

## Titul disertační práce:

### **Molekulární mechanismy interakce intracelulárního patogena *Francisella tularensis* s antigen prezentujícími buňkami**

#### Abstrakt:

Většina studií zabývající se host-patogen interakce byla v průběhu minulých let převážně zaměřena pouze na funkci jedné molekuly nebo jeden biologický proces. Nedávný rozvoj genomiky, transkriptomiky a proteomiky ovšem umožňuje nový typ experimentů a tím získat nové informace jak o jednotlivých komponentech biologického systému tak jejich vzájemných interakcí. Jsou to především proteiny, které jsou jako nosiči biologické aktivity středem zájmu. Studium proteinového složení biologických systémů jako je např. host-patogen interakce umožňuje objasnit molekulární mechanismy infekce v daném prostoru a času.

V současné době je zde potřeba vyvinout nové léky zasahující proti bakteriím a virům. Aby to bylo možné, je nutné dobře znát molekulární mechanismy infekce. Patogenní organismy ovšem vyvinuly nejrůznější strategie jak obejít obranné mechanismy imunitního systému hostitele. Skutečnost, že patogeni využívají signální cesty hostitele k nalezení bezpečného útočiště pro vlastní replikaci, vedla k hypotéze možného terapeutického zásahu proti patogenním organismům ze strany hostitele.

Předkládaná disertační práce aplikuje kvantitativní proteomickou analýzu ke studiu interakce *Francisella tularensis* s makrofágy z pohledu hostitele. V této práci byly řešeny celkem dva vědecké úkoly.

První část disertační práce je věnována charakterizaci signálních cest makrofágů, které hrají klíčovou roli při interakci s intracelulárním patogenem *Francisella tularensis*. Nejdříve jsme prokázali, že membránové rafty hrají důležitou roli ve vstupu *Francisella tularensis* do makrofágů. Narušením struktury membránových raftů pomocí cholesterol-depletující činidla, metyl- $\beta$ -cyklodextrinu, and cholesterol-vázajícího činidla, filipinu, došlo k poklesu bakteriálního vstupu do makrofágů. Dále jsme pomocí kvantitativní proteomiky charakterizovali dynamické změny v proteinovém složení membránových raftů po internalizaci *F. tularensis*. Kvantifikace obohacených proteinů v DRMs frakci po internalizaci bakterie v porovnání s kontrolními buňkami byla provedena metodou SILAC, nebo-li metabolického značení buněk izotopovými aminokyselinami během kultivace. Po interakci s *Francisella tularensis* byla v DRMs frakci makrofágů detekována zvýšená přítomnost adaptorového proteinu, Sequestosomu-1 (p62). Pomocí imunofluorescenční mikroskopie jsme demonstrovali asociaci adaptorového proteinu s ubiquitinovanými proteiny v blízkosti bakterie. Dále jsme zjistili, že *Francisella tularensis* během již časných fází po své internalizaci do makrofágů interaguje prostřednictvím molekuly p62 s dráhou autofagie.

Cílem druhého projektu bylo identifikovat a kvantifikovat změnu v proteinovém složení buněčného povrchu makrofágů po aktivaci IFN- $\gamma$  pomocí nedávno vyvinuté Cell Surface Capturing (CSC) metody. Celkem bylo identifikováno 152 povrchových proteinů makrofágů. Z tohoto celkového počtu, pouze sedm povrchových molekul vykazovalo změnu exprese po ovlivnění IFN- $\gamma$ . Dále jsme určili změnu fenotypu aktivovaných makrofágů po interakci s bakteriální infekcí. Bylo zjištěno, že během stimulace bakteriální infekce s IFN- $\gamma$  dochází k poklesu abundance proteinu BST-2 z buněčného povrchu.

#### **Keywords:**

Infekctomika, intracelulární bakterie, *Francisella tularensis*, makrofág, interferon gamma, kvantitativní proteomika, membránový protein