IEF na imobilizovaných pH gradientech na plastových prouzcích (IPG), která patří k rovnovážným technikám. Nerovnovážné techniky a nosičové amfolyty (uspořádání ve skleněných trubičkách) se používají zcela výjimečně.

Proteiny jsou separovány v gradientu pH mezi dvěma elektrodami. Vlivem elektrického proudu se pohybují v gradientu pH až do okamžiku, kdy se dostanou do oblasti pH shodné s jejich izoelektrickým bodem. Izoelektrický bod je hodnota pH v níž se zastaví a budou se zde koncentrovat. IEF umožňuje vysoké rozlišení (0,001 jednotek) a separované proteiny se uspořádají od nejnižší hodnoty izoel. bodu-pI (u anody) k nejvyššímu (u katody). Na anodě se vytváří kyselé prostředí a na katodě alkalické.

(<http://sweb.cz/biochemie/x/metody/elektroforeza.htm#fokusace>)

(<http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/ajazn.htm>)

V druhém rozměru dělení se pak používá elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE).

SDS je anionaktivní detergent, který nese vysoký náboj. Váže se na bílkovinné řetězce v poměru 1,4 g SDS na 1g bílkovin, přičemž délka komplexu SDS-protein je úměrná jeho molární hmotnosti. SDS vyrovná nábojové rozdíly proteinů, takže komplexy SDS-protein mají stejnou hodnotu povrchového náboje, pohybují se v gelu jen podle velikosti molekul. Faktorem ovlivňujícím separaci je porozita gelu. Relativní molekulová hmotnost bílkoviny odpovídá velikosti jejího komplexu s SDS. Na základě srovnání relativní mobility neznámé bílkoviny s standartu je pak možné určit její Mr.

Nevýhodou PAGE je vysoká toxicita monomeru. Kromě toho SDS inaktivuje biologicky aktivní látky zejména enzymy.

(<http://orion.chemi.muni.cz/virtuallab/navody/SDSpage.pdf>)

Rozdělené proteiny se vizualizují barvením nebo využitím značení proteinů radioaktivním methioninem a cysteinem při jejich syntéze.

V poslední době se objevila široká paleta nových fluorescenčních barev které dovolují dokonalejší kvantifikaci separovaných proteinů díky dynamickému rozpětí většímu než  $10^4$ . (FEY a LARSEN 2001)

Přes nesporné výhody má elektroforetická separace proteinů řadu problémů. Jedna ze slabých stránek spočívá v obtížnosti zautomatizování 2D elektroforézy. Zatímco kroky následující po elektroforéze jsou čím dál tím více zautomatizovány, samotná elektroforéza zatím zautomatizována není a zdá se že ani v blízké budoucnosti nebude. Další nevýhodou je enormní chemická diverzita proteinů a jejich odlišná exprese v buňkách nebo tkáních. S chemickou heterogenitou proteinů je spojen problém, že hodnoty pI a Mr řady proteinů přesahují rutinní rozsah analýz na 2D gelech, dokonce i v jednoduchých organizmech. (RABILLOUD 2002 )

### Hotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie sloužící k identifikaci separovaných proteinů využívá dvě základní ionizační techniky pro proteiny, jsou to elektropray (ESI) a matrix-assisted laser desorpční ionizace (MALDI). Tyto techniky jsou spojeny s různými hmotnostními analyzátory a každý z nich má své výhody i nevýhody. V zásadě, MALDI-TOF (time-of-flight=doba průletu) MS je efektivnější pro analýzu proteinů o vyšší molekulární hmotnosti, zatímco ESI-ion trap (iontová past) MS nabízí lepší citlivost pro detekci nízkých femtomolových hladin. (DUTT a LEE 2000 ) MS navíc také dokáže virtuálně charakterizovat některé typy post-translačních modifikací. Tato kombinace mezi hmotnostní spektrometrií a 2D elektroforézou doslova obrátila slovo proteomika o 90 stupňů. (RABILLOUD 2002 )

### Bioinformatika

Během toho jak pokračuje mapování a objasňování mikrobiálních proteomů, je nutné část úsilí věnovat snadnému zpřístupnění informací. Ne všechny informace mohou být prezentovány v publikaci a musí být dostupné v nějaké jiné formě- k tomuto účelu se právě ideálně hodí internet. V současné době je většina publikovaných bakteriálních proteomů dostupná ve formě interaktivních databází na webu. (FEY a LARSEN 2001 )

*Escherichia coli* je důležitým modelovým organismem pro biochemické a biologické studie. Celý její genom byl osekvcován do r 1997 a je plně dostupný v proteinové databázi jako je SWISS-PROT. V posledních deseti letech byly založeny *E.coli* 2DE

databáze, ECO2DBASE, databáze Andrewa Linka a SWISS-2D PAGE. *E.coli* SWISS-2D PAGE databáze byla vypracovávána až do roku 1995 a je částí ExpASy molecular biology server přístupná přes WWW na URL <<http://www.expasy.ch/ch2d/>>.

V *E.coli* 3,5-10 SWISS-2D PAGE mapě bylo identifikováno 231 polypeptidů technikou jako je srovnávání gelů, mikrosequencování, N-terminal sekvence tag, analýza aminokyselinového složení nebo jejich kombinacemi. Použití širokého rozsahu gelu dovoluje vizualizaci 40% proteomu *E.coli*. (TONELLA et al. 2001 )

#### **4.2. Proteomové signatury**

Ačkoliv je proteomová signatura nový termín, známe a používáme proteomové signatury už 20 let. Proteomová signatura představuje určitý proteinový profil, který charakterizuje bakteriální fyziologický stav nebo aktivitu bakterie. Vyskytují se však i odlišné fyziologické situace, které charakterizují podobné nebo stejné proteomové signatury. Například proteomové signatury reflektující interakci bakteriální buňky s antibiotikem na jedné straně a reakci na chladový či teplotní stres na straně druhé. (WEISER et al. 2005 )

Hlavní význam je v použití proteomických signatur k diagnóze fyziologických stavů buněk, v případě, že je cílové místo stimulující funkci mutantního proteinu neznámé. Studium proteinových expresních profilů *E.coli* v průběhu posledních 25 let už definovalo docela komplexní fenotyp mnoha proteinů. Bylo identifikováno mnoho důležitých signatur. Některé zahrnují pouze jeden protein, jiné jsou komplexnější. V dalším je uvedeno několik příkladů, které představují fyziologické situace na nichž se podílí antibiotika. (VANBOGELEN et al. 1999 )

Jsou známy tři významné sady proteinů jenž ukazují na jedinečný teplotní fenotyp. První řada je složena ze tří *E.coli* proteinů, které, jak se zdá, fungují jako buněčný termometr. (množství těchto proteinů se mění v kultuře rostoucí za rozdílných teplot) Druhá sada proteinů je indukována růstem v extrémní teplotě. A třetí sada proteinů s výrazným teplotním fenotypem se skládá z heat-shock a cold-shock proteinů. Heat a cold-shock proteiny skýtají proteomovou signatur pro ribozomální funkci. Antibiotika, jejichž cílem je ribozom mohou indukovat buď heat-shock nebo cold-shock proteiny. Antibiotika streptomycin, puromycin a kanamycin indukují heat-shock proteiny a antibiotika tetracyklin, chloramfenikol, erytromycin a spiramycin vyvolají buněčnou odpověď podobnou odpovědi vyvolané chladnějšími teplotami. Do této odpovědi patří: indukce cold shock proteinů, represe heat shock proteinů, indukce a represe mnoha



dalších. Ale specifické regulony pro cold- shock odpověď nebyly determinovány. Současný popis signatur pro tato antibiotika a pro chladový šok zahrnuje: cold-shock proteinovou signaturu, represi heat shock proteinovou signaturu a relaxovanou signaturu. Proteomické signatury blíže určují klíčové proteinové komponenty z jedinečných fyziologických stavů navozené specifickým prostředím nebo genetickým stavem. Tyto signatury poskytují informace použitelné pro diagnózu fyziologických stavů buněk dané prostředím a genetickými okolnostmi. Společně, fenotyp a signatury poskytují mikrobiálním fyziologům silný proteomický nástroj k řešení biologických funkcí neznámých proteinů. (VANBOGELEN et al. 1999 ) Aby bylo možné přiřadit jednoznačně přiřadit určitému fyziologickému stavu konkrétní proteomový profil nebo signaturu, je třeba studovat tento stav z dostatečného množství zdrojů, např. gelů, získaných za různých podmínek (WEISER et al. 2005 )

#### **4.3. Proteomika jako nástroj pro studium bakteriální fyziologie**

Proteom je definován jako kompletní soubor proteinů z genomu. Komplexní popis proteomu organismu poskytuje nejen přehled všech genomem kódovaných proteinů ale také údaje o proteinové expresi v definovaných podmínkách, výskyt post-translačních modifikací a distribuci specifických proteinů uvnitř buňky. (CASH 1998) „Proteom reprezentuje celek který se mění za různých podmínek a může se tedy měnit mezi tkáněmi jednotlivého organismu.“ (WILKINS et al. 1995 )

Potřeba a snaha pochopit celkovou proteinovou expresi je hlavním úkolem oblasti Proteomiky. Analýzy proteinů jsou důležité pro studium post-transkripční kontroly a post-translačních modifikací proteinů. (DUTT a LEE 2000)

Proteiny v buňkách neexistují izolované. Jsou součástí komplexů a navzájem interagují. 2D gelová elektroforéza spojená s analýzou, může odhalit které proteiny jsou spolu regulovány a důležitou úlohou pro proteomovou analýzu je pak charakterizovat kde, jak a kdy proteiny interagují s jinými. (FEY a LARSEN 2001)

Techniky využívané v proteomice byly vyvinuty kvůli analýze prokaryot i eukaryot. Relativně malá velikost bakteriálního genomu, a také to, že jsou častými modelovými organismy, je zřejmě příčinou, proč právě genomy mikroorganismů patří v současné době k nejprostudovanějším.

Mnoho bakterií odpovídá na stres za nepříznivých růstových podmínek syntézou specifických proteinů. V laboratoři může být stres indukován neoptimální růstovou teplotou, kyselostí, oxidativním stresem nebo vystavením účinku různých antibiotik.

(CASH 1998) U organismů rostoucích za rozdílných podmínek, budou exprimovány odlišné proteiny. Zobrazení profilu těchto proteinů nám umožní separační 2D gelová elektroforéza. Po srovnání gelů je určena proteinová identita z vybraných skvrn poskytující pohled do proteinových expresních změn vyplývajících z experimentálních podmínek.

Objev antibiotické rezistence v alarmujícím počtu lidských patogenů stimuloval výzkum principů mikrobiální patogenity. Proteomika usnadňuje určení změn v organismech vedoucích k patogenitě, rezistenci k antibiotikům a k imunitní odezvě.

Hlavní aplikace proteomiky je identifikovat proteiny zapojené do chorobných procesů, které snad budou vést k objevu léčebných zásahů.(WASHBURN a YATES 2000) Jako další příklady aplikace ve světě mikroorganismů je možno uvést buněčno-fyziologické studie regulace centrálního transportu uhlíku, stresovou odezvu, proteomika je i cestou k objevení nových zásahových míst pro nová léčiva a přípravě nových vakcín (FEY a LARSEN 2001)

## Materiál a metody

### MATERIÁL

Bakteriální kmeny a plazmidy:

**Kmen:** *Escherichia coli* s *env A* (NORMARK 1969) ,mutací, která způsobuje zvýšenou permeabilitu buněčné stěny pro makrolidy a jiná antibiotika.

Genotyp: UR172-F'23-5  $\Delta(lac-proB)$ , *ara*, *argE(UAG)*, *nalA*, *rpoB*, *thi*, *envA:: Tn 10*, *TetR*, *EryR* (ANDERSSON 1986) kmen byl získán od Dr. S. Andersson, University of Uppsala, Švédsko

**Plazmid:** pLUX2 nesoucí reportérový systém vytvořený na bázi bakteriální luciferázy (Viz Fig. ) byl získán od Dr. D. Schultze, University of Colorado, USA (SCHULZ 1990)

Kultivační půdy:

#### Minimální médium pro *E.coli* (M9)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3g
NaCl	0,5g
NH <sub>4</sub> Cl	1g

pH 7,4

po sterilizaci přidat do 10ml základu:

1M CaCl <sub>2</sub>	0,1μl
1M MgSO <sub>4</sub>	20μl
20% glukóza	100μl
10%(kaseinový hydrolyzát)	1ml
H <sub>2</sub> O	do 1000ml

#### LB pro *E.coli* (tekuté):

trypton	5g
kvasniční extrakt	2,5g

NaCl                    2,5g  
H<sub>2</sub>O                    do 500ml  
pH 7,1-7,2

**LB pro *E.coli* (pevné):**

Složení stejné jako tekuté LB medium, před sterilizací jsme přidali na 500 ml media 7,5 g agaru

Antibiotika Erytromycin, chloramfenikol a tetracyklin, v níže uvedených koncentracích jsme přidali do média těsně před kultivací.

Koncentrace uvedené u jednotlivých antibiotik odpovídají konečné koncentraci antibiotika v mediích.

Erytromycin            50µg/1ml  
Chloramfenikol        30µg/1ml  
Tetracyklin            15µg/ 1ml

Roztoky a pufry:

**Fyziologický roztok** (0,9%)

NaCl                    0,9 g  
Destilovaná voda    1000ml

**Lyzační pufr**

Močovina 8M                    12g  
CHAPS 4%                        1g  
Pharmalyte 3-10 0,8% (w/v)    0,5ml  
DTT                                0,25g  
Bromfenolová modř několik zrníček jako barevná značka  
Destilovaná voda do 25ml  
Uchováváme při 70°C

### **Rehydratační pufr**

Močovina 8M	7,2g
CHAPS 2%	0,3g
DTT 10mM	0,023g
3-10 Pharmalyte (40%) 0,8% (w/v)	0,5ml
Bromfenolová modř 36%	0,333g
Destilovaná voda do 15ml	

Roztoky používané při 2D elektroforéze:

### **Ekvilibrační roztok (základ)**

50mM Tris HCl

6M močovina

30% Glycerol

10% SDS

uchováváme při pokojové teplotě

Ekvilibrační roztok 1: přidat 0,2g DTT/ 10 ml základu

Ekvilibrační roztok 2: přidat 0,25g Iodacetamidu/ 10 ml základu

### **30% akrylamid mix**

Akrylamid 58,4g

Bis akrylamid 1,6g

Running buffer: (1,5M Tris-HCl 8,8)

Tris 36,3g

H<sub>2</sub>O do200ml

pH (HCl)

uchovávat při 4°C

### **10% SDS**

SDS 50g

H<sub>2</sub>O do 500ml

uchovávat při lab.teplotě

### 10%APS

amonium persulfát 0,5g  
H<sub>2</sub>O do 5ml  
uchovávat při 4°C

### Elektrodový pufr

Tris 0,025M 12g  
Glycin 0,192M 57,6g  
SDS 0,1% 9g  
Destilovaná voda do 4l

0,5% agaróza v elektrodovém pufru

### Gel 100ml (roztok pro deskové gely) 12,5%

30% akrylamid 41,5ml H<sub>2</sub>O deionizovaná 32,2ml  
1,5M Tris (pH 8,8) 7,5ml  
10%SDS 1ml  
10% APS 0,25ml  
TEMED 50µl

(0,5M Tris-HCl, pH 6,8)

Tris 3,0g  
H<sub>2</sub>O 50ml  
pH 6,8

Barvení gelů stříbrem:

#### 1. fixační roztok (1l)

Ethanol 400ml  
kyselina octová 100ml  
deionizovaná voda do 1000ml

**2. fixační roztok** (11):

50% glutaraldehyd)	10ml
ethanol	300ml
thiosířičitan draselný K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	2,5g
octan sodný	68g
deionizovaná voda do1000ml	

**Roztok dusičnanu stříbrného** (11):

dusičnan stříbrný	2g
Formaldehyd -těsně před zalitím gelů	250μl
deionizovaná voda do1000ml	

**Vyvíjecí roztok** (11)

Uhličitan draselný K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	30g
Formaldehyd -těsně před zalitím gelů	150ml
Thiosulfát sodný Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7,5mg
deionizovaná voda do1000ml	

**Zastavovací roztok**(11) 1%:

Kyselina octová	20ml
deionizovaná voda do1000ml	

**Roztok glycerolu** (11) 2%:

Glycerol	800ml
deionizovaná voda do1000ml	

Roztoky používané při měření přesnosti translace:

**PBS-fosfátový pufr** 20mM izotonický:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,742g
NaCl	4,5g
Destilovaná voda do 500ml	

pH 7,2 upraveno pomocí HCl

uchovávat v chladu

**Dekanal** (1,0% zásobní roztok):

Izopropanol            990 $\mu$ l

n-Dekanal            10 $\mu$ l

uchovávat v chladu

**Dekanal** (0,002%-pracovní roztok):

1% dekanal            0,2ml

Izopropanal           3,8ml

PBS                    96ml

**Chemikálie**

Aceton	LACHEMA
Agar	OXOID
Agaróza	SIGMA
Akrylamid	SERVA
Amoniumpersulfát APS	SERVA
Bis akrylamid	SERVA
Bromfenolová modř	SIGMA
Casamin	DIFCO
Deionizovaná voda H <sub>2</sub> O	
Dekanal	LACHEMA
Dithiotreitol DTT	SERVA
Dodecyl sulfát sodný SDS	SERVA
Dusičnan stříbrný AgNO <sub>3</sub>	LACHEMA
Erytromycin Ery	AMERSHAM
Etanol	LACHEMA



Formaldehyd	LACHEMA
Glutaraldehyd	SIGMA
Glukóza	LACHEMA
Glycin	LACHEMA
Hydrogen fosforečnan draselný $K_2HPO_4$	LACHEMA
Hydrogen fosforečnan sodný $Na_2HPO_4$	LACHEMA
Hydroxid sodný NaOH	LACHEMA
Chloramfenikol Chlo	AMERSHAM
Chlorid amonný $NH_4Cl$	LACHEMA
Chlorid sodný NaCl	LACHEMA
Iodacetamid	SIGMA
Izopropanol	LACHEMA
Trypton	OXOID
Kvasničný extrakt	OXOID
Kyselina chlorovodíková HCl	LACHEMA
Kyselina octová	LACHEMA
Kyselina trichloroctová TCA	SIGMA
methionin $^{35}S$ (10 $\mu$ Ci/ml)	AMERSHAM
Octan sodný	LACHEMA
Pharmalyt	AMERSHAM
Síran hořečnatý $MgSO_4$	LACHEMA
Tetrathionát draselný $K_2S_4O_6$	FLUKA
Tetracyklin Tet	AMERSHAM
thiosíran sodný $Na_2S_2O_3$	FLUKA
Tris HCl	SERVA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan TEMED	SERVA
Uhličitan draselný $K_2CO_3$	LACHEMA

Stripy s nelineárním imobilizovaným pH gradientem pH 3-10, 18 cm AMERSHAM.

### **Přístroje a software:**

Zařízení pro kontinuální kultivaci- turbidostat, skleněné reaktory byly vyrobeny v dílnách MBU, (pumpy, vodní lázeň) viz foto  
Luminometr LUMIStox, Dr.Lange

Zařízení na 2D elektroforézu Amersham Pharmacia Biotech a Genomic Solution

Multifunkční zařízení Molecular Imager FX BioRad

Software: BioRad PDQUEST, Microsoft Office

běžné laboratorní vybavení

## **METODY**

### **Kontinuální kultivace**

Pro kontinuální kultivaci v našem experimentu jsme použili zařízení turbidostat. Část kultury byla průběžně odebírána a kultura doplňována čerstvým médiem z rezervoáru.

Pouze nebylo vybaveno automatickým čidlem měření OD. Toto měření jsme prováděli průběžně sami.

#### *Příprava kontinuální kultivace*

- Sestavili jsme zařízení pro kontinuální kultivaci.

Připravili jsme 2 pětilitrové baňky s x ml média M9 s přísadkami antibiotik (Tetracyklin, Chloramfenikol,) první s Erytromycinem (doplnit konečné koncentrace antibiotik!!!) a druhou bez erytromycinu pro kontrolní pokus.

- Ze zásobní kultury v glycerinu jsme zaočkovali inokulum, které jsme nechali přes noc narůst.
- 5 ml inokula přes noc narostlé kultury jsme naočkovali do kontinuální kultivace a nechali narůst do OD 0,9 (měřené při 600nm) .

#### *Průběh kultivace*

- Souběžně jsme prováděli dvě kultivace ve stejném médiu, v jednom případě s Erytromycinem a ve druhém bez antibiotika - jako kontrolu. Po dosažení OD 0,9 jsme nastavili přítok čerstvého média a po několik hodin kontrolovali v 60-ti minutových intervalech nastavení pump, objem vytékající kultury a OD.
- Po stabilizaci obou systémů jsme zahájili vlastní pokus a kultivaci jsme nechali probíhat po dobu  $\approx 100$  hod. Během kultivace jsme vždy po deseti hodinách prováděli odběry vzorků a měřili OD, kterou jsme zaznamenávali do grafu.

- Ze vzorků jsme připravili zásobní kultury v glycerinu. Do ependorfky jsme pipetovali 900 $\mu$ l narostlé kultury. Pak jsme doplnili 900  $\mu$ l 60% glycerolu. Uložili jsme v -80°C.
- Sestavili jsme graf-vynesím závislosti OD na čase.

Z grafu závislosti OD na čase jsme dostali křivku, která odpovídala průběhu kontinuální kultivace.

Z této křivky jsme vybrali 4 body (časy) které charakterizují průběh kontinuální kultivace. Jsou to tyto: Čas 43 hod., 68hod.,77hod., 103hod. Dále už jsme pracovali pouze s těmito vzorky.

### **Růstové křivky a generační doba**

Růstové parametry odebraných vzorků kultur jsme měřili při jednorázové kultivaci v baňce, v objemu 3ml, po dobu 6 hodin.

Doba, za kterou se počet buněk zdvojnásobí se nazývá generační doba T .

Vypočteme ji jako převrácenou hodnotu rychlosti dělení bakterií.

*Příprava inokula:*

- Připravili jsme 24 ml média M9, do kterého jsme přidali 24  $\mu$ l zásobního roztoku Tetracyklinu a 24  $\mu$ l roztoku Chloramfenikolu.
- Rozlili jsme ho do 4 zkumavek po 3ml a označili ( K43, K68, K77, K103).
- Do zbylých 12 ml jsme přidali 12  $\mu$ l roztoku Erytromycinu. Rozlili jsme do 4 zkumavek po 3 ml a označili (E43, E68, E77, E103).
- Takto připravená inokula jsme zaočkovali 100  $\mu$ l kultury z glycerínek označených K43, K68, K77, K103 a stejně tak z glycerínek E43, E68, E77, E103
- Nechali jsme inkubovat 24 hodin ve 37°C na třepačce.

*Příprava kultivace:*

- Připravili jsme 200 ml média M9, do kterého jsme přidali 200 $\mu$ l roztoku Tetracyklinu a 200 $\mu$ l Chloramfenikolu.
- Rozlili jsme do 4 erlenek po 25 ml, které jsme označili ( K43, K68, K77, K103).

- Do zbylých 100 ml jsme přidali 100 $\mu$ l roztoku Erytromycinu, rozlili jsme do 4 erlenek po 25 ml a označili (E43, E68, E77, E103).

#### *Kultivace:*

- Připravené erlenky jsme zaočkovali z narostlého inokula ( 250  $\mu$ l na erlenku).
- Změřili jsme OD, která měla být asi od 0,05 do 0,1 .
- Kultivovali jsme na třepačce v termostatu ve 37°C.
- Každou půlhodinu jsme odebírali vzorky z jednotlivých erlenek a měřili OD, kterou jsme zaznamenávali do tabulky. Celkem jsme měřili 6 hodin.

#### *Zpracování výsledků:*

- Hodnoty OD jednotlivých vzorků jsme převedli na logaritmus při základu dvě a vynesli v závislosti na čase a získali tak růstové křivky.
- Výslednými křivkami jsme proložili spojnice trendu a zobrazili rovnici regrese:  
 $y=ax+b$
- Z této jsme pak spočítali generační dobu podle vzorce:  $T=1/a$ .

### **Stanovení počtu živých buněk, CFU**

Mírou nárůstu biomasy bakterií je optická denzita, kterou můžeme měřit na spektrofotometru. Měříme hustotu zákalu roztoku. Paprsek procházející kyvetou je částečně pohlcován buňkami bakterií přítomnými v roztoku.

Spektrofotometr nám však neumožní rozlišit, jsou-li buňky v kyvetě mrtvé nebo živé. To nám umožní pouze vyšetí buněk na miskou. Za předpokladu, že z každé živé buňky vyroste jedna kolonie pak stačí spočítat počet narostlých kolonií na misce.

#### *Příprava:*

- Připravili jsme 500 ml fyziologického roztoku (0,9%). Rozpipetovali po 5ml do zkumavek a dali vysterilizovat.
- Připravili jsme LB médium s agarem.
- Nalévali jsme misky, vždy 3 misky pro každý vzorek (vzorků je celkem osm- K43, K68, K77, K103, E43, E68, E77, E103).

#### *Ředění:*

- 50  $\mu$ l kultury ze zásobního roztoku v glycerinu jsme pipetovali do 5ml sterilního fyziologického roztoku ve zkumavce a krátce promíchali.
- Takto jsme připravili ředící řadu od  $10^{-2}$   $\rightarrow$   $10^{-8}$ .

#### *Očkování:*

- Ze zkumavky s ředěním  $10^{-8}$  jsme pak očkovali 500  $\mu$ l na misky s LB a rozetřeli skleněnou hokejkou po celé ploše misky.
- Po vsáknutí jsme misky obrátili dnem vzhůru a nechali inkubovat do druhého dne při 37°C.
- Tento postup jsme opakovali pro všechny vzorky.

*Zpracování výsledků:*

- Druhý den jsme počítali narostlé kolonie.
- Z Počtu kolonií na třech miskách jsme vypočetli průměrnou hodnotu a do tabulky vyjádřili jako počet živých buněk v 1 ml.

### **Měření luminiscence a přesnost translace**

Za fyziologických podmínek dochází k chybám v translaci jen zřídka. V přítomnosti erytromycinu se však nepřesnost translace významně zvyšuje.(O'CONNOR et al. 2004 ) Pro měření přesnosti translace jsme použili plazmid pLUX2 nesoucí geny luxA a luxB pro bakteriální luciferázu. (SCHULTZ, 1990 ) V počátku genu luxB je vložen stop kodon, který způsobí, že produkt genu luxB nemůže být syntetizován a netvoří se funkční luciferáza. Pouze v případě, kdy je stop kodon přečten chybně jako funkční kodon, translace pokračuje dál a tvoří se funkční luciferáza- bakterie vyzáří světelné kvantum. Intenzita luminiscence se měří v luminometru.

*Příprava:*

- Připravili jsme 16 ml tekutého LB.
- Do 16 ml LB jsme přidali 16  $\mu$ l roztoku chloramfenikolu a tetracyklinu. Odebrali jsme co jsme po 2 ml do 4 zkumavek které jsme označili jako ( K43, K68, K77, K103).
- Do zbylých 8 ml jsme přidali 8 $\mu$ l roztoku erytromycinu a rozdělili po 2 ml do 4 zkumavek které jsme označili jako (E43, E68, E77, E103).
- Zkumavky jsme zaočkovali 100  $\mu$ l kultury ze zásobního roztoku v glycerolu a inkubovali na třepačce při 37°C.
- Připravili jsme si PBS a 0,0002% roztok dekanalu.
- Do malých zkumavek jsme přidali po 750 $\mu$ l PBS, tak abychom měli pro každý vzorek 6 zkumavek.

#### *Měření:*

- Z kultury narostlé do OD 0,5 přidáme 20 $\mu$ l do malé zkumavky .
- Těsně před měřením jsme přidali 250 $\mu$ l dekanalu.
- Měřili jsme na luminometru.
- Kulturu jsme nechali dále růst a stejným způsobem měřili při OD 0,8.
- Jako kontrolu jsme změřili i samotné médium .

Z výsledků 6 měření jsme vypočetli průměr.

#### **Stanovení rezistence k erytromycinu**

Rezistenci buněk v jednotlivých odběrech z kultivace jsme zjistili výsevem na gradientové misky s koncentračním gradientem erytromycinu. Na jedné straně je koncentrace erytromycinu nulová a na straně opačné maximální (50 $\mu$ g/ml).

#### *Příprava:*

- Připravili jsme si LB médium (2x 250ml).
- Do poloviny LB média jsme přidali roztok erytromycinu tak aby konečná koncentrace byla 50 $\mu$ g/ml.
- Misky jsme umístili do šikmé polohy .
- Nalili jsme 25 ml LB bez antibiotika a ve stejné poloze nechali 30 min.ztuhnout.
- Potom jsme umístili misky do vodorovné polohy .
- Misky jsme zalili 25 ml LB s erytromycinem a nechali opět ztuhnout.
- Misky jsme vysušili ve flow-boxu.

#### *Příprava inokula:*

- Připravili jsme si tekuté LB médium .
- Rozdělili jsme ho 5 ml do 8 baněk.
- Zaočkovali jsme baňky z glycerolová zásobní kultura K43, K68, K77, K103 a E43, E68, E77, E103.
- Nechali jsme inkubovat na třepačce v 37 °C do druhého dne.

#### *Očkování:*

- Na každou misku jsme očkovali 500  $\mu$ l z narostlého kultury K43, K68, K77, K103 a stejně tak E43, E68, E77, E103.
- Nechali jsme vsáknout, obrátili dnem vzhůru a inkubovali do druhého dne ve 37°C.

#### *Vyhodnocení:*

- Porovnáním misek jsme zjistili, na které vyrostlo nejvíce rezistentních kolonií .

- Srovnávali jsme i velikost kolonií v rámci jediné misky.

### **Příprava klonů**

- Z misky E68 jsme vybrali dvě kolonie málo rezistentní (z místa kde je nízká koncentrace antibiotika ) a dvě více rezistentní ( z místa s vysokou koncentrací antibiotika).
- Připravili jsme si médium M9 a rozpipetovali do erlenek po 5 ml.
- Potom sterilně (vyžíhanou kličkou nebo sterilním párátkem) jsme odebrali kolonie
- Zaočkovali jsme do erlenky s M9 a druhý den připravili zásobní roztoky kultury v glycerolu.
- 

### **2D elektroforéza**

*Příprava a značení bakteriální kultury  $^{35}\text{S}$  methioninem:*

1 ml M9 media ve zkumavce jsme zaočkovali asi 200  $\mu\text{l}$  kultury z glycerinky, tak aby počáteční zákal byl kolem 0,2 (OD při 600nm).

Kultivovali jsme v 37° C na třepačce až do zákalu 0,4-0,5. Pak jsme přidali 5 $\mu\text{l}$   $^{35}\text{S}$  značeného methioninu (10 $\mu\text{Ci/ml}$ ) a ještě hodinu nechali třepat.

Přenesli jsme 1ml do ependorfky a přidali 0,5 ml TCA. Nechali jsme precipitovat na ledu alespoň hodinu. Potom jsme stočili na stolní centrifuze 10min. při 1500 rpm. Precipitát jsme propláchli etanolem a rozpustili v 1ml acetonu. Uložili jsme do -20°C

Těsně před 2D elektroforézou jsme vzorky stočili na stolní centrifuze 10 min při 15 000 rpm. Pelet jsme rozsuspendovali v 200  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru.

2D elektroforéza:

Izoelektrická fokusace

*Rehydratace stripů:*

Používali jsme komerční IPG proužky (stripy) s nelineárním imobilizovaným pH gradientem, pH 3-10, 18 cm dlouhé od firmy Amersham.

Napipetovali jsme 360ml rehydratačního pufru do drážky tak, aby nevznikla žádná bublina. Potom jsme položili do drážky proužek pokrytý gelem. Zalili jsme každý 2ml oleje.

Přes noc jsme nechali nasáknout pufr do gelu.

#### *1.rozměr: IZOEL. FOKUSACE (dělení podle izoelektrického bodu)*

Druhý den jsme vyndali nabobtnalé stripy z lednice. Každý jsme omyli z obou stran 5 ml vody, osušili buničinou a umístili do aparatury. Zalili jsme olejem. Pak jsme umístili elektrody, spustili jsme elektroforézu. (t=20°C) Elektroforéza běžela za těchto podmínek

Krok	napětí	el.proud	energie	el.výkon	čas
1	150V	1mA	5W	1Vh	
2	150V	1mA	5W	300Vh	2h
3	300V	1mA	5W	1Vh	
4	300V	1mA	5W	600Vh	2h
5	3500V	1mA	5W	10Vh	5h
6	3500V	1mA	5W	60Vh	17,1h
Celkově				70900Vh	26,1h

Po skončení elektroforézy jsme vyndali jednotlivé proužky, nechali odkapat olej a dali do Petriho misek. Poté jsme je mohli nechat libovolně dlouho v mrazáku, nebo ihned provést dělení v druhém rozměru.

#### Ekvibrace

Proužky jsme ekvilibrovali 2 x 10 minut. S DDT a iodacetamidem.

#### Příprava deskových gelů

Roztok na přípravu deskových gelů se nalije mezi skleněné pláty a nechá zpolymerovat za pokojové teploty. Po té se uchovává v lednici.

#### *2.rozměr: SDS ELFO (dělení podle molekulové hmotnosti)*

Zasunuli jsme jednotlivé proužky pinzetou do deskového gelu, a shora zalili nízkotuhnoucí agarózou, aby nevyplavaly. Deskový gel obsahoval SDS, dávající proteinům uniformní záporný náboj.



1	150V	1mA	5W	1Vh	
2	150V	1mA	5W	300Vh	2h
3	300V	1mA	5W	1Vh	
4	300V	1mA	5W	600Vh	2h
5	3500V	1mA	5W	10kVh	5h
6	3500V	1mA	5W	109kVh	31h
7				119400Vh	40h

Po skončení elektroforézy jsme vyjmuli gely z desek a vizualizovali rozdělené proteiny.

#### *Vizualizace:*

K vizualizaci jsme použili barvení stříbrem, které je citlivější než barvení Coomassie Brilliant Blue.

#### *Barvení stříbrem:*

V následující proceduře jsme pracovali s objemem 500ml

Všechny kroky probíhaly za pokojové teploty a roztoky s gely jsme opatrně

třepali. 1. Nechali jsme gel ve Fixačním roztoku 1 přes noc

2. Umístili jsme gel do Fixačního roztoku 2 na 1 hod. 3. Gel jsme promyli 4x15 minut v deionizované vodě

4. Umístili jsme gel do roztoku stříbra na 30 min.

5. Gel jsme promývali deionizovanou vodou 4x 15min.

6. Gel jsme umístili do vyvíjecího roztoku. (Během tohoto kroku můžeme pozorovat malé množství hnědé sraženiny). Gel jsme nechali v roztoku, dokud se neobjevily skvrny (přibližně 5-8 min.)

7. Gel jsme umístili na 10 min. do stop roztoku

8. Umístili jsme gel do roztoku 2% glycerolu na 10 min. Tento krok umožňuje uchovat gel delší dobu aniž by popraskal

#### *Detekce radioaktivně značených proteinů:*

#### **Scanování a digitalizace získaných gelů:**

Mokré neradioaktivní gely jsme scanovali na scanneru hp scanjet 7400c.

Radioaktivní:

Před vyvoláváním jsme zakládali suché gely do kazet Fuji, kde zůstaly založené cca 3 dny. Po té jsme je scanovali na multifunkčním zařízení MOLECULAR, MAGER FIX firma BioRad.

V programu PDQuest 7.3.1 jsme nastavili parametry: Radioisotopes, Fuji-screen, rozlišení 100 $\mu$ m, a oblast dat.

### Matchování gelů (hledání shody)

Gely byly matchovány v programu PD Quest.

Jednotlivé match sety byly sestaveny ze dvou paralelních pokusů pro každý vzorek.

Jako master gel pro daný match set byl vybrán nejkvalitnější gel.

### Zpracování dat

Výsledná data byla zpracována v programu Microsoft Excel do sloupcových grafů.

Vnitřním standardem byl EF Tu. Relativní rychlost byla vypočtena jako poměr EF Tu ke všem proteinům. To znamená: integrovaná plocha skvrny se dělila součtem všech integrovaných ploch.

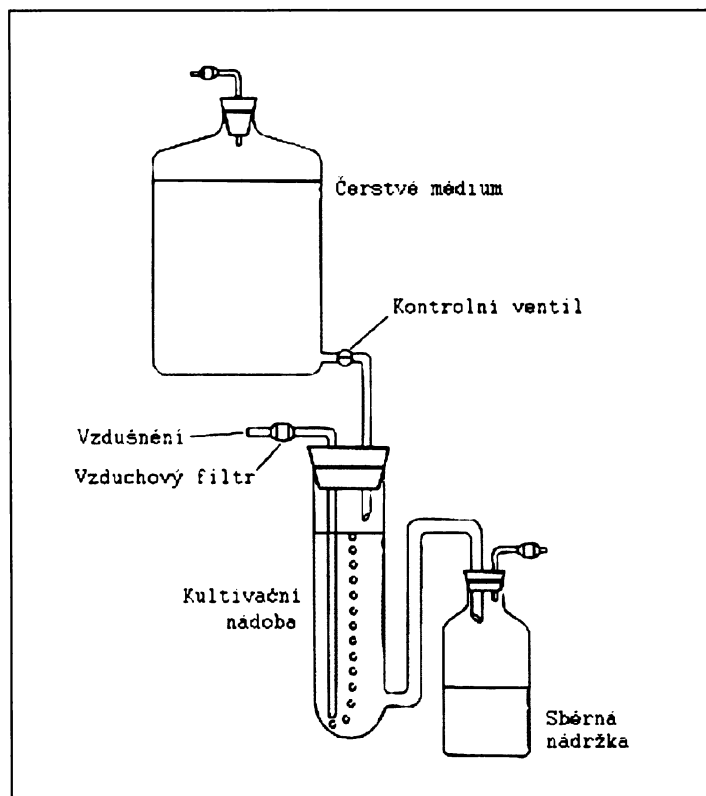
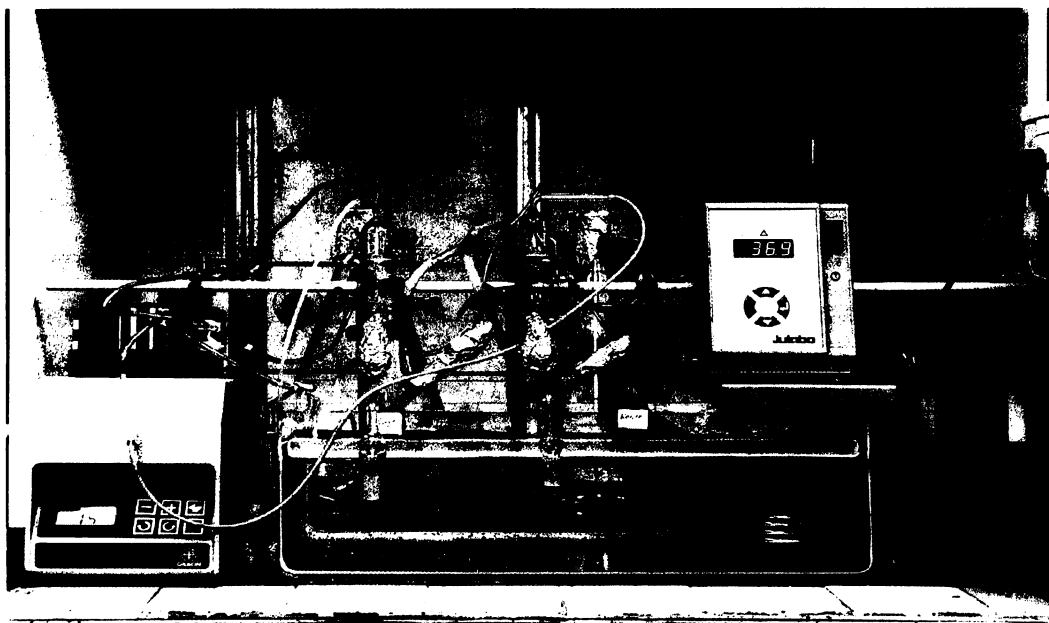


Schéma kontinuálního kultivačního systému



Reálné kultivační zařízení

## Výsledky

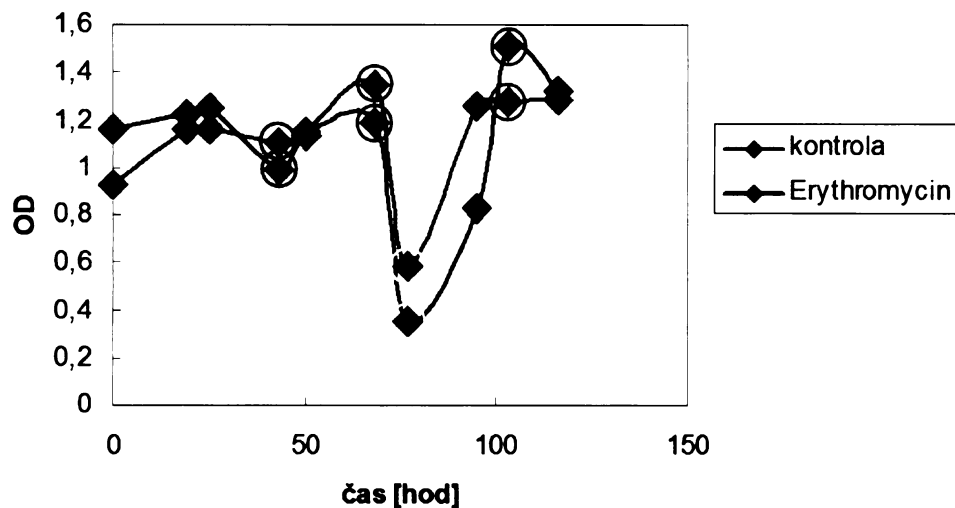
### Fyziologie bakteriální kultury

U kmene *E.coli env A* jsme studovali vliv erytromycinu na základní fyziologické parametry v průběhu kontinuální kultivace v turbidostatu. Sledovali jsme změny v generační době, počtu živých buněk, relativní přesnosti translace a resistenci k erytromycinu v bakteriálních populacích z odebraných vzorků v experimentu kde v médiu byl trvale přítomen erytromycin v koncentraci 50 ug/ml a v kontrolním experimentu bez erytromycinu.

### Růstové parametry

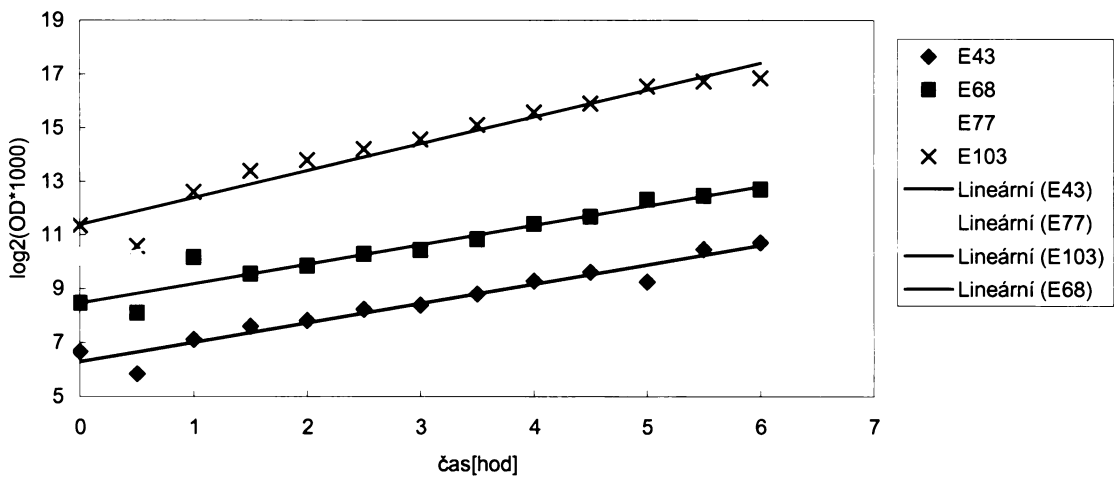
Obrázek 1 popisuje růstový profil během kontinuální kultivace. Graf znázorňuje oba dva experimenty, kdy *E.coli* kultura rostla v přítomnosti erytromycinu v médiu M9 a kontrolu bez antibiotika. Kultivace probíhala cca 100 hodin za konstantního přítoku čerstvého media při počátečním nastavení zředovací rychlosti. První (červená) křivka zakresluje průběh kultivace *E.coli* v médiu s erytromycinem (koncentrace erytromycinu v médiu je 50µg/1ml), druhá (zelená), kontrolní, zakresluje průběh kultivace *E.coli* v médiu bez erytromycinu. Jednotlivé body odpovídají časům, v nichž byla kultura odebrána ke změření OD. Barevnými kroužky jsou vyznačeny body-časy, kdy jsme odebrané vzorky dále analyzovali. Až do 68 hodiny experimentu byl průběh bez výraznějších změn v OD kultury, pouze ve 43 hodině jsme zaznamenali mírný pokles. V hodině 68. se hustota roztoku buněk opět zvýšila, ale v následujícím měření (77h) jsme zaznamenali prudký pokles. V dalším průběhu se OD opět výrazně zvýšila a nejvyššího maxima v průběhu celého experimentu dosáhla v bodě 103. hodiny.

Z grafu je dále vidět, že kontrolní křivka se příliš neliší od křivky s erytromycinem. Snad jen pokles v 77 hodině byl v případě erytromycinu hlubší a nárůst ve 103 hodině naopak vyšší. Z odběrů v časech 43, 68, 77 a 103 hodiny jsme připravili zásobní kultury v glycerinu a s těmito vzorky nadále pracovali.

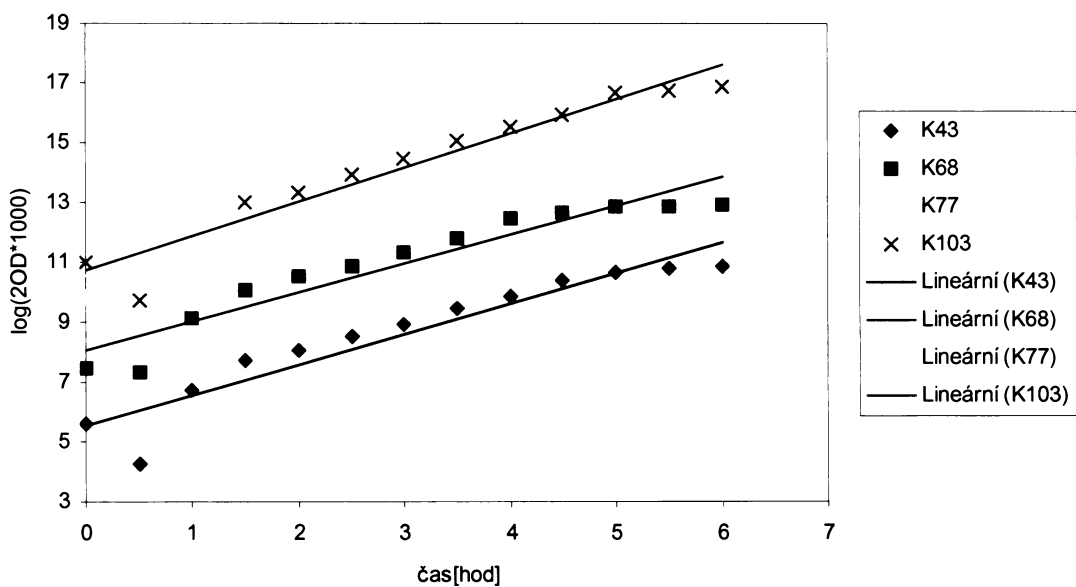


Obr. 1: Křivky znázorňující průběh OD při kontinuální kultivaci *E.coli* v mediu M9 v přítomnosti (červená) a nepřítomnosti erytromycinu (zelená). Barevně jsou označeny časy 43, 68, 77 a 103 hodiny, ve kterých byly odebrány vzorky pro další analýzy.

Obrázky 2a a 2b znázorňují výsledky z tzv. batch-kultivace vybraných vzorků. Kultivovali jsme vzorky *E.coli*, odebrané ve čtyřech časech, které jsou zvýrazněny v obrázku 1. Jsou to časy 43, 68, 77 a 103 hodiny. Cílem experimentu bylo určit růstovou rychlost populací buněk odebraných v jednotlivých časech v obou experimentech. Logaritmické vynesení závislosti OD na čase umožnilo vypočítat ze směrnic získaných přímků generační doby pro jednotlivé populace bakterií odebrané z kontinuálního systému. Hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1. Generační doby pro jednotlivé vzorky se výrazně lišily jednak mezi experimentem a kontrolou (s erytromycinem a bez erytromycinu), ale i v rámci každého experimentu v jednotlivých fázích kultivace.



Obr. 2a: Růstové křivky vzorků *E.coli populace* s erytromycinem (E) v časech 43 hod, 68 hod, 77 hod, 103 hod; kultivováno 6 hod.v médiu M9 (pro lepší přehlednost jsou hodnoty na ose y posunuty- E 103 o absolutní hodnotu 6; E 77 o absolutní hodnotu 4; E 68 o absolutní hodnotu 2.



Obr.2b: Růstové křivky vzorků *E.coli* bez erytromycinu (K) v časech 43h, 68h, 77h, 109h; kultivováno 6 hod.v M9 (pro lepší přehlednost jsou hodnoty na ose y posunuty- K 103 o absolutní hodnotu 6; K 77 o absolutní hodnotu 4; K 68 o absolutní hodnotu 2.

Výsledky v tabulce 1 jak bylo řečeno vykazují určitou korelaci s růstovým profilem

(Obr. 2), a navíc odráží i vliv selekčního tlaku antibiotika přítomného v experimentu. V čase 77. hodin, kdy byl v kontinuální kultivaci zaznamenán výrazný propad OD je generační doba u vzorku s erytromycinem asi o více než deset minut kratší než v předchozích dvou časech a v následujícím čase dokonce kratší o dalších deset minut. Naopak v kontrole byla v čase 77 hodin generační doba nejdelší, ale v čase 103 se také výrazně zkrátila.

Čas odběru/experiment	Rovnice regrese pro výpočet generační doby $y=ax+b$	Generační doba (min.)
43 hod/K	$y = 1,0202x + 5,5559$	58,9
68 hod/K	$y = 0,9628x + 6,0586$	62,3
77 hod/K	$y = 0,8597x + 6,5551$	69,8
103 hod/K	$y = 1,1429x + 4,7322$	52,5
43 hod/E	$y = 0,3593x + 5,9443$	83,5
68 hod/E	$y = 0,7223x + 6,4725$	83,1
77 hod/E	$y = 0,8301x + 5,9951$	72,3
103 hod/E	$y = 1,0061x + 5,3811$	59,6

Tab.1: Srovnání generační doby populace kontrolní a s erytromycinem

## Počet živých buněk

Dalším parametrem, který jsme sledovali byl počet živých buněk v odebraných vzorcích, který by mohl vysvětlit pozorované rozdíly v OD v průběhu kultivace. Navíc u kmene *E. coli* nesoucího *EnvA* mutaci byla popsána tvorba vláken jako důsledku poruch v dělení buněk a tím rozdíly mezi OD a počtem živých buněk. (NORMARK 1969) V tabulce 2 tedy srovnáváme počet živých buněk, neboť OD nám sice vypovídá o celkovém buněčném objemu přítomném v médiu, počet živých buněk však zjistíme pouze vyšetím na plotnu. Při porovnání počtů živých buněk jsme zjistili rozdíly mezi kontrolními populacemi a populacemi s erytromycinem. Ale také rozdíly mezi jednotlivými časy. Největší rozdíl mezi OD a počtem živých buněk byl zjištěn u vzorku 77. hodin v kultivaci s erytromycinem, kde jsme současně registrovali výrazný pokles OD v experimentu i v kontrole.

Čas odběru/experiment	OD	Počet buněk v 1 ml (CFU)	CFU/OD
43 hod/K	1,105	$2,6 \times 10^8$	2,3 <i>x</i>
68 hod/K	1,346	$27,0 \times 10^8$	20,0 <i>x</i>
77 hod/K	0,588	$15,0 \times 10^8$	25,5 <i>x</i>
103 hod/K	1,275	$6,7 \times 10^8$	5,2 <i>x</i>
43 hod/E	0,99	$54 \times 10^8$	54,0 <i>x</i>
68 hod/E	1,186	$216 \times 10^8$	182,1 <i>x</i>
77 hod/E	0,355	$169 \times 10^8$	476,0 <i>x</i>
103 hod/E	1,513	$46 \times 10^8$	30,4 <i>x</i>

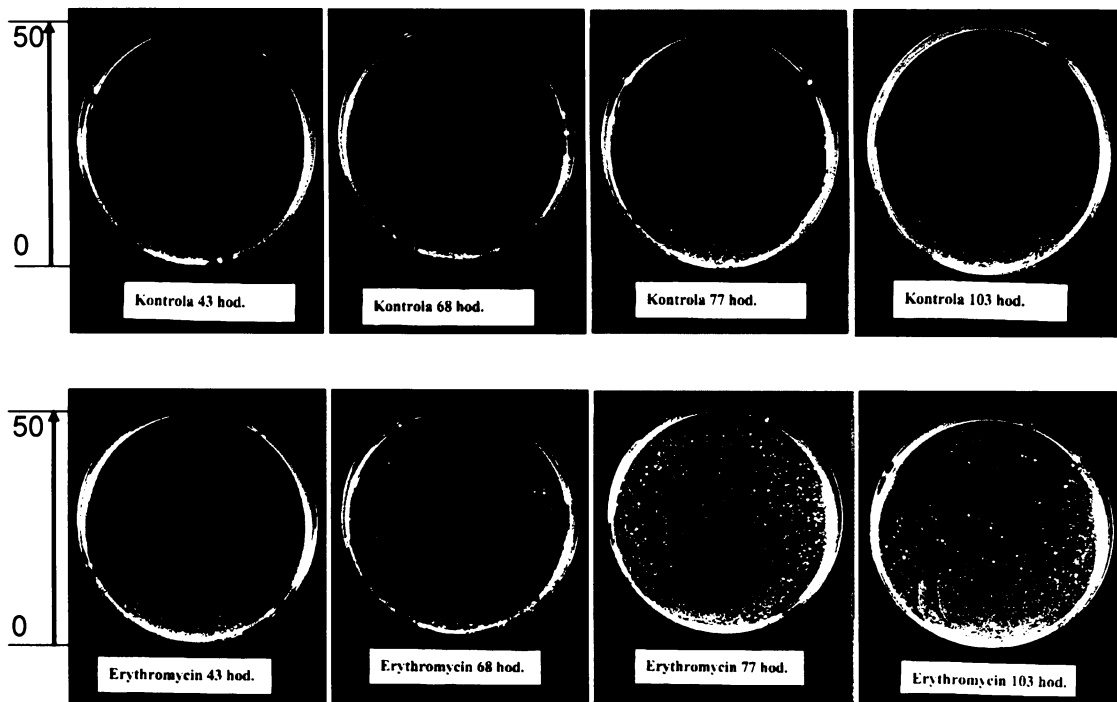
Tab.2: Srovnání počtu živých buněk v populaci s erytromycinem(E) a v kontrole (K).

## Resistence k erytromycinu

Jedním z hlavních parametrů, které jsme sledovali byla hladina resistance k erytromycinu v průběhu kontinuální kultivace u testovaného kmene *E. coli*. Srovnávali jsme vliv trvalého selekčního tlaku zprostředkovaného stálou koncentrací erytromycinu (50 ug/ml) a nepřítomnosti antibiotika na hladinu resistance k antibiotiku v odebraných vzorcích. Množství rezistentních buněk ve vzorcích z času 43, 68, 77 a 103 hodiny jsme ověřovali na gradientových plotnách, připravených tak, že na jedné straně byla minimální koncentrace (cca 0 ug/ml) erytromycinu a straně druhé maximální (50 ug/ml).



ERY  $\mu\text{g/ml}$



Obr.3: Gradientové plotny s nárůstem *E.coli*; zleva: kontrolní vzorek 43 hod., 68 hod., 77 hod., 103 hod., vzorek s erytromycinem 43 hod., 68 hod., 77 hod., 103hod.

Na obrázku 3 jsou gradientové plotny, na nichž jsme zjišťovali rezistenci k erytromycinu u jednotlivých vzorků. Zatímco misky z pokusu kontrolního se od sebe více méně neliší a ve všech čtyřech časech byl pozorován nárůst buněk pouze v místě, kde koncentrace erytromycinu dosahuje velmi nízkých hodnot, v případě pokusu s erytromycinem jsou na první pohled patrné rozdíly. Výsledky ukazují, že hladina tolerance antibiotika v tekutém mediu, kde 50  $\mu\text{g/ml}$  erytromycinu způsobilo pouze asi 15% snížení růstové rychlosti, je podstatně vyšší než na pevné půdě. Kontrolní řada misek vykazuje v průběhu celé kultivace stejnou hladinu resistance maximálně do 15  $\mu\text{g/ml}$ . V případě experimentální řady (kontinuální kultivace v přítomnosti erytromycinu) se miska se vzorkem ze 43 hodin podobá distribucí a počtem resistantních buněk kontrolnímu pokusu, ale na misce v následujícím čase (68 hodin) už vidíme daleko větší počet resistantních kolonií. Největší nárůst vysoce resistantních kolonií je pak na misce odpovídající času 77 hodin, kde kolonie pokrývají povrch celé plotny. Podobně je tomu i na poslední misce, i když počet vysoce resistantních kolonií je zde o trochu menší.

## Přesnost translace

K měření přesnosti translace jsme využili reportérový systém vytvořený na bázi bakteriální luciferázy, který umožňuje měřit nonsense supresi stop kodonu umístěného v proximální části *luxB* genu. Ta pak vede ke správnému čtení celého genu a tím dochází k vyšší emisi světla. Vyšší luminiscence tedy představuje vyšší počet translačních chyb, tedy nižší přesnost translace.

Tabulka 3 uvádí hodnoty naměřené luminiscence bakterií a rychlost translace vyjádřenou jako podíl Rlu (relativní luminiscence) a OD. V čase 77 hodin kultivace s erytromycinem, ale i případě kontrolního pokusu jsme pozorovali výrazné zvýšení hodnoty Rlu/OD, což znamená nižší přesnost translace.

Čas	OD	Rlu	Rlu/OD
43 hod/K	1,105	2,51	2,3
68 hod/K	1,346	3,1	2,3
77 hod/K	0,588	1,99	3,4
103 hod/K	1,275	1,96	1,5
43 hod/E	0,99	1,3	1,3
68 hod/E	1,186	1,87	1,6
77 hod/E	0,355	2,4	6,8
103 hod/E	1,513	2,97	2,0

Tab. 3: Přesnost translace u populace K a Ery měřeno relativní luminiscencí

Rlu – relativní luminiscence

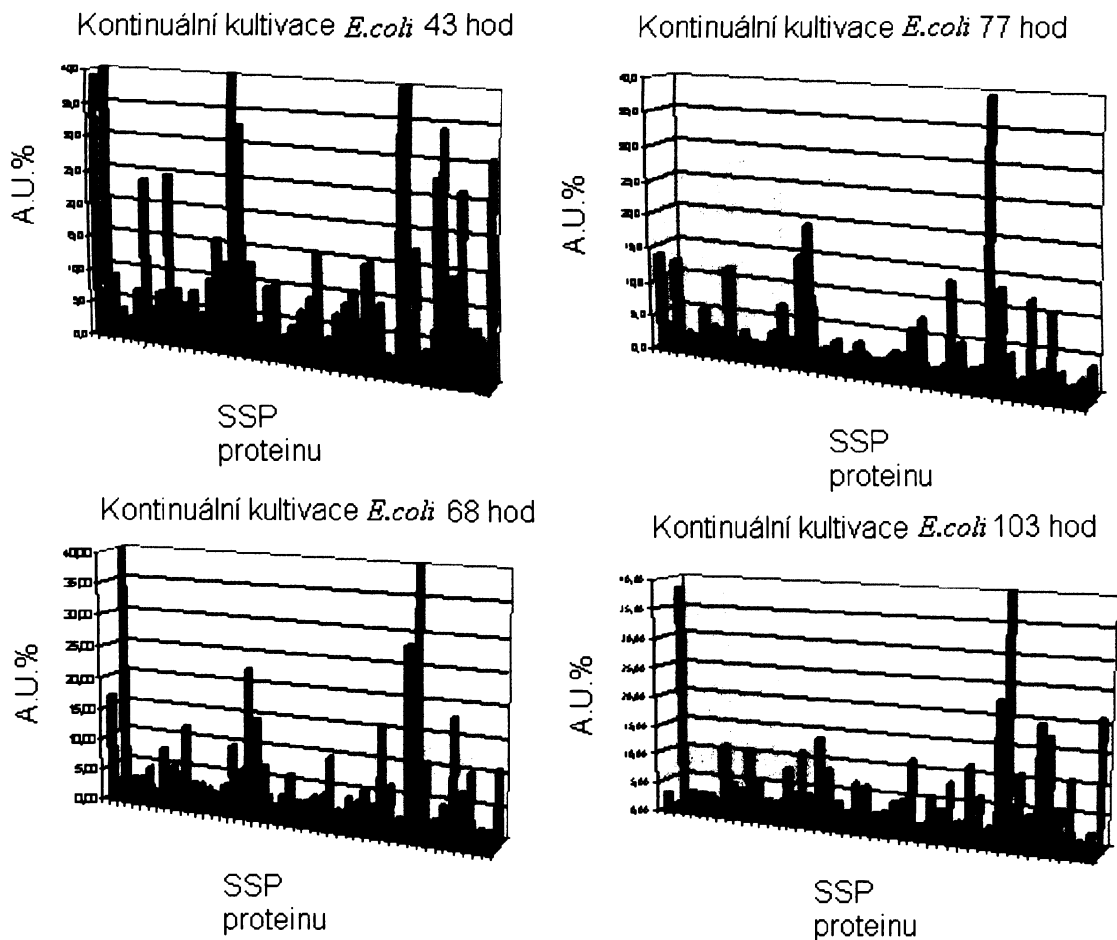
## Proteom

Tato část výsledků představuje úsek projektu, na kterém jsem se podílela s ostatními členy laboratoře a to zejména při přípravě vzorků a vyhodnocování 2D gelů. Uvádím ji proto, aby moje vlastní výsledky získané při analýze dvou erytromycin resistantních klonů z 68 hodiny kultivace byly zasazeny do určitého logického kontextu a aby byla zřejmá komplexnost celého projektu.

Z každého vzorku v odebraného v časech 43, 68, 77 a 103 hodin z experimentální a kontrolní kultivace byly připraveny tři nezávislé série radioaktivním methionem značených proteinových vzorků a ty byly analyzovány na 2D elektroforetických gelech. Gely byly scanovány a digitalizovány a získaná data byla pak analyzována pomocí počítačového programu PDQUEST.

## Srovnání proteinových profilů

Cílem srovnávání proteinových profilů bylo sledovat 1) vliv dlouhodobé kultivace na jejich změny v kontrolním pokusu a v pokusu, kde kultura byla vystavena selečnímu tlaku antibiotika a 2) a pomocí subtraktivní analýzy pak vliv antibiotika samotného, který je možno označit jako tzv. erytromycinovou signaturu. Na obrázku 4 jsou sloupcové grafy znázorňující kvantitativní rozdíly mezi proteinovými profily erytromycinového (oranžová) a kontrolního (zelená) pokusu. Pro srovnání bylo vybráno 54 proteinů s vyšší nebo nižší expresí o faktor 2. Z obrázku je zřejmé, vývoj rozdílů v čase má velmi pozoruhodný průběh, který reflektuje průběh kultivace a měnící se fyziologické parametry bakteriální kultury. V 77 hodině kultivace došlo k výraznému kvantitativnímu přesmyku srovnávaných profilů, v případě erytromycinového pokusu exprese většiny proteinů výrazně stoupla oproti předcházejícím vzorkům (43 a 68 hodina). Ve 103 hodině se pak situace vrací do stavu velmi podobnému 68 hodině.



Obr.4: Sloupcové grafy rozdílů v expresi vybraných proteinů mezi populacemi *E.coli* ve vzorku s erytromycinem, v průběhu kontinuální kultivace. (Zleva: vzorek ze 43 hod., 77 hod., 68 hod., 103 hod. Kontrola zeleně, erytromycin-oranžově).

## Relativní rychlost translace

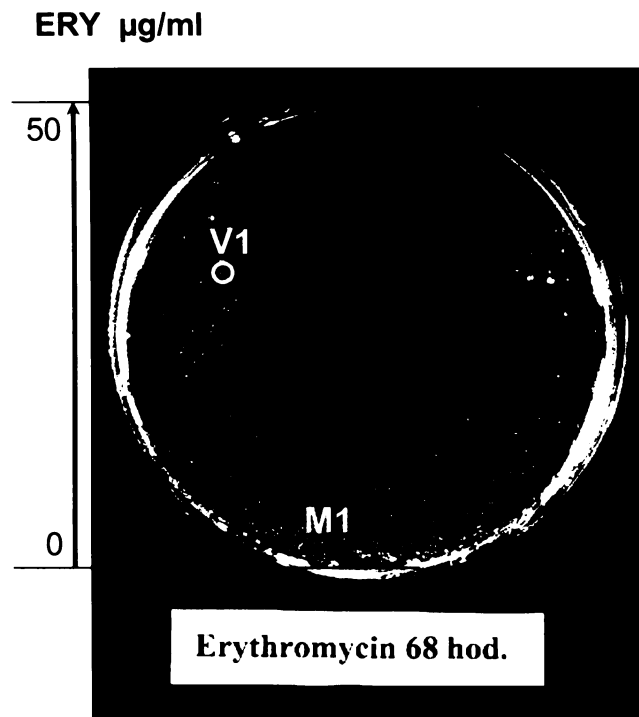
S cílem získat představu o relativní rychlosti a výkonnosti translačního systému v průběhu kultivace u erytromycinového a kontrolního experimentu jsme z dat získaných z radioaktivně značených 2D gelů vypočetli poměr koncentrace aktuálně syntetizovaného elengačního faktoru Tu (EF-Tu), který představuje významnou komponentu translačního systému, k celkové koncentraci všech proteinů syntetizovaných za stejnou dobu s aktivní účastí EF-Tu. Tabulka 4 uvádí takto získané hodnoty pro oba pokusy.

<b>Čas</b>	<b>EF-Tu</b>	<b>Celkem protein</b>	<b>% EF-Tu</b>
<b>43 hod/K</b>	116802,6	1026309,8	<b>11,4</b>
<b>68 hod/K</b>	112636	1017189,1	<b>11,1</b>
<b>77 hod/K</b>	156049,5	995228,3	<b>15,7</b>
<b>103 hod/K</b>	62613,5	1007403,8	<b>6,2</b>
<b>43 hod/E</b>	122497,7	694811,6	<b>17,6</b>
<b>68 hod/E</b>	165551,3	739386,4	<b>22,4</b>
<b>77 hod/E</b>	71535,8	554131,9	<b>12,9</b>
<b>103 hod/E</b>	161927,8	953193,9	<b>17,0</b>
<b>0 hod (kontrola)</b>	185307,9	971901,7	<b>19,1</b>

Tab.4: Poměr EF Tu ke všem měřená poměrem radioaktivity proteinu EF Tu ku celkové radioaktivitě gelu v časech časech 0 – 103 hod

### **Studium klonů s odlišnou resistencí k erytromycinu**

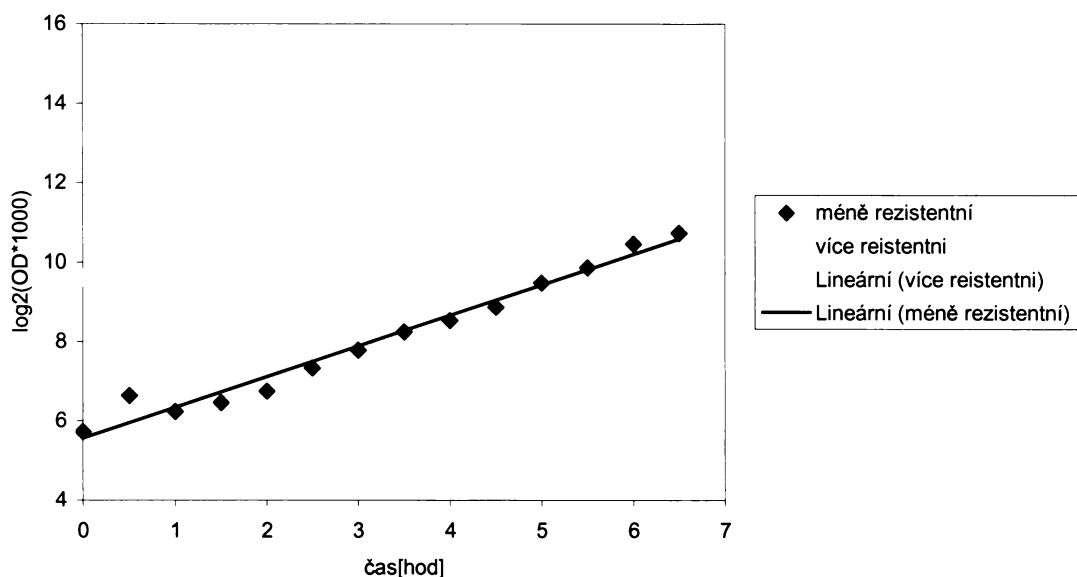
Pozorovaný vliv selekčního tlaku erytromycinu na fyziologické parametry a proteinové profily v kultuře rostoucí v turbidostatu nás vedl ke studiu klonů lišících se resistencí k erytromycinu. Klony jsme vybrali z bakteriální populace získané ve vzorku z 68 hodiny kultivace. V této hodině dochází k výraznému nárůstu počtu kolonií, které vykazují resistenci k vyšším koncentracím erytromycinu ve srovnání s počátkem kultivace a kontrolním pokusem. Na obrázku 8 je gradientová plotna, ze které byly klony odebrány, klon V z oblast s vysokou koncentrací erytromycinu (cca 30 ug/ml) a klon M z oblasti s nízkou koncentrací (méně než 10 ug/ml). Tyto klony byly kultivovány baňce do pozdní exponenciální fáze a z kultury byly vytvořeny zásobní glycerinové vzorky. U těchto vzorků pak byly další fyziologické a proteomové analýzy.



Obr. 8: Gradientová plotna s nárůstem *E.coli* v čase 68 hodin; vzorek s erytromycinem; v kroužku jsou vyznačeny kolonie, které byly odebrány. Žlutě rezistentnější kolonie (značíme V), modře méně rezistentní kolonie (značíme M)

### Růstové parametry

Stejnými technikami jako v předchozí části u vzorků z kontinuální kultivace byla změřena růstová rychlost a generační doba u obou klonů (Obr. 9). Hodnota generační doby se u klonů lišila o deset procent, v případě klonu „V“ měla hodnotu 70,9 min a u klonu „M“ pak 77,7 min.

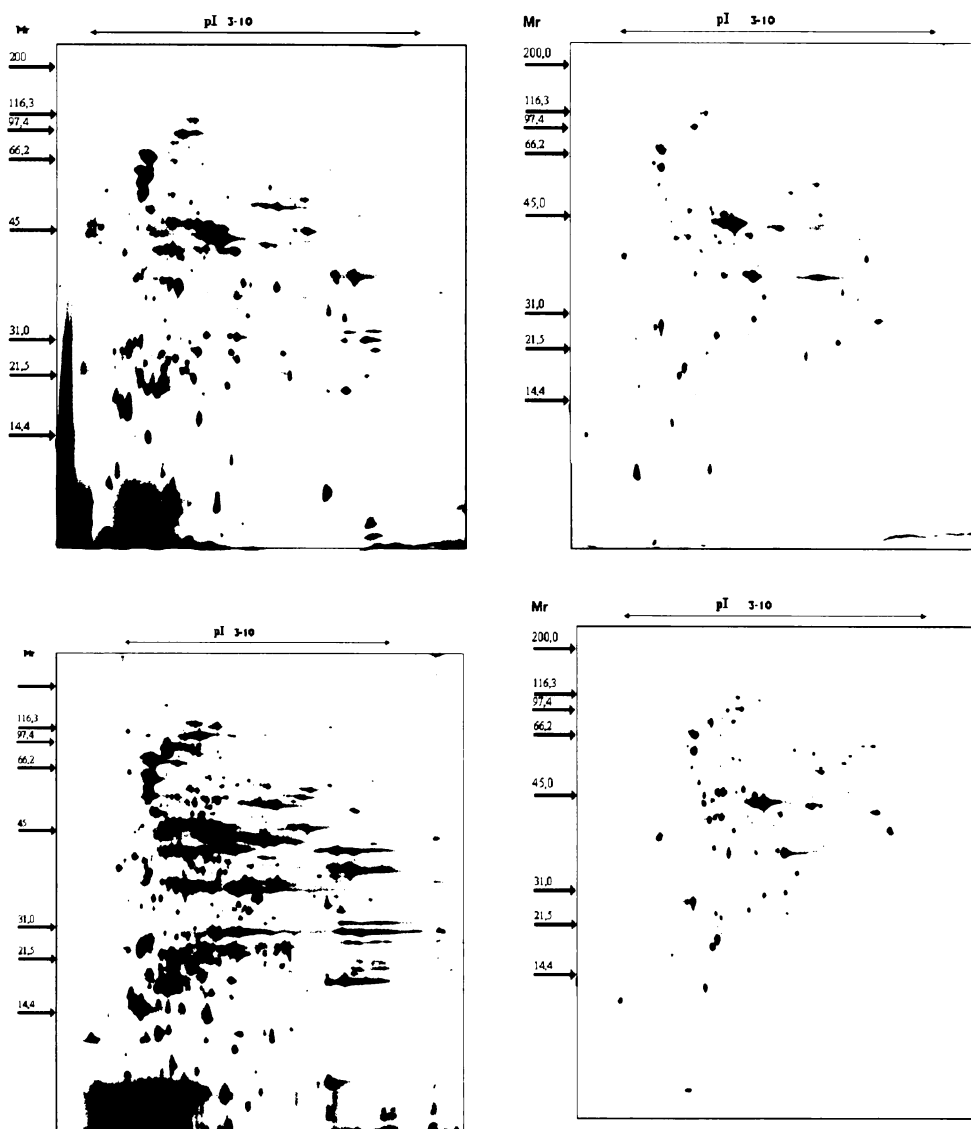


Obr. 9: Růstové křivky klonů *E.coli* ze vzorku s Erytromycinem v čase 68h, málo rezistentní (M), více rezistentní (V); kultivováno 6 hod. v M9 s Erytromycinem (pro lepší přehlednost jsou hodnoty pro V na ose y posunuty o absolutní hodnotu 4).

## Srovnání proteinových profilů

V případě analýzy klonů jsme porovnávali proteinové profily klonu „V“ a klonu „M“ vzájemně a také obou klonů k kompletní populaci z 68 hodiny.

Obrázek 5 ukazuje proteinový profil kompletní populace buněk z 68 hodiny, jak na gelu barveném stříbrem (všechny proteiny), tak i na, z tohoto gelu pořízeném, autoradiogramu (pouze proteiny označené radioaktivním methioninem za hodinu značení) ve srovnání s proteinovým profilem bakteriální populace před začátkem kontinuální kultivace. Ze srovnání je na první pohled zřejmý rozdíl mezi barveným gelem a radioaktivně značeným gelem. Počet radioaktivně označených proteinů je značně nižší než proteinů obarvených stříbrem, což reflektuje jak rychlost jejich syntézy, tak i jejich stabilitu. Porovnání buněčné populace v čase 0 a 68 hodin ukázalo také některé kvalitativní rozdíly jak u barvených tak i radioaktivně značených proteinů, které reflektují vlivy dlouhodobé kultivace v přítomnosti erytromycinu.

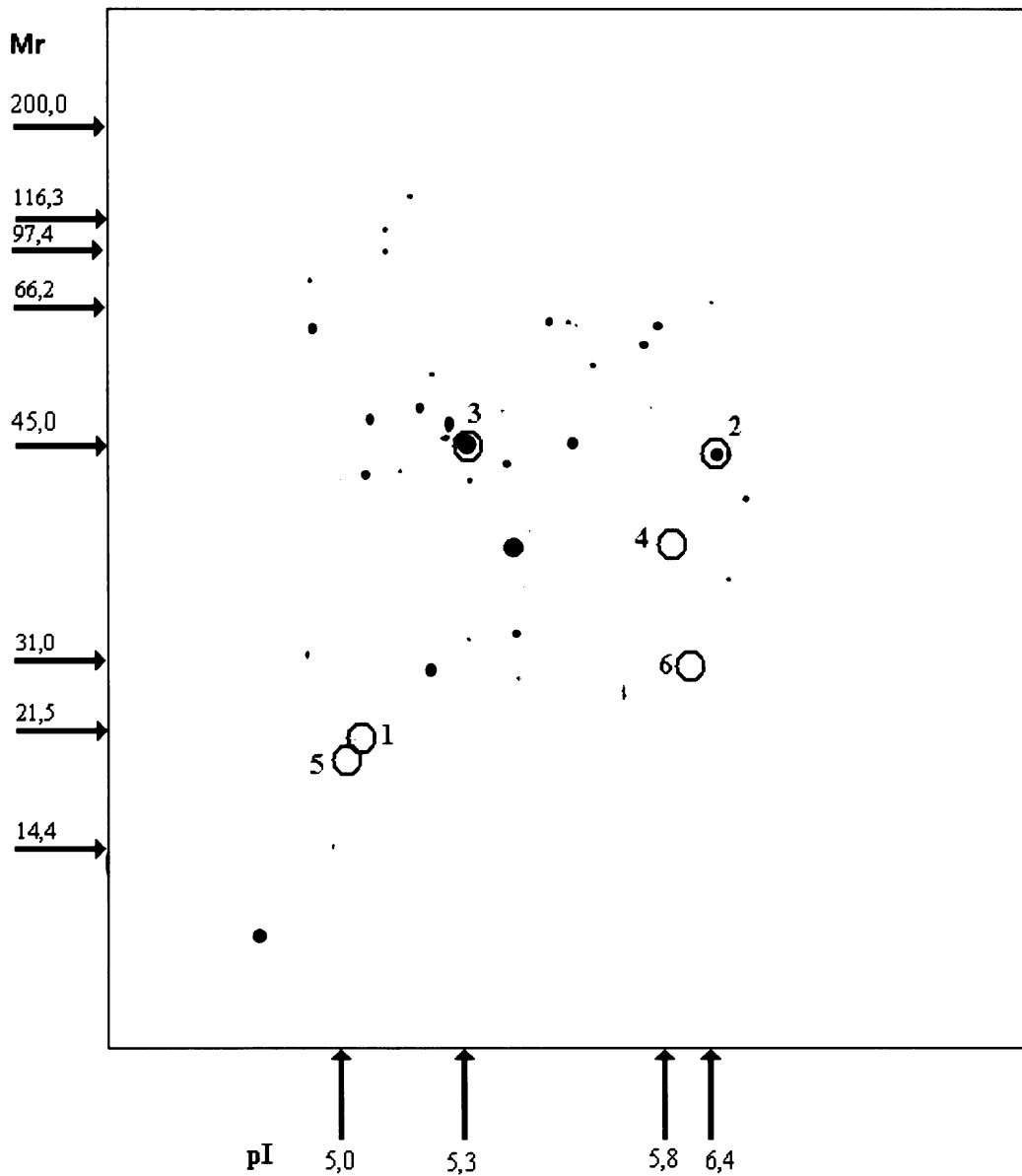


Obr. 7: 2D elektroforéza; vzorek *E.coli* z kontinuální kultivace s erytromycinem v čase 68 hod (nahore) v čase 0 hod (dole); vlevo- gely barvené stříbrem, scany byly pořízeny před vysušením; vpravo- gely ze vzorku značeného  $^{35}\text{S}$  methioninem, scany byly pořízeny na multifunkčním zařízení od firmy BioRad; standard molekulové hmotnosti ( $M_r$ ) uveden nalevo od gelu (uveden v tisících); rozmezí  $pI$  gelu 3-10 (nelineární) uveden nad gelem

Pro matchování (hledání shody) gelů v programu PDQuest byl použit master gel znázorněný na obrázku 6, ve kterém jsou vyznačeny proteiny vybrané jako standardy. Jejich identita byla určena pomocí hmotnostní spektrometrie na zařízení MALDI-TOF na spolupracujícím pracovišti Ústavu analytické chemie v Brně.

Hodnoty  $pI$  a  $M_r$  pro identifikované proteiny jsou uvedeny v tabulce 5





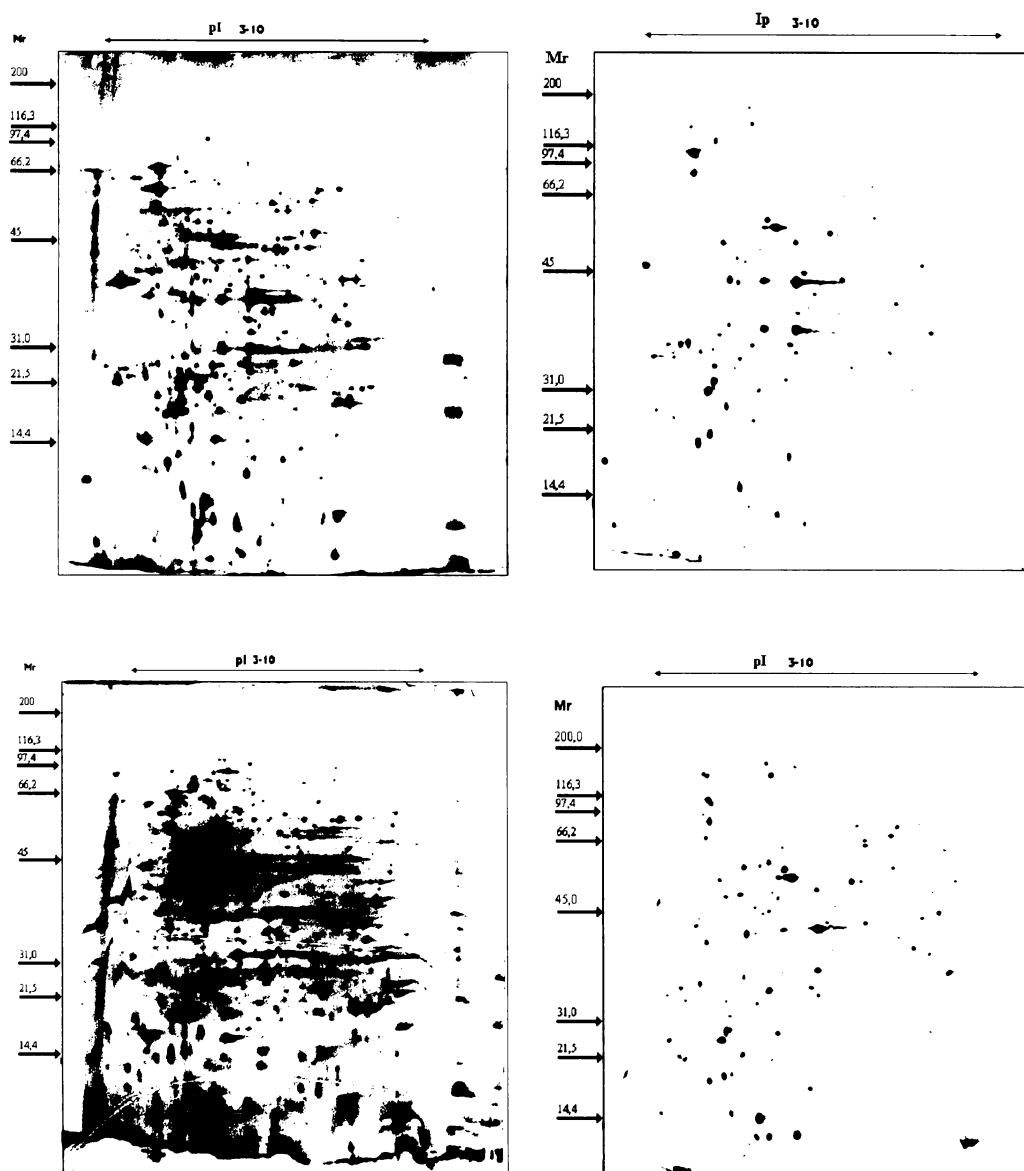
Obr.6: master gel použitý v matchsetu Erytromycin x Kontrola k Erytromycinu, zeleně vyznačeny identifikované proteiny uvedené v tabulce.

<b>Identifikované proteiny</b>				
<b>Číslo na mastergelu</b>	<b>protein</b>	<b>označení</b>	<b>pI</b>	<b>Mr</b>
<b>1</b>	Alkyl hydroperoxid reductáza podjednotka C	AHPC	5,03	20,7
<b>2</b>	ATP syntáza alfa	ATPA	5,8	55,4
<b>3</b>	Translační elongační faktor Tu	EFTu	5,3	44,7
<b>4</b>	Cystein syntáza A	CYSK	5,83	34,4
<b>5</b>	Anorganická pyrofosfatáza	IPYR	5,03	19,7
<b>6</b>	Ribozom recyklující faktor	RRF	6,43	20,7

Tab.5: Tabulka proteinový standardů identifikovaných pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

## 2D elektroforéza klonů

U obou klonů jsme opět provedli 2D elektroforetickou analýzu jejich proteinových profilů. Gely barvené stříbrem a z nich získané radiogramy jsou na obrázku 7. Hlavním cílem bylo porovnat proteinové profily obou klonů a také vzorku z 68 hodiny s erytromycinem a zjistit, odlišnosti v expresi proteinů.

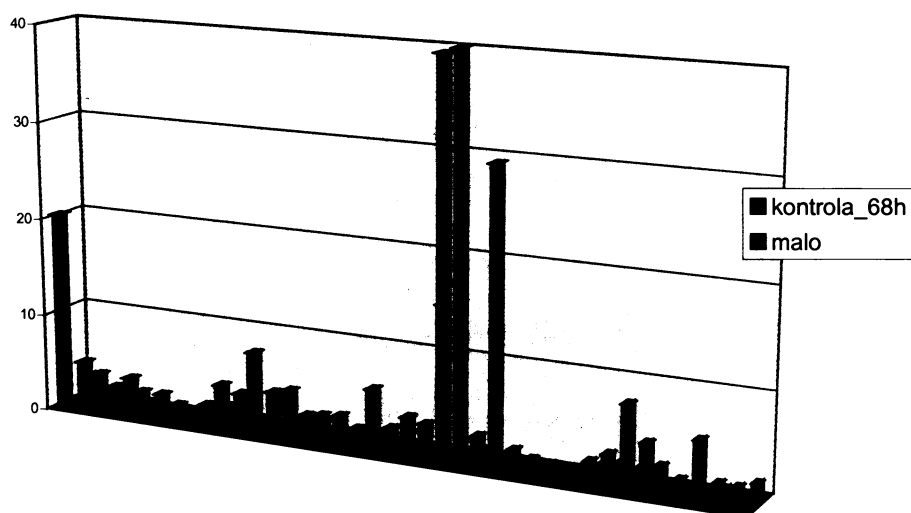


Obr. 9: 2D elektroforéza; vzorek E.coli méně rezistentní klon k erytromycinu (nahore); více rezistentní klon k erytromycinu (dole); vlevo- gely barvené stříbrem, scany byly pořizeny před vysušením; vpravo- gely ze vzorku značeného  $^{35}\text{S}$  methioninem, scany byly pořizeny multifunkčním zařízením firmy BioRad; standard molekulové hmotnosti (Mr) uveden nalevo od gelu (uveden v tisících); rozmezí pI gelu 3-10 (nelineární) uveden nad gelem

## Kvantitativní změny

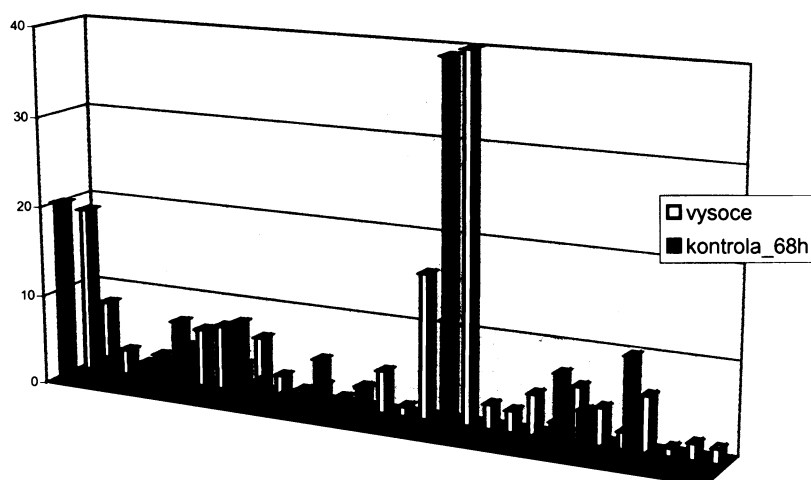
Kvantitativní a kvalitativní změny v zastoupení proteinů, které jsou patrné na srovnávaných gelech jsme kvantifikovali pomocí integrace ploch představujících jednotlivé skvrny s využitím programu PDQEST. Koncentrace proteinů jsme vztáhli ke koncentraci vnitřního standardu, za který jsme si zvolili EF-Tu vzhledem k jeho úloze v translaci (Obr. 11). Takto získaná data jsme zobrazili ve trojrozměrných sloupcových

grafech porovnávajících expresi jednotlivých odlišných proteinů. Vybrali jsme soubor proteinů které se v hladině exprese lišily o faktor 4. Na obrázku 10, který srovnává profil klonu M s celou populací v 68 hodině je na grafu zobrazeno 39 odlišných proteinů.

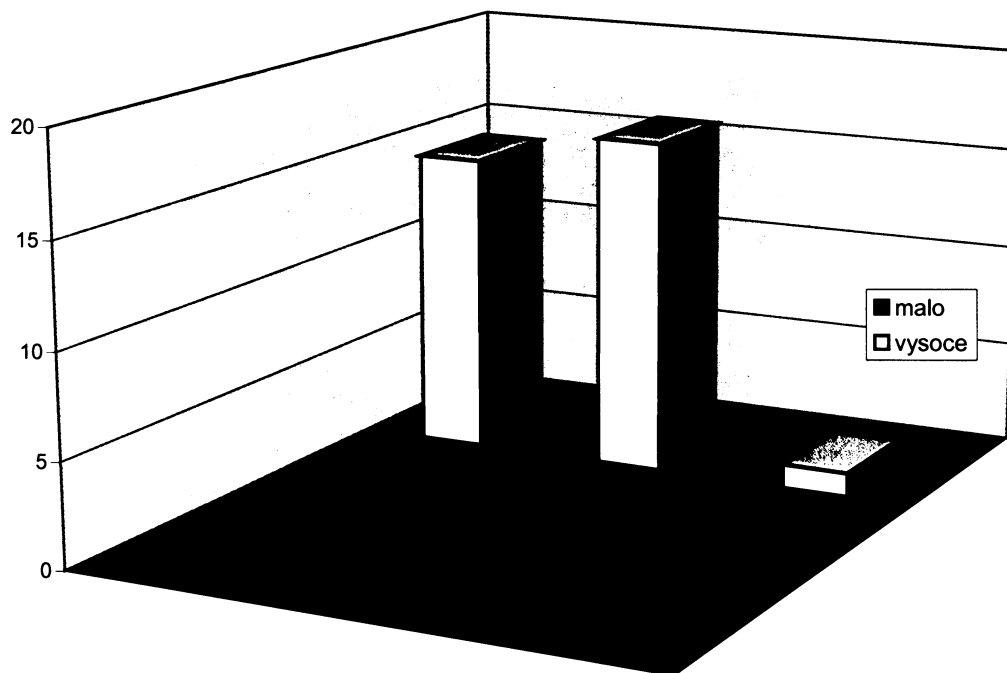


Obr. 10 . Sloupcový graf s kvantitativními rozdíly mezi klonem M a 68 hod. Na ose x: SSP (číslo proteinu) na ose z: relativní rychlost translace [%], na ose y: typ vzorku

Na obrázku 11, který srovnává profil klonu V s celou populací v 68 hodině je na grafu zobrazeno 31 odlišných proteinů.



Obr.11 . Sloupcový graf s kvantitativními rozdíly mezi klonem V a 68 hod. Na ose x: SSP (číslo proteinu) na ose z: relativní rychlost translace [%], na ose y: typ vzorku

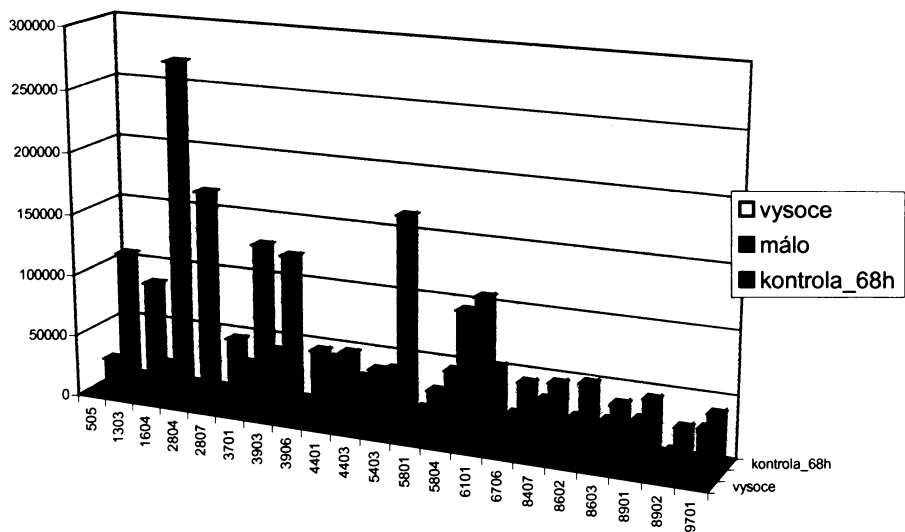


Obr.12 Sloupcový graf s kvantitativními rozdíly 3 proteinů mezi V a M klony. Na ose x: SSP (číslo proteinu) na ose z: relativní rychlost translace [%], na ose y: typ vzorku

## Kvalitativní změny

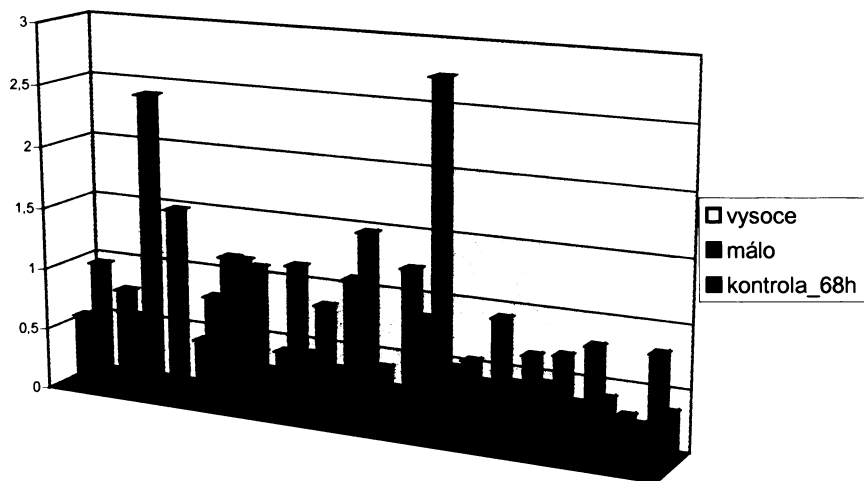
Kvalitativní změny zaznamenávají, zda vybrané proteiny ve vzorku jsou nebo nejsou přítomny. Z grafu vyplývá proteinové zastoupení v buňkách během kontinuální kultivace v čase 68 hodin. V daném okamžiku jsou v médiu přítomny buňky o různě vysoké rezistenci.

Analýza odhalila v komplexní populaci 18 proteinů, které chybí buňkám více rezistentním, získaným z klonu „V“ ale vyskytují se v buňkách málo rezistentních klonu „M“ (Obr. 13). Obrázek 14 pak ukazuje rozdíly přepočtené k vnitřnímu proteinovému standardu EF- Tu. Našli jsme tři proteiny, které na rozdíl od komplexní populace chyběly v málo (M) i více rezistentních buňkách (V)(Obr. 13).



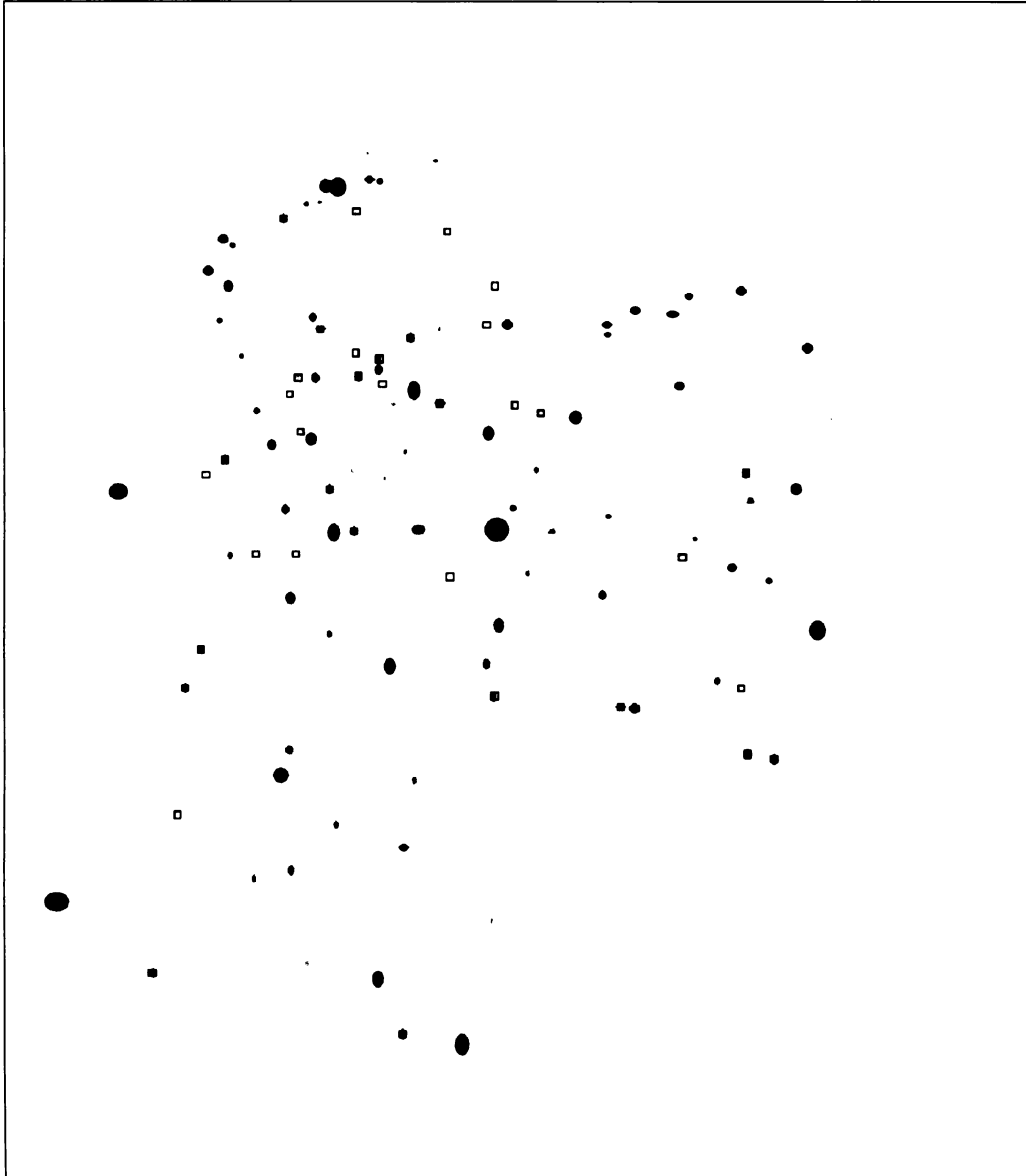
Obr.13 : Sloupcový graf s kvalitativními rozdíly mezi V, M a 68 hod. Na ose x: SSP (číslo proteinu) na ose z: relativní rychlost translace [%], na ose y: typ vzorku

Kvalitativní i kvantitativní rozdíly můžeme vidět na dvou následujících obrázcích, které představují mastery gelů použité pro vyhodnocování rozdílů.



Obr.14 Sloupcový graf s kvalitativními rozdíly mezi V, M a 68 hod vztažené k EF Tu- vnitřnímu standartu gelu. Na ose x: SSP (číslo proteinu) na ose z: A.U. (intenzita skvrny) [%], na ose y: typ vzorku

Proteiny, jejichž exprese byla srovnávána, a které jsou zobrazeny v předchozích grafech jsme vyznačili na příslušném master gelu. Na Obr. 15 jsou barevně vyznačeny kvantitativní rozdíly.



Obr.15: Master gel použitý v match-setu 68 hod vs málo rezistentní klon vs více rezistentní klon. V master gelu jsou vyznačeny proteiny, které se navzájem kvantitativně liší (tzn.intenzita je 4x vyšší nebo nižší) Jsou označeny takto: □ změna 68 hod vs M; o změna 68 hod vs V; Δ změna V vs M

## Relativní přesnost translace

Obdobně jako v případě komplexních populací buněk odebraných jednotlivých časech kontinuální kultivace jsme z dat získaných z radioaktivně značených 2D gelů pro klony „V“ a „M“ vypočetli poměr koncentrace aktuálně syntetizovaného elongačního faktoru Tu (EF-Tu) a všech radioaktivně značených proteinů. Získané hodnoty jsou v Tabulce 6.

Vzorek	% EF Tu	EF-Tu
vysoce rezistentní klon	6,62	<b>2485841</b>
málo rezistentní klon	9,55	<b>4118926</b>
kontrola 68 hodina	20,1	<b>11223205</b>

Tab. 6 Poměr EF-Tu ke všem radioaktivně značeným proteinům.



## Diskuse

Omezení používání antibiotik v terapii i v zemědělství se jeví jako samozřejmé řešení dramatického nárůstu resistencí mezi bakteriálními patogeny. Výchozím předpokladem je, při odstranění selekčního tlaku antibiotik na resistantní bakteriální populace by mělo dojít k selekci bakterií, které ztratí resistenci a získají zpět fyziologickou zdatnost (fitnes), jejíž snížení provází vznik mutací vedoucích k resistenci. Některé poslední studie ukazují, že i na zvířecích modelech (BJORKMAN et al.200) dochází k tomu, že fitnes resistantních bakterií se zvýší získáním dalších, tak zvaných, adaptivních mutací přičemž resistance k antibiotiku zůstává.

Tento fenomén jsme studovali na úrovni změn bakteriálních proteomů na modelu erytromycin resistantního kmene *E. coli*. Pro dlouhodobou kultivaci bakterií jsme použili kontinuální systém v podobě turbidostatu, který do značné míry napodobuje přirozené životní prostředí bakterie *E. coli*, kterým je tlusté střevo teplokrevných živočichů (DYKHUZIEN a HARTL 1983)

Paralelně probíhala kultivace v přítomnosti 50 ug/ml erytromycinu a bez tohoto antibiotika. Kmen *E. coli*, který byl použit nesl mutaci *EnvA*, která zvyšuje prostup řady antibiotik včetně erytromycinu do buněk, ale zároveň způsobuje vláknitý růst buněk a tím variace v poměru OD k počtu živých buněk (CFU). Kmen pro stabilizaci mutace *EnvA* a udržení reportérového systému pro měření přesnosti vyžadoval v kultivačním mediu přítomnost dvou dalších antibiotik, chloramfenikolu a tetracyklin. Přítomnost těchto antibiotik má zřejmě vliv i na celkovou interpretaci získaných výsledků, ale netýká se přímo mé části projektu.

Projekt je souborem řady vzájemně provázaných experimentů na kterých se podílela celá laboratoř a mým úkolem bylo měřit základní fyziologické parametry v rámci celého projektu a pracovat na dílčím proteomovém projektu projektu, který se soustředil na studium dvou klonů lišících resistencí k erytromycinu.

Původní kmen *E.coli*, s nímž jsme pracovali, narostl v batch-kultivaci do určitého zákalu a teprve pak začala probíhat kontinuální kultivace. Ta byla nastavena tak, aby zřed'ovací rychlost odpovídala generační době. Bakterie byly stále odplavovány a neustále jim přitékalo nové médium z rezervoáru. Měly tedy neustálý přísun živin, na rozdíl od batch kultivace, kde jsou živiny za nedlouho spotřebovány. Spolu s živinami neustále přitékalo také antibiotikum. Od 68 hodiny kultivace se průběh měřené křivky OD začal

měnit. Hustota zákalu se začala výrazně snižovat až na hodnotu představující cca 25% hodnoty původní v 77h kultivace. Kolem 100h kultivace se kultura podle měřené OD k původnímu stavu. Protože experiment s erytromycinem i kontrolní kultivace vykazovaly stejný profil je zřejmé, změny nebyly způsobeny technickými problémy při kultivaci. Výběr časových bodů pro odběr vzorků bakteriální kultury byl jednoznačně dán profilem OD.

Sledovali jsme základní fyziologické parametry jako je generační doba a počet živých buněk, dále resistenci k erytromycinu a přesnost translace. Z proteomových dat jsme pak počítali relativní rychlost translace jako poměr koncentrace EF-Tu ke koncentraci všech proteinů, které jsou jeho přispěním syntetizovány po dobu inkubace kultury s radioaktivním metioninem. EF-Tu zde slouží jako vnitřní standard jehož koncentrace je přímo závislá na efektivitě celého translačního systému.

Hodnoty z těchto analýz překvapivě odrážely neobvyklý průběh OD během kontinuální kultivace u obou experimentů. V případě kontrolního experimentu všechny měřené charakteristiky bakteriální populace vykazovaly maximum v 77 hodině kultivace v případě experimentu s erytromycinem maxima byla naměřena pro počet živých buněk a počet translačních chyb. Z toho je zřejmé, že neobvyklý kultivační profil je důsledkem reálných fyziologických změn v bakteriální populaci v průběhu dlouhodobé kultivace v turbidostatu. V kontrolním experimentu bylo dosaženo nejnižší růstové rychlosti současně s maximum translačních chyb a vysokého poměru EF-Tu k ostatním proteinům. To znamená, že v této situaci rostla pomalu za poměrně vysokých energetických nákladů (vyšší počet chyb=vyšší energetické výdaje) s nepříliš efektivním translačním systémem (potřebovala více EF-Tu na „výrobu“ stejného množství proteinů jako v předchzích fázích. Z tohoto propadu v efektivnosti (fitnes) se na konci kultivace vyselektovala kultura podstatně zdatnější vyznačující se nízkým poměrem EF-Tu k celku, vyšší přesností a s kratší generační dobou. Po celou dobu kultivace zůstala resistance populace k erytromycinu na stejné úrovni.

Při kultivaci s erytromycinem byla situace komplikovanější. V 77h došlo k ještě výraznějšímu propadu OD než v kontrolním experimentu, ale generační doba byla kratší než na počátku kultivace i když dosahovala v absolutních hodnotách vyšší hladiny díky mírnému inhibičnímu vlivu erytromycinu. Obdobně tomu bylo v efektivitě translace, kdy poměr Tu k celku byl výrazně nižší. Ostatní parametry vykazovaly obdobnou tendenci jako v případě kontrolního pokusu. Zásadní rozdíl u mezi oběma pokusy byl v resistenci k erytromycinu. Od 48 hodiny kultivace začal v populaci vzrůstat podíl více resistantních bakterií, který dosáhl maxima v 77 hodině a udržel se v populaci až do konce kultivace.

Porovnání proteinových profilů z erytromycinového a kontrolního pokusu do značné míry potvrdilo, že v době kolem 77 hodiny kultivace došlo významným fyziologickým změnám. Ze srovnávaných proteinových profilů jsme vybrali proteiny (54) jejichž exprese se lišila faktorem 2 a více (vyšší nebo nižší). Takto vybrané profily jsme pak porovnali kalibrované na koncentraci EF-Tu. Srovnání ukázalo, že opět v 77 hodině dochází k zásadní změně exprese u většiny vybraných proteinů. Do tohoto okamžiku vyšší expresi vykazují převážně proteiny v kontrolním experimentu, kolem 77 hodiny se situace obrací a na konci kultivace (103h) se expresní profil vrací prakticky do původního stavu. Výsledky z tohoto komplexu experimentů jsou i nadále vyhodnocovány, a probíhá identifikace jednotlivých proteinů nutná pro správnou interpretaci získaných dat.

Pozorované významné změny antibiotické resistenci v erytromycinovém pokusu nás vedly k analýze dvou klonů lišících se hladinou resistance ve stejných parametrech jako u celého srovnávacího pokusu. Klony jsme vybrali ze vzorku z 68 hodiny kultivace, kdy se objevují více resistantní kolonie, ostatní parametry kultury v tomto čase jsou v podstatně stejné jako v počátečních fázích kultivace.

V 68 hodině se v odběru nacházejí buňky odlišné v rezistenci k antibiotiku. Je to různorodá populace. Přesně tak to můžeme vidět na obrázku 8 který představuje nárůst kolonií na gradientové plotně. Abychom mohli lépe prostudovat rozdíly ve fyziologii a především v expresi genů, které udílejí bakteriím rozdílnou citlivost a rezistenci k antibiotiku, připravili jsme dvě různé populace klonů. Ze dvou kolonií, lišících se v umístění na gradientové plotně jsem provedla bakteriologickou kličkou odběr. Oba klony jsem nakultivovala v uzavřeném-batch systému v médiu M9 cca 24 hodin.

Protože první kolonie se nacházela na plotně v místě o relativně vysoké koncentraci erytromycinu, dalo se předpokládat že buňky, které obsahuje jsou značně resistantní k erytromycinu. Naopak buňky, které jsem odebrala z kolonie v místě o nízké koncentraci antibiotika, by měly být k antibiotiku mnohem citlivější. Oba klony si zachovaly své původní vlastnosti, neboť krátkodobá batch-kultivace v uzavřeném systému neumožní vyselektování nových mutantů.

U klonů jsem následně testovala stejné fyziologické parametry, jako u předchozích vzorků z kontinuální kultivace.

Generační doba byla u obou klonů delší než u vzorků z kont. kultivace kontroly, pouze vzorky ze 43. a 68. hod. měly generační dobu delší, což můžeme připisovat právě tomu, že se v 68 hodině začínají selektovat superfit mutanti. Zároveň se generační doba lišila mezi oběma klony. Resistentnější klon měl generační dobu skoro o deset procent kratší než klon

citlivější. To by odpovídalo tomu, že rezistentnější klon je také více fit než klon citlivější. V případě zjišťování počtu živých buněk a měření luminiscence jsme nedosáhli interpretovatelných výsledků.

Zajímavé informace nám však poskytly proteinové profily jednotlivých klonů připravené 2D elektroforézou.

Po porovnání proteinových profilů se ukázalo, že 3 proteiny, které jsou přítomny v buňkách v 68 hodině, se vůbec nevyskytují v buňkách klonů. Navíc dalších 18 proteinů, které se exprimují v citlivějším klonu stejně jako v 68 hodině, se v klonu rezistentnějším vůbec neexprimují. Je absence těchto proteinů důsledkem toho, že je kultura více fit, nebo naopak příčinou proč je více fit? Na tuto otázku jsme si dosud nedali jednoznačnou odpověď. Jisté je však to, že rozdíly v expresi těchto proteinů zřejmě hrají klíčovou roli v selekci mutantů, kteří jsou fit, aniž by ztratili vlastnosti rezistence.

Kromě uvedených kvalitativních změn jsme našli i výrazné kvantitativní rozdíly. 39 proteinů se ve vzorku z 68. hodiny exprimovalo se 4krát vyšší nebo nižší četností než v klonu M a tentýž rozdíl byl nalezen i pro 31 proteinů v klonu V.

#### Závěrem:

Zatímco v batch-kultivaci stačí proběhnout maximálně 10-20 generací a kultura následně hyne na nedostatek živin a hromadění zplodin metabolismu, v kontinuální kultivaci proběhne generací nesrovnatelně více. Je zde mnohem větší prostor pro vznik různých mutací, ať už + nebo - a k selekci nových mutantů. V našem případě se rozdílní mutanti začali selektovat v 68 hodině- ve fázi, kdy byl v kontinuální kultivaci zaznamenán značný pokles rychlosti růstu, který se následně projevil na křivce.

V tomto okamžiku obsahovala kontinuální kultivace různé typy buněk, které se mezi sebou lišily nejen v míře rezistence ale také v proteinových profilech, jak se ukázalo v experimentu. Je pravděpodobné, že to byli právě potomci více rezistentních buněk podobných klonu V které v 77 hodině začali rychle růst a ve 103 hodině nabyli původní, vlastně ještě vyšší optické denzity. Potomci méně rezistentních buněk mohli zahynout vzhledem k jejich nízké rezistenci k antibiotiku. Rozdíl mezi citlivějším a rezistentnějším klonem byl nalezen v 18 proteinech. Domníváme se, že je to oněch chybějících 18 proteinů, které umožní buňkám zvýšit svou fitness a nebo naopak, že buňka nepotřebuje syntetizovat 21 proteinů navíc, protože je více fit (superfit)

Aby se tato domněnka potvrdila, je třeba udělat ještě hodně práce. Především identifikovat tyto proteiny a jejich funkci, která může být klíčová, pro nalezení odpovědi jakým způsobem buňky zvýšily svou fitness. To vše bude předmětem dalšího výzkumu.

## Souhrn

V práci která se zabývá fitness a genovou expresí populace erytromycin rezistentních buněk *E.coli* rostoucích v kontinuální kultuře bylo dosaženo následujících výsledků:

Zjistili jsme, že průběh kontinuální kultivace není plynulý, ale mění se v závislosti na čase, dochází ke změnám v rychlosti růstu a v rezistenci.

Níže uvedené experimenty lze rozdělit do dvou hlavních částí. V první jsme pracovali se vzorky z kontinuální kultivace, ve druhé s klony, odebranými z 68 hodiny této kultivace.

Stanovili jsme experimentálně parametry fitness populací buněk, které odpovídají zlomovým bodům v průběhu kultivace: zejména generační čas, počet živých buněk, rezistenci k erytromycinu. Zároveň jsme se pomocí luciferázového systému pokusili stanovit přesnost translace. Rychlost translace, kterou jsme rovněž stanovovali a kterou nelze zcela jednoznačně charakterizovat, jsme vyjádřili jako poměr EF Tu ku celkovému množství proteinů. Tyto údaje jsme získali z proteinových profilů.

Proteinových profilů k uvedeným populacím jsme dosáhli s použitím 2D elektroforézy. Výsledné gely jsme scanovali do počítače a dále zpracovávali v programu PDQuest.

Druhá část experimentů se týkala klonů.

Připravili jsme klony výše uvedeným způsobem a u nich potom stanovovali tytéž parametry bakteriální fitness. Jeden z klonů byl více rezistentní a druhý méně rezistentní k erytromycinu.

Důležitým poznatkem bylo hlavně zjištění odlišností v expresi proteinů mezi rezistentnějším a citlivějším klonem a mezi klony a původní populací buněk v 68 hodině z níž byly odebrány.

Nalezené rozdíly byly jak kvalitativní, tak i kvantitativní. Zobrazili jsme je ve sloupcových grafech a jako vnitřní standart jsme zvolili EF Tu.

Nelze říci, že bylo dosaženo úplného cíle projektu, neboť získané informace budou předmětem dalšího zkoumání, ale bylo dosaženo dílčích výsledků, který projekt posunuli o něco blíže k cíli.

## Seznam literatury

- Andersson DI, Andersson SGE, Kurland ChG (1986) Functional interactions between mutated forms of ribosomal proteins S4, S5 and S12. *Biochimie* 68: 705-713
- Bjorkman J, Nagaev I, Berg OG, Hughes D, Andersson DI (2000) Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance [see comments]. *Science* 287:1479-1482
- Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial selection. *Science* 116:45-51
- Cash P (1998) Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis. *Analytica Chimica Acta* 372:121-145
- Dutt MJ, Lee KH (2000) Proteomic analysis. *Curr Opin Biotechnol* 11:176-179
- Dykhuisen DE, Hartl DL (1983) Selection in chemostats. *Microbiol Rev* 47:150-168
- Fey SJ, Larsen PM (2001) 2D or not 2D. Two-dimensional gel electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol* 5:26-33
- Chait R, Craney A, Kishony R (2007) Antibiotic interactions that select against resistance. *Nature* 446:668-671
- Jakubů V, Urbášková P (1999) *Klinická mikrobiologie inf. lék.* 5:233
- Kaprálek F (1999) *Základy bakteriologie.* Karolinum, Praha
- Kaprálek F (2001a) Rezistence bakterií na antibiotika: biochemické a genetické příčiny. *Biologické listy* 66:27-46
- Kaprálek F (2001b) Způsob účinku antibiotika na bakteriální buňku. *Biologické listy* 66:1-24
- Kovarova-Kovar K, Egli T (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:646-666
- Levin BR, Perrot V, Walker N (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154:985-997
- Mačvanin M (2003) *The Physiological Cost of Antibiotic Resistance.* Acta universitatis Upsaliensis
- Normark S, Boman H G, Matsson E (1969) Mutant of *Escherichia coli* with anomalous cell division and ability to decrease episomally and chromosomally mediated resistance to ampicillin and several other antibiotics. *J Bacteriol* 97: 1334-42

- Novick A, Szilard L. (1950) Description of the Chemostat. *Science* 112:715-716
- O'Connor M, Gregory ST, Dahlberg AE (2004) Multiple defects in translation associated with altered ribosomal protein L4. *Nucleic Acids Res* 32:5750-5756
- Ogle JM, Ramakrishnan V (2005) Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74:129-177
- Rabilloud T (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* 2:3-10
- Sander P, Springer B, Prammananan T, Sturmfels A, Kappler M, Pletschette M, Bottger E C. (2002) Fitness cost of chromosomal drug resistance-conferring mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1204-1211
- Schultz, D W, Yarus M (1990) A simple and sensitive in vivo luciferase assay for tRNA-mediated nonsense suppression. *J Bacteriol* 172: 595-602
- Spratt BG (1994) Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393
- Tonella L, Hoogland C, Binz PA, Appel RD, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2001) New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation. *Proteomics* 1:409-423
- VanBogelen RA, Schiller EE, Thomas JD, Neidhardt FC (1999) Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* 20:2149-2159
- Vandenbroucke-Grauls CM (1993) The threat of multiresistant microorganisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12 Suppl 1:S27-30
- Votava M (2001) *Lékařská mikrobiologie obecná*. Neptun, Brno
- Wada A, Mikkola R, Kurland CG, Ishihama A (2000) Growth phase-coupled changes of the ribosome profile in natural isolates and laboratory strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 182:2893-2899.
- Walsh C (2003) Where will new antibiotics come from? *Nat Rev Microbiol* 1:65-70
- Washburn MP, Yates JR, 3rd (2000) Analysis of the microbial proteome. *Curr Opin Microbiol* 3:292-297
- Weisblum B (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother* 39:577-585
- Weiser J, Holub M, Nezbedova S, Bezouskova S (2005) Proteomics represents complex approach in studies of regulation of bacterial physiology. *Chemicke Listy* 99:890-895

Wilkins MR et al. (1995) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13:19-50