

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biochemických věd



Interakce eukaryotních buněk s intracelulárním patogenem  
*Francisella tularensis* LVS

(Diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Zuzana Kročová, Ph.D.

Vypracováno na Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví  
Univerzity obrany

Hradec Králové 2005/06

Jan Kučera

AMR  
APC  
CPU  
DMB  
DZA  
EDTA  
EES  
GUM

GM  
HPI  
HUI  
HUI  
HUI

**Mé poděkování patří**

vedoucím Ústavu molekulární patologie Prof. RNDr. Aleši Macelovi DrSc. a Doc. MUDr. Jiřímu Stulíkovi CSc. za poskytnutí vynikajících pracovních podmínek, dále školitelce RNDr. Zuzaně Kročové Ph.D. za profesionální vedení, drahocenné rady a trpělivost a všem pracovníkům Ústavu molekulární patologie za skvělou přátelskou atmosféru. Chtěl bych také poděkovat Mgr. Jurajovi Lenčovi za provedení nanoLC/MS/MS analýzy proteinů.

## Zkratky:

AMK	aminokyselina
APS	persíra amonný
CFU	colony forming unit (jednotka formující kolonie)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FTSI	fetální telecí sérum inaktivované
GEM	glycosphingolipid-enriched microdomains (mikrodomény obohacené glykosfingolipidy)
GPI	glykosylfosfatidilinositol
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
LPS	lipopolysacharid
LVS	live vaccine strain (živý vakcinační kmen)
MAP-K	mitogeny aktivovaná protein-kináza
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MOI	multiplicita infekce
nanoLCMS/MS	nanoLiquid Chromatography/ Mass Spectroscopy / Mass Spectroscopy
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NC	nitrocelulóza
NDS	dodecylsíran sodný
NF $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
NK	natural killer
NO	oxid dusnatý
O.D.	optická densita
PBS	phosphate buffer saline
PDA	piperazindiakryloyl
PVDF	polyvinilidendifluorid
Q	kvadrupolární
rDNA	ribosomální deoxyribonukleová kyselina
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction

SDS	dodecylsírán sodný
TBS	tris-buffer saline (tris pufr)
TEMED	N,N,N,N-tetramethylendiamid
TIFF	Triton-insoluble floating fraction
TIM	Triton-insoluble membranes (membrány nerozpustné v 1% tritonu X-100)
TNF $\alpha$	tumor-nekrotizující faktor alfa
TOF	průletový analyzátor (time of flight)
ÚMP FVZ UO	Ústav molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany

## Obsah:

1. Úvod .....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. <i>Francisella tularensis</i> a tularémie .....	8
2.1.1. Původce onemocnění - <i>Francisella tularensis</i> .....	8
2.1.2. Epidemiologie nemoci.....	9
2.1.3. Klinické příznaky .....	9
2.1.4. Léčba .....	11
2.1.5. Prevalence onemocnění .....	11
2.1.6. <i>Francisella tularensis</i> – biologická zbraň .....	11
2.1.7. <i>Francisella tularensis</i> LVS .....	12
2.1.8. Interakce s hostitelskou buňkou .....	13
2.1.9. Faktory virulence.....	14
2.2. Lipidové rafty .....	16
2.2.1. Obecné vlastnosti .....	16
2.2.2. Funkční charakteristika raftů.....	17
2.2.3. Lipidové rafty jako vstupní brána bakterií .....	18
3. Cíl práce .....	20
4. Experimentální část .....	21
4.1. Materiál .....	21
4.1.1. Živý materiál .....	21
4.1.2. Přístroje a laboratorní pomůcky .....	21
4.1.3. Standardy.....	22
4.1.4. Protilátky .....	22
4.1.5. ECL-Chemiluminiscenční substrát.....	23
4.1.6. Roztoky a chemikálie .....	23
4.2. Metodika.....	27
4.2.1. Příprava buněk monocytární-makrofágové linie J774 .....	27
4.2.1.1. Zásady práce s buněčnými liniemi .....	27
4.2.1.2. Složení živného média a podmínky inkubace .....	28
4.2.1.3. Uchovávání a rozmrazování buněk .....	28
4.2.1.4. Pasážování buněk .....	29
4.2.1.5. Stanovení viability a počtu buněk .....	29
4.2.2. Příprava bakteriální suspenze <i>Francisella tularensis</i> LVS .....	30
4.2.3. Infekce buněk J774 bakterií <i>F. tularensis</i> .....	30
4.2.4. Izolace lipidových raftů.....	30
4.2.5. Western blot .....	31
4.2.6. Dot blot.....	32

4.2.7.	Stříbření gelů po blotu.....	32
4.2.8.	Proteomická analýza.....	32
5.	Výsledková část.....	33
5.1.	Experiment 1 .....	33
5.1.1.	Experiment 1/1. Caveolin-1, J774.....	33
5.1.2.	Experiment 1/2 Caveolin-1, J774.....	34
5.2.	Experiment 2 .....	34
5.2.1.	Experiment 2/1, Flotillin-1, J774 .....	34
5.2.2.	Experiment 2/2, Flotillin-1, J774 .....	35
5.3.	Experiment 3 .....	36
5.3.1.	Experiment 3/1, Flotillin 1, kontrola (neinfikované buňky) .....	36
5.3.2.	Experiment 3/1, Flotillin 1, infekce (infikované buňky).....	37
5.3.3.	Experiment 3/2, Flotillin 1, kontrola (neinfikované buňky) .....	38
5.3.4.	Experiment 3/2, Flotillin 1, infekce (infikované buňky).....	38
5.4.	Proteomická analýza.....	39
6.	Diskuze.....	42
7.	Závěr.....	48
8.	Literatura .....	49

## 1. Úvod

V průběhu evoluce si organismy vyvinuly různé imunitní dohlížecí mechanismy, které je mají ochraňovat proti potencionálním patogenům. Na buněčné úrovni se signální děje, které regulují obrannou odpověď, odehrávají na membránových raftech – dynamických mikrodoménách, které jsou obohaceny cholesterolem a glykosfigolipidy – které usnadňují mnohé meziproteinové a lipid-proteinové interakce na buněčném povrchu. Patogeny vyvinuly mnoho strategií pro zajištění jejich přežití a úniku imunitnímu systému hostitele. V některých případech napadáním právě lipidových raftů. Nicméně, pochopení způsobů, kterými patogeny využívají rafty vede ke vzniku nových terapeutických strategií, které by měly zmírnit nebo předcházet některým infekčním onemocněním, jako například těch, které způsobují HIV-1 nebo Ebola virus.

Tato diplomová práce se zabývá zavedením metodiky izolace lipidových raftů pro studium interakce monocyto-makrofágové linie J774 s vysoce patogenním mikroorganismem *Francisella tularensis* LVS.

## 2. Teoretická část

### 2.1. *Francisella tularensis* a tularémie

První zmínky o tularémii pocházejí z Japonska 18. století. Bakterii *Francisella tularensis* poprvé jako etiologické agens plakovitého onemocnění pozemních veverek izolovali Mc Coy a Chaplin roku 1911 v Tulare Country v Kalifornii. Pojmenovali ji podle místa prvního nálezu *Bacterium tularense*. Roku 1914, Wherry a Lamb prokázali, že plakovité onemocnění spojované s hlodavci je přenosné i na člověka. Onemocnění člověka bylo poprvé diagnostikováno a popsáno jako tularémie Edwardem Francisem, jenž tuto bakterii izoloval z hnisu bobonů osob trpících nemocí zvanou deer-fly-fever, a k jehož cti byla také později bakterie přejmenována na *Francisella tularensis* (Černý, 2002).

#### 2.1.1. Původce onemocnění - *Francisella tularensis*

*Francisella tularensis* (*F. tularensis*) je malý, aerobní, polymorfní, nepohyblivý, fakultativně intracelulární, gramnegativní kokobacil rozměrů 0,2 až 0,5 µm na 0,7 až 1,0 µm způsobující tularémii, nemoc známou také jako zajetí nemoc.

Na základě analýz složení mastných kyselina, 16S rDNA sekvenace, analýz polymorfismu délky restrikčních fragmentů, mikroarrays, analýz virulence, patogenity a geografického rozšíření rozlišujeme čtyři podtypy *F. tularensis*:

- *F. tularensis* subspecies *tularensis* – varianta dominující na severoamerickém kontinentu. Tento kmen je vysoce virulentní pro člověka i většinu hospodářských zvířat. Ve starších zdrojích bývá označován také jako typ A. Nejnižší infekční dávkou způsobující onemocnění je asi 10 CFU. Většinou bývá získán od králíků nebo přenesen klíšťaty (*Ixodes*, *Dermacentor*), která na nich cizopasí.
- *F. tularensis* subspecies *holartica* – varianta rozšířená po celé severní polokouli, způsobující mírnější formu onemocnění. V Severní Americe je tento podtyp těsně spojený s vodními hlodavci. V Evropě a Asii s myšmi, hraboši, zajíci, a také ptáky a klíšťaty, kde je také hlavním vyvolavatelem onemocnění. Tato varianta je značně rezistentní na vnější podmínky, mráz a sucho dlouhodobě přežívá (i tři měsíce), a i poté je schopna vyvolat infekci. Ve starších zdrojích je tento podtyp označován jako typ B.



- *F. tularensis* subspecies *mediastinica* – varianta izolovaná pouze v centrální Asii, ve státech bývalé SSSR. Podobně jako předešlá varianta je prokazatelně méně virulentní pro zajíce a myši.
- *F. tularensis* subspecies *novicida* – varianta spojovaná s přenosem nákazy prostřednictvím kontaminované vody. Byla izolována z vody v Utahu, kde bylo v době nedávno minulé zaznamenáno několik humánních nákaz, u nichž byla jako zdroj nákazy uváděna přírodní vodní plocha. Tato varianta je ze všech uvedených nejméně virulentní (Ellis a kol., 2002; Oyston a kol, 2004).

### 2.1.2. Epidemiologie nemoci

Tularémie se řadí mezi nákazy s přírodní ohniskovostí. Jedná se antropozoonózu tj. nemoc postihující primárně zvířata, které však může být sekundárně přeneseno i na člověka. Vzhledem ke snadné šířitelnosti, vysoké virulenci (již 10 bakterií je schopno vyvolat onemocnění), schopnosti způsobovat vážná onemocnění u člověka i jiných druhů (celkem více než 250) a značné rezistenci vůči vnějším podmínkám (ve vodě přežívá i několik týdnů, v obilném či senném prachu i několik měsíců) je tato bakterie řazena do kategorie A biologických bojových agens.

Přírodním rezervoárem onemocnění jsou divoce žijící zvířata, zejména hlodavci, divocí králíci, zajíci, krtci, ondatry, veverky, křečci, syslové a další. Dalším rezervoárem a zároveň častým vektorem jsou klíšťata, komáři a ovádi. Členovci jsou možnými vektory přenosu onemocnění na člověka, častěji ale dochází k infekci člověka poraněním při odchytu, stahování a porcování nemocných zvířat. Výjimkou není ani nákaza vdechnutím prachu z kontaminovaného obilí (kontaminace močí nemocných hlodavců) nebo infekčního aerosolu. Významná je i nákaza požitím nedostatečně tepelně upravených kontaminovaných potravin a vody. Přenos z člověka na člověka nebyl popsán (Dennis a kol., 2001).

### 2.1.3. Klinické příznaky

Tularémie patří mezi akutní infekční onemocnění s náhlým začátkem, horečkou, bolestmi hlavy a svalů, mající charakter nákazy s přírodní ohniskovostí. Inkubační doba onemocnění je udávána v rozmezí 3 až 5-ti dní, v závislosti na virulenci kmene a velikosti infekční dávky. K infekci může u člověka dojít při inhalaci nebo intradermální inokulaci již 10 až 50 organismů, naproti tomu, pro vyvolání infekce skrz gastrointestinálním trakt je třeba asi  $10^8$  organismů. Nákaza není přímo přenosná z člověka na člověka. U neléčených případů

se bakterémie vyskytuje v prvních dvou týdnech onemocnění, v lézích přetrvává *F. tularensis* asi měsíc (i déle) po začátku onemocnění. Hematofágní hmyz je infekční asi 14 dnů, klíšťata celý život (2-3 roky). Kontaminované maso zůstává infekční i ve zmraženém stavu (-15 °C) déle než 3 roky (<http://www.poliklinikablansko.cz/informace/tularemie.htm>).

Klinické projevy infekce závisí na bráně vstupu agens do těla. Tularémie se může manifestovat ve formě:

- ulceroglandulární – (75-85%) vzniká proniknutím bakterií do těla oděrkami na ruku při manipulaci se zdechlinami nakažených zvířat nebo bodnutím krev-sajícího hmyzu, projevuje se v době vypuknutí prvních příznaků onemocnění jako zarudlý puchýřnatý prohřátý pupínek někdy překrytý strupem, se zduřením a zvětšením jedné nebo více lokálních aferentních uzlin;
- okuloglandulární – (1-2%) vzniká přímou kontaminací oka, projevuje se hnisavým zánětem spojivek, doprovázeným svěděním, překrvením spojivek a zduřením preaurikulárních uzlin;
- glandulární – (5-10%) je charakterizována zduřením uzlin bez tvorby vředu;
- orofaryngeální/intestinální – vzácná forma onemocnění většinou způsobená vypitím kontaminované vody nebo požitím kontaminovaného jídla, méně často inhalací kontaminovaného aerosolu; projevuje se jako zánět dutiny ústní, hnisavý zánět hltanu, angína, někdy s vředováním, dysfagií, bolestmi břicha, průjmem a zvracením; může být doprovázeno zřetelným zduřením krčních uzlin nebo uzlin okolo hltanu;
- tyfoidní – (5-15%) tento výraz se používá pro označení systémového onemocnění s horečkou, vyčerpáním, úbytkem váhy bez lymfadenopatie, bez známek místa vstupu infekce nebo přesné anatomické lokalizace;
- pneumonická – v 30-80% se přidružuje k tyfoidní, v 10-15% k ulceroglandulární formě; vzniká přímou inhalací kontaminovaného aerosolu nebo následkem hematogenního rozsevu bakterií z distálních částí těla. Projevuje se jako systémové onemocnění doprovázené jedním nebo více z následujících projevů – zánět hltanu, průdušnice či průdušek, plic a pohrudnice, zduřením hylových uzlin – které může vést až k zápalu plic s dechovým selháním a následnou smrtí.

Rekonvalescence i po nepříliš komplikovaných onemocněních je zdlouhavá a je doprovázena potížemi neurovegetativního charakteru (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SiteContent/MedRef/OnlineRef/FieldManuals/medman/Tularemia.htm>).

#### **2.1.4. Léčba**

Dříve se pro léčbu tularémie používaly především aminoglykosidové preparáty. Lékem volby byl streptomycin. Pro své závažné nežádoucí účinky jako je např. ototoxicita se v současné době streptomycin užívá pouze v ojedinělých případech např. u tularemické meningitidy. U méně závažných případů byl nahrazen dalším aminoglykosidickým antibiotikem - gentamicinem. Nedávné mikrobiologické studie ukazují, že další možnou alternativou léčby tularemické infekce je chinolonové antibiotikum - ciprofloxacin. Je určeno pro léčbu lehčích forem tularémie a na rozdíl od aminoglykosidů je aplikovaný perorálně (Tärnvik a Berglund, 2003). Po prodělané infekci vzniká dlouhodobá imunita, jsou však zprávy i o několikanásobně se opakujících reinfekcích.

#### **2.1.5. Prevalence onemocnění**

Tularémie je v ČR celoročním onemocněním, s maximem v zimních měsících. Nemocnost je obvykle velmi nízká, v některých letech se výskyt několikanásobně zvýšil (např. v roce 1978 na 170 případů, epidemické období 1998 – 1999 registrovalo 222 a 225 případů ročně, v roce 2002 – 110 případů). Nejvyšší výskyt byl zaznamenán v roce 1968, přes tisíc případů. V České republice je známo zhruba 120 přírodních ohnisek nákazy, z nichž aktivní jsou zejména v okresech Znojmo, Břeclav, Třebíč, Brno-venkov, Hodonín, Příbram, Plzeň jih a sever ([http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alim\\_2005\\_1\\_deklas\\_rev2\\_pdf](http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alim_2005_1_deklas_rev2_pdf)).

#### **2.1.6. *Francisella tularensis* – biologická zbraň**

Vzhledem k tomu, že tularémie není nijak rozšířené onemocnění, má její etiologické agens vysoký potenciál být použito jako biologická zbraň. Světová zdravotnická organizace uvádí, že rozptýlení aerosolu s 50 kg virulentního kmene *F. tularensis* v pětimilionovém městě by vedlo asi k 250 000 nakaženým nemocným. I přes včasné podání antibiotika se předpokládá, že asi u 1 % všech případů by onemocnění vedlo ke smrti. Infikovaní jedinci by byli nemocní několik týdnů, relapsy by trvaly týdny až měsíce. Vakcinovaní jedinci by byli proti respirační cestě nákazy chráněni jen částečně, protože vyvinutá povakcinační imunita je poměrně nízká. Na základě studie Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) je uváděno, že ekonomická ztráta by na každých 100 000 exponovaných osob činila 5,4 miliard

amerických dolarů při zahrnutí nákladů na léčbu a dekontaminaci osídlených zasažených oblastí (Dennis a kol., 2001).

### 2.1.7. *Francisella tularensis* LVS

Tak jako u každého infekčního onemocnění, vyvinutí efektivní vakcíny je i u tularémie velkou prioritou, zvláště, když je *F. tularensis* zařazována do kategorie A biologických bojových agens. První pokusy byly zaměřeny na použití celých usmrcených bakterií nebo extraktů z nich, podávané skarifikací. Tyto vakcíny měly však velmi nízkou ochranu. Od roku 1931 probíhalo v tehdejší SSSR studium „suchých živých vakcín“ odvozených od kmene 15. Tento kmen byl odvozen od virulentního kmene typu B *F. tularensis* subspecies *horalica*, který byl oslaben opakovaným pasážováním (Conlan, 2004). Takto vzniklá vakcína byla aplikována epidermálně skarifikací a vykazovala 100% ochranný účinek (Černý, 2002). V padesátých letech dvacátého století byl kmen 15 převezen ke studiu do USA a zde kultivován na peptone-cysteinovém agaru. Tímto způsobem kultivace se vydělily dva typy kolonií odlišné zbarvením viditelným při osvětlení kolonií šikmým světelným zdrojem a svou virulencí. První typ kolonií vykazoval modré zbarvení a byl pojmenován jako „modrá varianta“ a druhý typ vykazoval šedé zbarvení, proto jeho pojmenování „šedá varianta“. Dalším studiem bylo dokázáno, že rozdíl ve zbarvení kolonií je způsoben změnou v typu O-antigenu, vyskytující se ve dvou fenotypech. Šedá varianta zůstala nadále virulentní pro myši, modrá varianta byla schopna zprostředkovat ochranu myši před virulentní šedou variantou. Tato „protekcí zprostředkující“ varianta byla pokřtěna jako *F. tularensis* LVS (live vaccine strain) a od ní začal výzkum pro velkovýrobu vakcinační látky proti tularémii (Conlan, 2004). *F. tularensis* LVS byla používána zejména k vakcinaci rizikových skupin obyvatelstva, zvláště pak pracovníků v laboratořích, kteří přicházeli do kontaktu s virulentními kmeny *F. tularensis*. Vakcína je dobře účinná, ale poskytuje nízkou ochranu proti plicní formě tularémie, což je nevýhodné z hlediska možnosti použití *F. tularensis* jako biologické zbraně. V současné době není nikde na světě registrována vakcína, která by vyhovovala vysokým bezpečnostním standardům, které musí každá taková vakcína splňovat. Pro získání takové vakcíny je nejdříve třeba objasnit mechanismy virulence, které jsou v současné době velmi málo známy. Je preferován vývoj vakcíny, která by se skládala z definovaných podjednotek bakterie. Hlavním úkolem je však zjistit mechanismus zajišťující protekcí při vakcinaci kmenem LVS a identifikovat a přesně charakterizovat protektivní antigeny napomáhající úniku bakterie z fagosomu makrofágů (Conlan, 2004).

### 2.1.8. Interakce s hostitelskou buňkou

Výsledná interakce hostitele s patogenním mikroblem odráží vyváženost obranného systému hostitele na straně jedné a schopnosti patogenního mikroba jej překonat na straně druhé. Vniknutím patogenního organismu do hostitele dochází k indukci ochranné zánětlivé reakce, při které buněčné a humorální komponenty přirozené imunity rozeznají látky antigenní povahy. Rozeznáním antigenu dochází k aktivaci specifické imunity. Specifická imunita je důležitá pro rozvoj komplexní obranné reakce ve spolupráci s nespecifickou imunitou. Cílem úspěšné ochrany organismu je účinná eliminace patogenního organismu a vytvoření imunologické paměti. V průběhu vývoje však řada patogenních organismů vyvinula nejrůznější mechanismy, které jim umožňují obejít nástroje imunitního systému hostitele. Určité bakterie mají např. schopnost potlačovat fúzi fagozomu s lysozomem (*Mycobacterium tuberculosis*) nebo se adaptují na dané prostředí (*Coxiella burnetii*) (Santic, 2006).

*Francisella tularensis* je fakultativně intracelulární bakterie, která slouží jako vhodný model pro studium intracelulární infekce. Je schopna infikovat a rozmnožovat se nejenom ve fagocytujících buňkách člověka, myši, krys a morčat, ale i v buňkách nefagocytujících, jako jsou hepatocyty, fibroblasty či endoteliální buňky (Tärnvik, 1989). Za klíčové buňky v obranné imunitní reakci hostitele jsou považovány mononukleární fagocyty. Jsou to ale také makrofágy, které vytvářejí vhodné podmínky pro další rozvoj bakterie – její přežití a replikaci uvnitř buňky (Clemens a kol., 2004).

Mimořádná schopnost adaptace *F. tularensis* na podmínky vnitřního prostředí hostitele bez výrazných známek stresu představuje klíčový bod patogeneze.

V počáteční fázi tularémické infekce se rozvíjí protektivní zánětlivá reakce, na které participují neutrofilní granulocyty. První útočnou vlnu granulocytů střídají makrofágy (Fortiere a kol., 1992). V případě *Francisella tularensis* bylo prokázáno, že peritoneální makrofágy mohou zabít pohlcené bakterie jedině tehdy, pokud jsou aktivovány IFN- $\gamma$  (Sjösted a kol., 1996). Aktivované makrofágy disponují potencionálními antimikrobiálními účinky jako např. produkce kyslíkových radikálů nebo down-regulace transferinového receptoru, čímž dochází ke snížení koncentrace intracelulárního železa (Fortiere a kol., 1992). Aktivace je složitý proces, při kterém jsou ovlivněny základní morfologické znaky a funkce makrofágů. Buněčná aktivace může vést ke konformačním změnám povrchových receptorů, což se výsledně projeví v aktivaci transkripčních faktorů (Krejsek a Kopecký, 2004), např. vazba lipopolysacharidu (LPS) nebo IFN- $\gamma$  má za následek aktivaci nukleárního faktoru kappa B (NF $\kappa$ B) (Cavaillon, 2002). Pro přežití uvnitř buňky aktivuje ovšem *Francisella* i signální

cesty, které zabrání hostiteli v účinné obraně. Stresový protein (hypotetický, 23 kDa protein) je s největší pravděpodobností zodpovědný za téměř kompletní blokádu nukleárního faktoru kappa B (NF $\kappa$ B) MAP-kinázové signální cesty. Následkem této blokace dochází ke změně v produkci cytokinů, NO a adhezi infikovaných buněk (Telepnev a kol., 2003).

Intracelulární mikroorganismy vyvinuly celkem tři různé strategie pro své přežití v buňce: (i) extrafagomální cesta, ve které patogen uniká z fagozomu do cytoplazmy po degradaci fagomální membrány např. *Listeria monocytogenes*, *Shigella* spp., *Trypanozoma cruzi*, (ii) patogen se adaptuje na kyselé prostředí fagolysozomu jako např. *Coxiella burnetii*, *Leishmania amazonensis*, (iii) patogen zůstává usídlen uvnitř fagozomu, ale zabrání jeho fúzi s lysozomem a tvorbě fagolysozomu, jako např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*.

V případě *F. tularensis* není doposud dostatek informací o podmínkách v intracelulárním kompartmentu, jako např. pH kompartmentu a jeho interakce s hostitelskou buňkou. V každém případě pH intracelulárního kompartmentu velice zásadním způsobem ovlivňuje výživu a následně růst bakterie. Z tohoto důvodu je interakce s membránovým transportním mechanismem hostitele důležitou součástí úspěšné patogenní invaze. Clemens ve své studii uvádí, že nejvhodnější pH intracelulárního kompartmentu pro správný růst *F. tularensis* je pH neutrální (Clemens a kol., 2004). Toto tvrzení je v rozporu s prezentovanými výsledky Fortiera, z kterých vyplývá, že acidifikace vezikul je nezbytně nutná pro přísun železa jako životně důležité složky výživy *Franciselly* (Fortier a kol., 1992). Nedávné studie prokázaly únik *F. tularensis* cca po 2 hodinách po infekci z fagozomu do cytoplazmy, kde dochází k replikaci bakterie. Je zajímavé, že na rozdíl od jiných bakterií, které opouští fagozóm, nedisponuje *Francisella* sekrečním typem III ani IV, prostřednictvím kterého sekretované proteiny znemožňují obrannou reakci hostitele (Telepnev a kol., 2003).

### 2.1.9. Faktory virulence

V současné době je málo dostupných informací o faktorech virulence potřebných k vyvolání infekce. Je zřejmé, že tyto faktory mají souvislost s intracelulárním růstem bakterie.

Lipopolysacharid (LPS) je integrální součástí vnější části membrány všech gramnegativních bakterií. Má neobvyklé biologické vlastnosti, a proto o něm můžeme uvažovat jako o složce vakcíny. U *F. tularensis* však vykazuje malou toxicitu in vitro i in vivo. Je schopen vyvolat uvolnění interleukinu 1 (IL-1) a tumornekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) z aktivovaných mononukleárních lymfocytů. Tato sekrece je několikrát nižší než u

*Escherichia coli* (Sjösted, 2003).

Kyselá fosfatáza (Acp) je u některých intracelulárních patogenů řazena mezi virulentní faktory, protože podporuje přežití bakterie uvnitř napadené buňky tím, že inhibuje respirační vzplanutí hostitelské buňky jako její obranou reakci. U *F. tularensisi* však navíc Acp vykazuje unikátní strukturní odlišnosti, a také substrátovou specifitu. Tento typ byl prokázán také u *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella* spp. a *Burkholderia pseudomallei* (Sjösted, 2003).

Bakteriální pouzdro – všechny plně virulentní kmeny *F. tularensisi* jsou opouzdřeny, ale toto pouzdro ztrácí v hypertonickém prostředí. Kapsula je tvořena z 50 až 70 % lipidy, zbytek nebyl přesně identifikován. Kapsula je pro bakterii důležitá pro sérovou rezistenci a rezistenci na vnější podmínky, ne však pro přežití v polymorfonukleárních leukocytech po fagocytóze. Je popsán kmen, který je avirulentní pro myši, avšak velice citlivý k lýze komplementem. Tento kmen neindukuje antimikrobiální odpověď a bez problémů přežívá v buňce. Naproti tomu, rodičovský kmen za stejných podmínek indukoval respirační vzplanutí a byl zabit uvnitř buňky. Kapsula se jeví jako nezbytná komponenta pro vyjádření plné virulence (Sjösted a kol., 2003).

mglAB operon (macrophage growth locus) - kóduje dva proteiny - MglA a MglB, které jsou jak sekvenčně tak funkčně homologní s SspA a SspB *Escherichie coli*. Předpokládá se, že MglA i MglB mohou působit jako regulátor genové exprese při postupně se zhoršujících životních podmínkách uvnitř hostitelské buňky (Laurino a kol., 2004).

iglABCD operon - ovládá do jisté míry intracelulární proliferaci bakterií *F. tularensisi* subspecies *novicida* v hostitelských makrofázích. Tento operon kóduje čtyři proteiny, jejichž hmotnost dle predikce činí 21, 59, 22 a 47 kDa v pořadí IglA, B, C, D. Samotný *iglC* gen a jemu odpovídající protein IglC odpovídá podle sekvenace již dříve identifikovanému proteinu o hmotnosti 23 kDa. Geny *iglA* a *iglB* kódují dle sekvenční podobnosti konzervativní proteiny s neznámou funkcí. Sekvence *iglD* neodpovídá žádnému z produktů genů *iglABCD* operonu. Je pouze prokázáno, že transponovaná inserce v *iglA* nebo *iglC* přináší neschopnost mutantů se intracelulárně množit v makrofázích. Inserce v *iglA* navíc přináší neschopnost exprese IglC, což naznačuje jistou funkční závislost exprese genů celého operonu (Santic a kol., 2005).

## 2.2. Lipidové rafty

### 2.2.1. Obecné vlastnosti

Plazmatické membrány tvoří uzavřené kompartmenty okolo buněčné protoplazmy, separují jednu buňku od druhé a tím umožňují jejich individualitu. Plazmatická membrána působí jako selektivně propustná bariéra, která reguluje výměnu látek a energií mezi buňkou a okolím, a současně se podílí na příjmu pro buňku důležitých signálů. Má tedy významnou roli v rozvoji imunitní odpovědi, neurotransmise, signální transdukce, mezibuněčné komunikace a udržení buněčné homeostázy.

V roce 1972 byl Singerem a Nicolsonem navržen fluidní mozaikový model membrány, který se stal základem pro naše chápání struktury buněčné membrány. V tomto modelu jsou membránové proteiny zobrazovány jako ledovce plující v moři lipidů. S rozvojem buněčné biologie se však změnil dřívější pohled na strukturu biomembrán (Dráber, P., Dráberová L., 2001). V současné době se předpokládá, že plazmatická membrána již nevypadá jako proměnlivě neuspořádané moře lipidů, ale spíše že uvnitř tohoto lipidového moře se nacházejí organizované struktury, které zprostředkovávají distribuci proteinů v dvojvrstvě. Tyto lipidové „struktury“ se nazývají lipidové rafty. Lipidové rafty jsou membránové mikrodomény specifického lipidového a proteinového složení. Jsou bohaté na cholesterol, glykosfingolipidy, v anglické literatuře označovány jako GEM (glycosphingolipid – enriched microdomains) (Pike, 2004). Díky svému specifickému lipidovému složení se fázově odlišují od zbytku plazmatické membrány, který převážně obsahuje fosfolipidy v kapalně neuspořádaném stavu. Sfingolipidy obsahují delší a více nasycené mastné kyseliny, čímž se mezi nimi zvyšuje pevnost vazby (Gulbins a kol., 2004). Cholesterol vyplňující prostor mezi sfingolipidy představuje klíčovou molekulu ve stabilizaci domén (Simons a Ehehalt, 2002).

Díky jejich ojedinělému lipidovému složení jsou membránové mikrodomény za nízké teploty relativně nerozpustné v neionogenních detergentech, např. Triton X-100, NP-40, Brij nebo Chaps. Tato vlastnost umožňuje jejich jednoduchou izolaci na hustotním sacharózovém gradientu (Hořejší, 2005). Původně byly lipidové rafty definovány pouze jako mikrodomény o nízké hustotě, nerozpustné v chladném 1 % Tritonu X-100, známé v anglické literatuře jako TIM (Triton-insoluble membranes) nebo TIFF (Triton-insoluble floating fraction). Postupně se začaly používat i další neionogenní detergenty. Tyto postupy vedly k izolaci lipidových raftů o různém lipidovém a proteinovém složení (Pike, 2004; Gulbins a kol., 2004). Heterogenitu membránových mikrodomén v závislosti na použití různých silných detergentů



potvrdili experimentálně i Man a kolektiv (2005) ve své proteomické analýze lipidových raftů NK buněk. Z toho je zřejmé, že jednotlivé detergenty samy o sobě ovlivňují složení membránových domén a vyvstává tedy otázka, zda izolované mikrodomény opravdu existují nebo se jedná o pouhé artefakty izolačních postupů. Nicméně bylo provedeno několik experimentů, které dávají jasný důkaz o tom, že lipidové rafty opravdu existují. Jedná se především o mikroskopické studie (elektronová, fluorescenční, konfokální mikroskopie), ale i např. izolace lipidových raftů neionogenním detergentem Brij-98 při 37 °C nebo izolace bez přítomnosti neionogenního detergentu (Hořejší, 2005).

Jedinou morfologicky identifikovatelnou lipidovou mikrodoménou je caveola. Caveola je vchlípenina plazmatické membrány, která je snadno rozpoznatelná od ostatních lipidových domén, a to přítomností cholesterol vázícího proteinu caveolinu (Lai, 2003). Velikost této podtřídy lipidových raftů může být dobře určena elektronovou mikroskopií. Caveoly jsou většinou pozorovány jako vchlípeniny připomínající tvar baňky o velikosti 100 nm v průměru. Velikost plochých raftů není možné přímo určit, protože je nelze rozlišit od okolní membrány. Pro určení jejich velikosti byly zavedeny relativně nepřímé metody, které vedly k vysoce variabilním výsledkům. Nicméně, na základě spojení všech dosud dostupných dat je předpokládána průměrná velikost lipidových raftů v rozmezí od 100 do 200 nm, což je hluboko pod rozlišovací schopností světelného mikroskopu. Další důležitý poznatek o lipidových raftech je velikost plochy plazmatické membrány, která právě představuje lipidové rafty. Při podmínce, že lipidové rafty představují vše, co zbude z buněčné membrány po extrakci 1 % Tritonem X-100, jedná se asi o 50 % plochy plazmatické membrány. Plocha pokrývající lipidové rafty se výrazně liší v závislosti na druhu buněk použitých v daném experimentu, což může být jedním z faktorů velké variability výsledků.

Jako markery těchto membránových domén se buď používají raftové proteinové markery, caveolin-1 nebo flotillin-1, nebo lipidové raftové markery, gangliosidy (Pike, 2004).

### 2.2.2. Funkční charakteristika raftů

Lipidové rafty jsou malé, dynamické a nestálé útvary plazmatické membrány. Jednotlivé mikrodomény se liší velikostí a složením. Rafty jsou obohaceny o specifické proteiny, které jsou zahrnuty v důležitých buněčných procesech jako je endocytóza, přenos informací mezi buňkou a okolím, uvnitř buňky a signální interakce mezi buňkami.

Mezi proteiny, které jsou součástí lipidových raftů patří proteiny ukotvené v membráně pomocí glykofosfatidyl – inositolu (GPI – proteiny), tyrosinové kinázy rodiny Src (např. Lck, Fyn a Lyn), protein kináza C, nízkomolekulární G protein, cholesterol vázající

proteiny – caveolin-1, acylované proteiny – flotillin-1.

Zásadním krokem v iniciaci signálního přenosu po aktivaci glykolipidových receptorů na povrchu membrány je redistribuce signálních molekul na cytoplazmatické straně raftů. Díky této asociaci raftů vzniká zvláštní uskupení molekul bohaté na enzymy jako např. kinázy, fosfatázy, které fosforylují či defosforylují další substráty signální kaskády (Simons a Toomre, 2000).

Ke shlukování raftů dochází na obou stranách plazmatické membrány. Na vnější straně membrány se na klastrování raftů podílejí protilátky, antigeny nebo rafty vázající proteiny jako je např. cholera toxin-B, zatímco na cytoplazmatické straně membrány proteiny shlukující rafty, a to např. flotilliny, annexiny (Rajendran a Simons, 2005).

### 2.2.3. Lipidové rafty jako vstupní brána bakterií

Interakce bakterie s imunitním systémem představuje střet dvou strategií. Cílem makroorganismu je odhalit strategii mikroorganismu dříve, než dojde k projevu infekce. Naopak cílem patogena je obejít nástroje imunitního systému hostitele a úspěšně se replikovat. Klíčovým krokem se tak stává mechanismus vstupu patogena do hostitelské buňky. Některé viry, bakterie a parazité vstupují do hostitelské buňky prostřednictvím lipidových raftů. Lipidové rafty jako vstupní brána umožňuje patogenním mikroorganismům se navázat na příslušné receptory a aktivovat tak příslušné signální cesty, které zabrání aktivaci hostitelského imunitního systému a vytvoří tak vhodné podmínky pro replikaci patogena uvnitř buňky (Norkin a kol., 2001).

Bakterie *E. coli* exprimuje adhesin FimH, díky kterému vstupuje do žírných buněk způsoben užívajícím lipidové rafty. Tento protein se váže na cukry povrchových molekul hostitelských buněk, aby bakterii umožnil kolonizaci mukózních povrchů, což je prvním krokem infekce. Na druhou stranu, FimH také zprostředkovává adhezi na fagocyty, jako makrofágy, které normálně požírají a zabíjejí bakterie. Shin a kol. ve své studii prokázali, že molekula CD48, což je GPI-spojený receptor pro FimH povrchu hostitelské buňky, je přítomný v lipidových raftech žírných buněk a je vstupním místem bakterie. Lipidové rafty jsou také spojovány se vstupem do makrofágů u intracelulárního patogena *Mycobacterium tuberculosis* BCG. Dalším patogenem, který může vstupovat do buňky prostřednictvím lipidových raftů je *Camphylobacter jejuni*, u kterého bylo stejně jako u mykobakterií prokázáno, že cholesterol-chelatující činidla inhibují jejich vstup do epiteliálních buněk.

Na lipidové rafty se také váží některé bakteriální produkty. Bakteriální toxiny jsou rozpustné proteiny, které se váží na specifické membránové receptory, které jsou součástí

raftů, např. cholera toxin podtyp B se váže na GM1 receptor těchto mikrodomén. Kromě toho, že lipidové rafty slouží jako vazebné místo toxinů jsou využívány i toxiny tvořící póry jako např. Aerolysin bakterie *Aeromonas hydrophyla*.

V lipidových raftech jsou také lokalizovány receptory CD14, což jsou receptory pro lipopolysacharidové komponenty bakteriálních buněčných stěn. Po navázání bakteriálního LPS dochází ke stimulaci produkce prozánětlivých cytokinů jako jsou TNF, IL-1 nebo IL-6. Tyto cytokiny spouštějí uvolňování bioaktivních lipidů a kaskádů dalších cytokinů a kyslíkových radikálů z řady buněk. Nízké dávky LPS jsou pro hostitelský organismus výhodné, ale naopak vysoké dávky mohou plynule vést až k septickému šoku s letálním koncem (Santos a kol., 2003).

Z dalších patogenů využívajících lipidové rafty pro svůj vstup do buňky jsou viry. Internalizace většiny neobalených virů probíhá buď clatrin-dependentní cestou jako např. u adenovirů nebo clatrin-independentní cestou prostřednictvím caveoly jako např. Simian virus (SV40). Neopláštěný virus se váže na molekulu MHC I. třídy hostitelské buňky, která je součástí caveoly a poté prostupuje do endoplazmatického retikula. Další viry vstupující do buňky prostřednictvím membránových mikrodomén jsou virus spalniček, virus chřipky, polyomavirus, respirační sincitiální virus (RSV) a filoviry Ebola a Marburg (MBGV). S rafty jsou také spojeny receptory T buněk pro virus HIV. Lipidové rafty jsou důležité v průběhu celého životního cyklu viru HIV – od jeho vstupu do T buněk až po únik viru z buňky po jeho replikaci.

V současné době existují důkazy o tom, že lipidové rafty hrají významnou roli v infekci vyvolané priony. Prionový protein se specificky váže na kaveolu a tím dochází k jeho konformační změně na patogenní formu. Struktury podobné kaveolám byly také prokázány na membránách, které obklopují parazitární patogeny jako například *Plasmodium falciparum* (Rosenberger a kol., 2000; Duncan a kol., 2002).

### 3. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo zavedení a optimalizace metody izolace lipidových raftů. Diplomová práce je součástí širšího projektu studia interakce host-patogen na Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové. Výsledky diplomové práce budou tedy využity v tomto projektu, jehož cílem je objasnění interakce patogenní bakterie *Francisella tularensis* s hostitelskou buňkou. Dílčí cíle zahrnují:

- Izolace lipidových raftů z buněk monocytární-makrofágové linie J774
- Izolace lipidových raftů z buněk monocytární-makrofágové linie J774 infikované bakterií *Francisella tularensis* LVS
- Identifikace proteinů asociovaných s lipidovými rafty a určení jejich potenciálního vztahu k interakci s infekcí bakterií *Francisella tularensis* LVS

## 4. Experimentální část

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Živý materiál

Buněčná linie J774 je monocytární - makrofágová linie odvozená z BALB/c myších makrofágů, což jsou buňky částečně adherentní. Jedná se tedy o buňky rostoucí v suspenzi, někdy lehce přisedlé k povrchu kultivační lahve.

Francisella tularensis LVS – kmen dodaný Univerzitou v Umeå, Švédsko: ATCC 29684, American Type Culture Collection Rockville, Mariland

#### 4.1.2. Přístroje a laboratorní pomůcky

##### Mrazicí box:

- VX 38 E, Jouan

##### Hlubokomrazicí box:

- SANYO MDF 1155

##### Laminární box:

- Safeflow 1.2, Bioair instruments

##### Centrifugy:

- BR4i, Jouan
- Ultracentrifuga, Optima™ MAX s kapslemi, Beckman Coulter + Ultracentrifugační zkumavky Beckman 344057 UC TUBES 5 ml BOX 50, Biotech

##### Inkubátor:

- SL Shel lab CO<sub>2</sub> Incubator

##### Mikroskop:

- Carl Weiss, Jena

##### Denzitometr:

- CO8000 Cell Density Meter, WPA biowave

##### Termoblok:

- Digitální bloková lázeň UBD, Grant

##### Jímač gradientových frakcí:

- Piston Gradient Fractionator, Biocomp

##### Pomůcky pro SDS-PAGE:

- Protein IEF Cell, Bio-Rad, Richmond – Kalifornie, USA
- Skla pro lití gelů Outer Glass Plate 3/1 mm, Bio-Rad, Richmond – Kalifornie, USA
- Mini Protein II (III) Elektrophoresis Cell, Bio-Rad, Richmond – Kalifornie, USA
- Zdroj napětí a proudu Power Pac 200 (300), Bio-Rad, Richmond – Kalifornie, USA

#### Hybridizér:

- HB-1D, Techne

#### Ostatní:

- analytické váhy
- vortexy
- chladničky
- orbitální třepačky
- běžné mikrobiologické pomůcky (kultivační lahve, mikrobiologické kličky, Petriho misky atd.)
- běžné biochemické pomůcky (skleněné a plastové nádoby, mikropipety, pipetovací špičky bez filtru, mikrozkuřavky, chirurgické rukavice, atd.)
- PVDF Western Blot membrány, Roche
- Blotovací papír, Original Extra thick blot paper – Mini blot size, Biorad
- Parafilm „M“ laboratory film, Pechiney plastic packing, Chicago, USA
- Papírové kapesníky, Tissue-box, Carl Roth GmbH+Co
- Nitrocelulósová membrána, PALL Gelman Sciences, BioTrace™ NT, 0,45 μm 1/pkg

#### **4.1.3. Standardy**

- Silver stain SDS-PAGE standarda Low Range, Biorad
- Precision Plus Protein™ standarda Kaleidoscope™, Biorad

#### **4.1.4. Protilátky**

- Cholera-toxin sub. B konjugovaný s HRP, Molecular Probes, C34780
- Caveolin-1 monoklonální protilátka, Sigma, C3237
- Flotillin-1 monoklonální protilátka, BD Transduction laboratoriem Pharmingen, Cat.No.:610821

- Kozí-anti-myší protilátka konjugovaná s HRP, Dako, Code No.:P0447
- Prasečí-anti-králičí protilátka konjugovaná s HRP, Dako, Code No.:P0399

#### 4.1.5. ECL-Chemiluminiscenční substrát

- Roche's Chemiluminescence Western Blotting Kit, Cat. No.: 11 500 694 001

#### 4.1.6. Roztoky a chemikálie

##### Roztoky na McLeod agar

- bovinní hemoglobin
- Thayer-Martinův agar
- Bacto agar
- Iso Vitalex

##### Kultivační médium

- Dulbeccos' MEM + 4 500 mg/l glukózy + Glutamax™ – Pyruvát
- 10 % Fetální telecí sérum inaktivované GIBCO, Skotsko
- Gentamycin, GIBCO, Skotsko, výsledná koncentrace 30µg/ml kultivačního média

##### Promývací médium

- Dulbeccos' MEM + 4 500 mg/l glukózy + Glutamax™ – Pyruvát

##### Pufrovaný fyziologický roztok – PBS

- |  |             |
|--|-------------|
| - NaCl   | 0,8 g       |
| - KCl  | 0,2 g       |
| - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O | 3,15 g      |
| - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O    | 0,15 g      |
| - KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                        | 0,2 g       |
| - Aqua pro injectione                                    | ad 1 000 ml |

##### 0,5 % roztok trypanové modři v PBS

- 0,5 g trypanové modři
- 100 ml PBS

##### Lyzační NET pufr

- 150 mM NaCl
- 1 % NP-40 (nonylphenyl-polyethylen glykol), Fluka #74385-1L
- 50 mM Tris-HCl (pH 8)
- 50 mM NaF
- 5 mM EDTA (pH 8)

- inhibitory proteáz (Complete, EDTA-free) – 1 tableta/10 ml (Rochem #1 873 580)

přidat těsně před použitím

#### Ředící roztok na sacharózový gradient

- 25 mM TRIS-HCl, pH 7,5
- 125 mM NaCl
- 2 mM EDTA

#### 80 % sacharóza

- 80 g sacharózy rozpustit v 100 ml de H<sub>2</sub>O

#### SDS-vzorkový pufr

- 3 x koncentrovaný SDS
  - β-merkaptoetanol
- v poměru 1:2

#### Roztok na 10 % separační gel

- 5,01 ml vodného roztoku akrylamidu a PDA
  - 3,75 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8
  - 6 ml vody
- odvzdušnit
- 150 μl 10% vodného roztoku SDS
  - 37,5 μl 10% vodného roztoku APS
  - 3,75 μl TEMED

Vodný roztok akrylamidu a PDA se vždy připravuje v čase potřeby rozpuštěním 4,5g akrylamidu a 0,12g PDA ve vodě doplněné na 15 ml. Také roztoky SDS a APS se připravují čerstvé.

#### Roztok na 12 % separační gel

- 6,00 ml vodného roztoku akrylamidu a PDA
  - 3,8 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8
  - 5 ml vody
- odvzdušnit
- 150 μl 10% vodného roztoku SDS
  - 50,0 μl 10% vodného roztoku APS
  - 6,0 μl TEMED

Vodný roztok akrylamidu a PDA se vždy připravuje v čase potřeby rozpuštěním 4,5g akrylamidu a 0,12g PDA ve vodě doplněné na 15 ml. Také roztoky SDS a APS se připravují čerstvé.



### Roztok na zaostřovací gel

- 1,3 ml akrylamidu s PDA
  - 2,5 ml Tris-HCl pH 6,8
  - 6,1 ml vody
- odvzdušnit
- 100  $\mu$ l 10 % vodného roztoku SDS
  - 50  $\mu$ l 10 % vodného roztoku APS
  - 10  $\mu$ l TEMED

Pro přípravu zaostřovacího gelu se použije zbylý vodný roztok akrylamidu po přípravě separačního gelu. Při přípravě zaostřovacího gelu se postupuje dle stejného postupu, jako při přípravě separačního gelu

### 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

### 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

### 10 x koncentrovaný Tris pufr pH 7,6 – TBS

- 24,2 g Tris base
- 80,0 g NaCl
- 38,0 ml 1M HCl
- voda ad 1 000 ml

### 1 x koncentrovaný Tris pufr pH 7,6 s 0,05 % Tweenu

### Transfer pufr

- 3,03 g Tris-base
- 14,4 g Glycin
- 200 ml MeOH
- voda do 1 000 ml

### Horní a dolní pufr

- 7,75 g Tris-base
- 36,06 g glycinu
- 2,5 g SDS
- voda do 2,5 l a pH 8,36

### Fixační roztok I

- 40 ml metanolu
- 10 ml k. octové
- 50 ml vody

### Fixační roztok II

- 5 ml metanolu
- 5 ml k. octové
- 90 ml vody

#### 2 % roztok gltaraldehydu v 0,5 M octanu sodném

- 8 ml glutaraldehydu
- 4,1 g octanu sodného
- ad 100 ml deionizované vody 4° C chladné

#### 0,05 % roztok NDS

- 0,1 g NDS
  - ad 200 ml deionizované vody 4° C chladné
- Vždy čerstvě připravený.

#### Amoniakální roztok stříbra

- 21,33 ml vody
  - 0,2 ml 10M NaOH
  - 1,33 ml NH<sub>4</sub>OH konc.
- Titrovat roztokem 0,8 g AgNO<sub>3</sub> ve 4 ml vody
- doplnit do 100 ml H<sub>2</sub>O

#### Vývojka

- 5 g kyseliny citronové
- 0,1 ml formaldehydu
- ad 100 ml převařené destilované vody 4° C chladné

#### Stop lázeň – 5 % kyselina octová

- 50 ml kyseliny octové
- ad 1 l destilované vody

#### Uchovávací roztok pro gely – 5 % Tris + 2 % kyselina octová

- 25 g Tris
- 10 ml kyseliny octové
- ad 1 l destilované vody

#### Fixační roztok

- 2 250 ml metanolu
- 375 ml kyseliny octové
- 150 ml glycerolu
- 2 250 ml destilované vody

Akrylamid, USB (Amersham Pharmacia Bitech), Uppsala, Švédsko  
APS (persíra amonný), Bio-Rad, Richmont – Kalifornie, USA  
TEMED (N,N,N,N-tetramethylendiamid) USB (Amersham Pharmacia Bitech), Uppsala, Švédsko  
PDA (bis(akryoyl)piperazin), Bio-Rad, Richmont, Kalifornie – USA  
SDS (dodecylsírán sodný), Bio-Rad, Richmont – Kalifornie, USA  
Sušené mléko, Blotting Grade Blocker, Bio-Rad  
Tween 20, Sigma  
Bromfenolová modř, Serva, Heidelberg, Německo  
 $\beta$ -merkapt ethanol, Fuka, Buchs, Švýcarsko  
Metanol, Fluka, Buchs, Německo  
Tris-baze (tris(hydroxymethyl)aminomethan), Sigma, St. Louis, Montana – USA  
Deinizovaná voda, Těchonín  
Glutaraldehyd, Fluka, Buchs  
Citrát sodný, Sigma  
Sírán železnatý, Sigma  
Dusičnan stříbrný, Sigma  
Kyselina octová konc. Fluka, Buchs, Švýcarsko  
Prášková RTG vývojka, FOMA DP, Česko  
Rychloustalovač, koncentrát, FOMAFIX, Česko  
Octan sodný, Merk  
NDS (2,7-naftalen-disulfonan disodný) 95 %, Aeros

## **4.2. Metodika**

### **4.2.1. Příprava buněk monocytární-makrofágové linie J774**

#### **4.2.1.1. Zásady práce s buněčnými liniemi**

Práce s buněčnými liniemi představuje potencionální zdravotní riziko, proto je třeba dodržovat určitá opatření a zásady práce, které minimalizují riziko expozice pracovníka potencionálně infekčním agens. Také je třeba zamezit kontaminaci buněčné kultury mikroorganismy, případně buňkami cizího původu, které by mohly způsobit nesprávnost výsledků daného experimentu.

Práce tedy probíhá ve sterilním laminárním boxu, samozřejmostí by měly být ochranné prvky pracovníka, kterými jsou plášť a chirurgické rukavice, které si pracovník před každým vstupem do laminárního boxu očistí dezinfekčním prostředkem. Veškeré pracovní

pomůcky by měly být sterilní, nesterilní se před umístěním do laminárního boxu ošetří dezinfekčním prostředkem, hrdla lahví se případně ožehnou plamenem. Důležité je také snížit možnost vzniku aerosolů, které představují riziko inhalace a/nebo zkřížené kontaminace mezi kulturami. Roztoky buněk by se neměly promíchávat pipetováním, nutné je také zamezit nasátí roztoku do pipety. Práce by měla probíhat co nejrychleji a bezdotykově. Použité nástroje a materiály se likvidují dle interních směrnic (Quiagen News, 1, 2002 ).

#### **4.2.1.2. Složení živného média a podmínky inkubace**

Výběr kultivačního média významně ovlivňuje průběh růstové křivky buněk použitých pro pokus. Různé typy buněk vyžadují pro svůj růst specifické podmínky, které jsou zjišťovány experimentálně. Základními složkami kultivačního média jsou:

- anorganické soli, udržující osmotickou rovnováhu, regulující membránový potenciál, sloužící jako kofaktory enzymů,
- sacharidy, které jsou zdrojem energie nejčastěji ve formě glukózy a galaktózy,
- vitamíny, které jsou prekurzory kofaktorů, jsou důležité pro buněčný růst a proliferaci,
- proteiny a peptidy, nutné jako stavební materiál, zvláště důležité při kultivaci v médiu bez séra,
- mastné kyseliny, jako zdroj energie v médiu bez séra,
- stopové prvky,
- sérum (fetální bovinní sérum: komplex albuminu, růstových faktorů a inhibitorů),
- dále je nutné přidat antibiotika a fungicidní látky, případně hormony a růstové faktory (Laboratory Handbook Sigma-Aldrich, 2001).

Pro buněčnou linii J774 je doporučeno použít roztok Dulbecco's modified Eagle medium (DEMM). Pro nejefektivnější růst a rozmnožování této buněčné linie je doporučována teplota 37 °C a atmosféra s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>.

#### **4.2.1.3. Uchovávání a rozmrazování buněk**

Pro skladování právě nepoužívaných buněk je vhodný teplotní interval od -135 °C do -190 °C, který je schopný zaručit hlubokomrazicí box a tekutý nebo plynný dusík. Takto nízké teploty snižují riziko mikrobiální kontaminace buněk, vzájemné kontaminace linií a genetických či morfologických změn. Pro uchovávání buněk při tak nízkých teplotách je třeba

použít kryoprotektivní látky, které zabrání poškození buněk, zejména jejich buněčné membrány, krystalky ledu. Jako kryoprotektivní látka se používá dimethylsulfoxid (DMSO), který je však při teplotách nad 4 °C pro buňky toxický, a proto musí rozmrazení a vpravení buněk do živného média proběhnout co nejrychleji (Quiagen News, 3, 2002).

#### **4.2.1.4. Pasážování buněk**

Pasážováním je myšlen přenos části buněčné kultury do nové kultivační lahve a tímto umožnění dalšího růstu buněk. Tento proces je nutný u mnohých buněčných kultur, protože rostoucí buňky po určité době vyčerpají zásobu živných látek v kultivačním médiu a/nebo, rostou-li přisedle, pokryjí kultivační láhev v souvislé vrstvě, přestávají proliferovat a začínou odumírat. Prvním krokem pasážování je uvolnění adherovaných buněk od stěn kultivační lahve, který se buď provádí jednoduše pomocí seškrábání buněk z povrchu kultivační lahve scraperem nebo pomocí trypsinizace, což je technika využívající proteolytického enzymu trypsinu. Část takto získané buněčné suspenze se umístí do nové lahve s čerstvým kultivačním médiem, ve které pak probíhá další kultivace. Kultivační médium je třeba obměňovat každé dva dny.

Buňky J774 myší monocyto-makrofágové linie byly kultivovány ve 150 cm<sup>2</sup> kultivačních lahvích v 50 ml Dulbecco's modified Eagle media s přidavkem 10 % FTSI a gentamycinem v termostatu při teplotě 37 °C a atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>. 24 hodin před vlastním pokusem byly buňky inkubovány za standardních podmínek již bez gentamycinu.

#### **4.2.1.5. Stanovení viability a počtu buněk**

Při každém pasážování a po ukončení izolace je nutné zjistit životnost a počet získaných buněk. Pro tento účel se využívá mikroskopického stanovení propustnosti funkčních buněčných membrán pro trypanovou modř. Metoda je založena na principu aktivního vylučování barviva nepropustnou cytoplazmatickou membránou živých buněk pomocí funkčních transportních systémů. Je tedy možné rozlišit buňky uvnitř zbarvené, tedy mrtvé, od buněk prosvícených, živých. Buňky jsou spočítány v Bürkerově komůrce ve 25 čtvercích, buňky zasahující do hrany čtverce se počítají ve dvou stranách. Viabilita se počítá podle jednoduchého vzorce:  $viabilita[\%] = \frac{\text{počet živých buněk}}{\text{počet všech buněk v 25 čtvercích}} \cdot 100$ . Pro pokus se nepoužívají buňky s životností nižší než 80 %. Pro nasazení buněk nové pasáže je také třeba stanovit přibližný počet buněk v 1 ml suspenze. Tento stanovíme dle vzorce:  $\text{počet buněk v 1 ml suspenze} = \text{počet živých buněk} \times \text{zředění} \times 10\,000$ .

**Tab.1.:** Kultivace myší monocyto - makrofágové linie J774

Číslo experimentu	Potřebný počet buněk/50 ml kultivačního média	Skutečný počet buněk/50 ml kultivačního média	Počet buněk/1 ml kultivačního média	Viabilita buněk
1.	$1 \times 10^8$	$1.07 \times 10^8$	$2.14 \times 10^6$	96.1
2.	$1 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$2.8 \times 10^6$	90.4
3.	$1 \times 10^8$	$1.04 \times 10^8$	$2.08 \times 10^6$	90.6

**4.2.2. Příprava bakteriální suspenze *Francisella tularensis* LVS**

Pro práci s bakteriemi platí obdobné zásady jako pro práci s buněčnými liniemi. Před začátkem pokusu se masivně naočkují 3 plotny McLeod ze štokové plotny kmene *F. tularensis* LVS a inkubují se 24 hodin v termostatu při teplotě 37 °C, v atmosféře s 5 % CO<sub>2</sub>. Z 24 hodinové kultivace mikroorganismu byla připravena ve fyziologickém roztoku o pH 7.4 bakteriální suspenze *F. tularensis* LVS o O.D.=1.05. Optická denzita hodnoty jedna odpovídá počtu  $5 \times 10^9$  bakterií/ml PBS.

**4.2.3. Infekce buněk J774 bakterií *F. tularensis***

$1 \times 10^8$  buněk myší monocyto-makrofágové linie J774 byla infikována kmenem *Francisella tularensis* LVS o multiplicitě infekce (MOI) 500. Buňky byly infikovány *F. tularensis* LVS 2 hodiny v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>. K ověření správnosti multiplicity infekce byla zvolena metoda počítání CFU. Bakteriální suspenze byla naředěna roztokem PBS na koncentrace  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  a vyseta duplicitně pro každé ředění na McLeod kultivační plotny. Narostlé kolonie bakterií byly spočítány po 72 hodinové kultivaci v termostatu při teplotě 37 °C a atmosféře 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tab.2.:** Infekce buněk J774 bakterií *F. tularensis*

Číslo experimentu	O.D. LVS	Ředění CFU $10^{-6}$	Ředění CFU $10^{-7}$	Ředění CFU $10^{-8}$	Koncentrace LVS/ml
3.	1.05	145.5	20.5	3	$4.3 \times 10^9$

**4.2.4. Izolace lipidových raftů**

Lipidové rafty byly získány extrakcí buněčného lyzátu neionogenním detergentem a byly izolovány ultracentrifugací na hustotním sacharózovém gradientu.

$1 \times 10^8$  J774 buněk bylo dvakrát promyto v 50 ml chladného PBS a lyzováno v 800  $\mu$ l lyzačního pufru obsahujícího neionogenní detergent nonidet P-40. Buňky byly lyzovány po dobu 30 minut, ponechány celou dobu na ledu a každých deset minut důkladně vortexovány. Buněčný lyzát byl smíchán s roztokem 80 % sacharózy a vznikl tak roztok 40 % sacharózy obsahující vzorek. Sacharózový gradient byl navrstven pomocí tuberkulinové stříkačky do speciálních 5 ml zkumavek (Beckman 344057 UC TUBES 5ml BOX 50, Biotech) dle následujícího předpisu:

1. fáze.....0.5 ml 80 % sacharózy
2. fáze.....1.5 ml 40 % sacharózy obsahující vzorek
3. fáze.....2.0 ml 30 % sacharózy
4. fáze.....1.0 ml 10 % sacharózy.

Po navrstvení sacharózového gradientu byly zkumavky před ultracentrifugací vyváženy roztokem 10 % sacharózy. Důkladně vyvážené zkumavky byly ultracentrifugovány 17 hodin při 45 000 rpm v teplotě 4 °C. Po ukončení ultracentrifugace jsou zkumavky se vzorky vyjmuty z kovových kapslí a opět umístěny na led. Vytvořený hustotní precipitát byl separován gradientovým jímačem Piston Gradient Fractionator dle návodu k jeho obsluze. Celkově bylo získáno 9 frakcí o přibližném objemu 400  $\mu$ l.

#### 4.2.5. Western blot

Western blotting je obecně používaná analytická metoda k pozitivní identifikaci specifického proteinu v komplexní směsi a ke stanovení kvantitativních a semikvantitativních dat o proteinu zájmu. Specifická interakce protilátka-antigen umožňuje identifikaci jediného proteinu v heterogenní směsi bílkovin.

Proteiny jednotlivých frakcí byly rozděleny elektroforézou na 10 nebo 12 % polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS nebo-li SDS-PAGE elektroforézou dle Laemmliho. 40  $\mu$ l každé frakce bylo smícháno s 20  $\mu$ l SDS vzorkového pufru a denaturováno. Denurací proteinů dochází k porušení sekundární a terciární struktury proteinů. Tím je umožněna vazba molekuly SDS, a to v poměru 1 mg bílkoviny váže 1,4 mg SDS. Molekula SDS uděluje proteinům uniformní záporný náboj a ty se pak všechny pohybují k anodě, přičemž pohyblivost je dána velikostí molekuly. Separace proteinů trvala 50 minut při 240 mA a konstantním napětí 200 V. Rozdělené proteiny byly přeneseny na PVDF membránu a blokovány po dobu 1 hodiny v 5 % mléku v TBS s 0,05 % tweenem. Po blokaci byly

membrány inkubovány přes noc při 4 °C se specifickou protilátkou proti proteinovému raftovému markeru caveolinu-1 nebo flotillinu-1. Druhý den byly membrány 5 x promyty v TBS s 0,05 % tweenem a poté inkubovány 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s peroxidázou při pokojové teplotě. Po inkubaci se sekundární látkou byly membrány 6 x promyty v TBS s 0,05 % tweenem a 1x promyty v samotném TBS. Aktivita peroxidázy je vizualizovaná pomocí chemiluminiscenčního substrátu, který reakcí s enzymem jako vedlejší produkt reakce emituje světlo. Světelný výtěžek je zachycen použitím fotografického filmu s jeho následným vyvoláním.

#### **4.2.6. Dot blot**

Gangliosid GM1 je detekován pomocí metody dot blot. Jedná se o metodu detekční, analyzační a identifikační, která je podobná Western blotu. Jedinou odlišností je, že vzorky nejsou elektroforeticky rozděleny, ale nanесeny v podobě teček přímo na NC membránu, na které se pak provádí detekce pomocí primární a sekundární protilátky obdobně jako u Western blotu.

#### **4.2.7. Stříbření gelů po blotu**

Stříbření gelu je alternativní metodou zviditelnění rozdělených proteinů v gelu. Postup je založen na metodě vyvinuté Gottliebem a Chavkem. Proteiny v gelu byly fixovány roztokem metanolu, kyseliny octové a glycerolu. Po promytí byly gely ponořeny do roztoku, který obsahuje aminostříbrný komplex vázaný na koloidní wolframo-křemičitou kyselinu. Vyvíjení hnědočerného zbarvení bylo ukončeno pomocí kyseliny octové. Gely ve kterých nejsou proteiny fixovány je možné také použít pro Western-blot analýzu. Následně byly gely uloženy mezi dvě celofánové fólie. Fólie s gelem byly vypnuty na speciálním rámu a vysušeny do dalšího dne.

#### **4.2.8. Proteomická analýza**

Pozitivní frakce na raftový marker Flotillin-1 u infikovaných buněk monocytomakrofágové linie J774 byla analyzována pomocí nanoLC/MS/MS na hmotnostním spektrometru Q – TOF Ultima API Waters. Měření provedl Mgr. Juraj Lenčo na ÚMP FVZ UO dle standardních podmínek.



## 5. Výsledková část

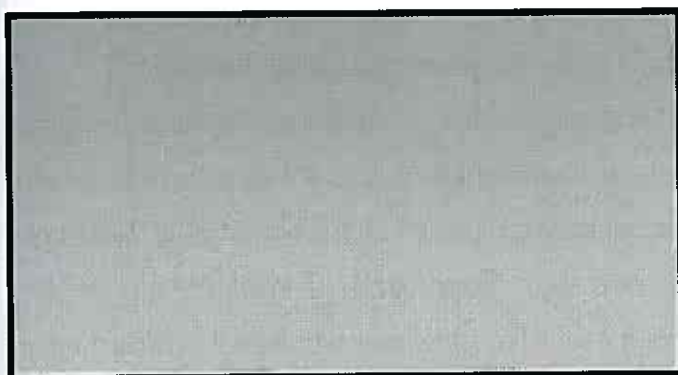
### 5.1. Experiment 1

Z monocyto-makrofágové buněčné linie J774 jsme izolovali lipidové rafty pomocí lyzování buněk v roztoku neionogenního detergentu NP-40. Buněčný lyzát byl rozdělen na sacharózovém hustotním gradientu. Celkem bylo získáno 9 frakcí. Tyto frakce byly analyzovány metodou Western blot. Jednotlivé frakce byly rozděleny na 12 %ním gelu za použití SDS-PAGE a následně podrobeny imunoanalýze na přítomnost proteinového lipidového markeru caveolinu-1 pomocí monoklonální protilátky specificky se vážající na tento protein. Celý pokus byl proveden duplicitně.

#### 5.1.1. Experiment 1/1. Caveolin-1, J774

##### Western blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9

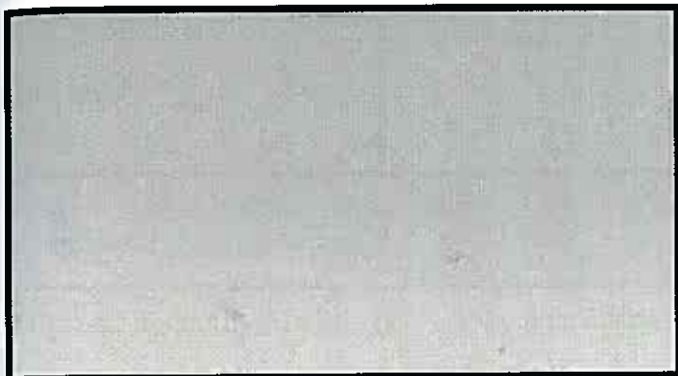


**Obr. 1.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru caveolinu-1. Přítomnost caveolinu-1 v buňkách J774 nebyla prokázána.

### 5.1.2. Experiment 1/2 Caveolin-1, J774

#### Western blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9



**Obr. 2.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru caveolinu-1. Přítomnost caveolinu-1 v buňkách J774 nebyla opět prokázána.

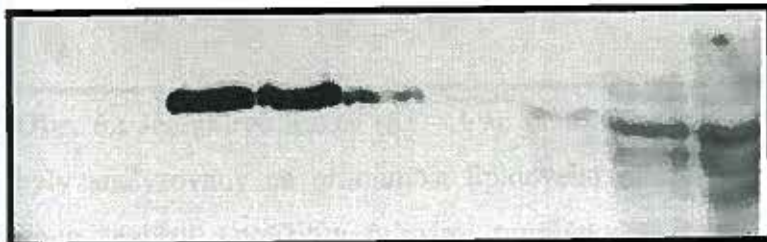
### 5.2. Experiment 2

Vzhledem k tomu, že se v experimentu 1 nezdařilo prokázat přítomnost proteinového raftového markeru caveolinu-1, byl pro analýzu v experimentu 2 zvolen jiný proteinový raftový marker, a to Flotillin-1. Experiment byl proveden za obdobných podmínek, přičemž pro SDS-PAGE byl použit 10 % gel, a pro imunoanalýzu byla použita protilátka specificky se vázající na Flotillin-1. Experiment byl opět proveden duplicitně. Rozdělené frakce sacharózového hustotního gradientu byly také podrobeny imunoanalýze metodou dot blot na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1. Pro imunoanalýzu byla v metodě dot blot jako primární protilátka použita B podjednotkou cholera-toxinu, která specificky váže právě tento gangliosid.

#### 5.2.1. Experiment 2/1, Flotillin-1, J774

##### Western blot

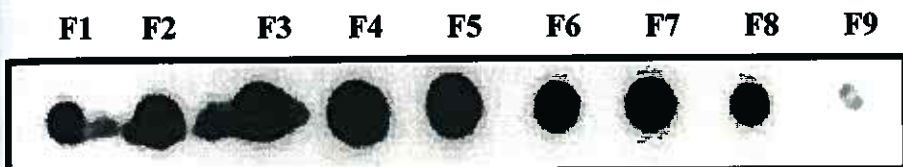
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9



**Obr. 3.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774

byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve frakcích s nižší hustotou, a to v F3, F4 a F5 s největším zastoupením v F3.

#### Dot blot

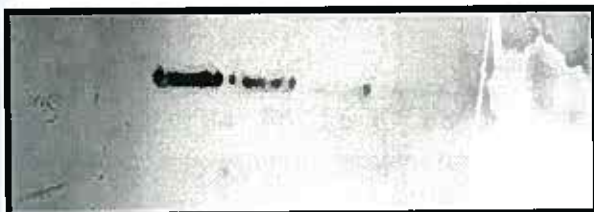


**Obr. 4.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774, byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v lehčích frakcích sacharózového gradientu, a to v F3, F4 a F5, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

#### **5.2.2. Experiment 2/2, Flotillin-1, J774**

#### Western blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9



**Obr. 5.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve frakcích s nižší hustotou, a to v F3 a F4 s největším zastoupením v F3.

#### Dot blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9



**Obr. 6.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774, byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v lehčích frakcích

sacharózového gradientu, a to v F3, F4 a F5, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

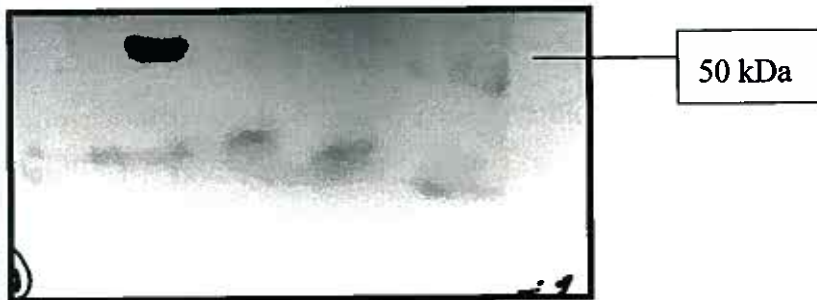
### 5.3. Experiment 3

Po izolaci lipidových raftů z neinfikovaných buněk linie J774, jsme provedli porovnávací analýzu lipidových raftů u buněk neinfikovaných a infikovaných bakteriálním patogenem *F. tularensis* LVS. Buňky monocyto-makrofágové linie J774 byly infikovány bakteriálním patogenem při MOI rovné 500, což odpovídá 500 CFU na jednu buňku J774, 2 hodiny při 37 °C v termostatu s 5 % CO<sub>2</sub>. Ověření MOI bylo provedeno vysetím bakteriální suspenze v ředění 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> a 10<sup>-8</sup> na McLeodův agar a následným počítáním CFU po 72 hodinové inkubaci při 37 °C v atmosféře s 5% CO<sub>2</sub>. Buněčná lýza, hustotní sacharózová gradientová centrifugace i rozdělení do frakcí s jejich následnou analýzou byly provedeny u infikovaných i neinfikovaných buněk stejně jako v experimentu 2 navíc s použitím hmotnostní proteinové standardy Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, pro potvrzení přibližné molekulové hmotnosti proteinu. Flotilin-1 je 48 kDa protein. Analýza byla opět provedena duplicitně.

#### 5.3.1. Experiment 3/1, Flotillin 1, kontrola (neinfikované buňky)

##### Western blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 st.



**Obr. 7.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu neinfikované monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve třetí frakci F3. Velikost a průkaz molekuly flotillin-1 byla potvrzena shodou se standardou.

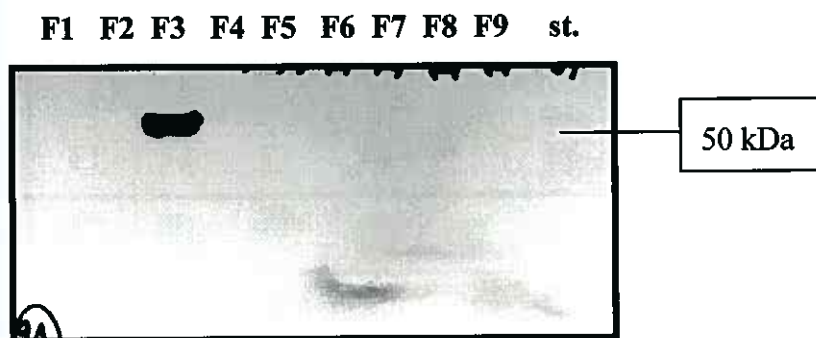
### Dot blot



**Obr. 8.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774, byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v F3 frakci, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

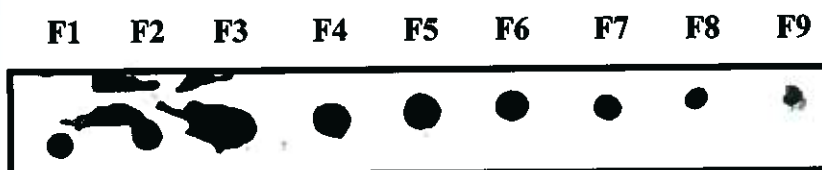
### **5.3.2. Experiment 3/1, Flotillin 1, infekce (infikované buňky)**

#### Western blot



**Obr. 9.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774 infikované patogenem *F. tularensis* LVS byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve třetí frakci F3. Velikost a průkaz molekuly flotillin-1 byla potvrzena shodou se standardou.

### Dot blot

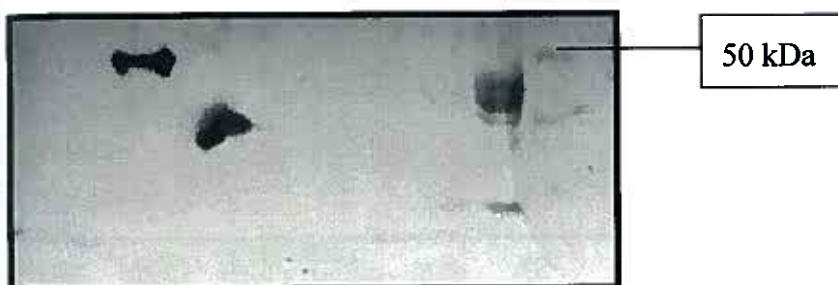


**Obr. 10.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774 infikované patogenem *F. tularensis* LVS, byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v F3 frakci, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

### 5.3.3. Experiment 3/2, Flotillin 1, kontrola (neinfikované buňky)

#### Western blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 st.



**Obr. 11.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu neinfikované monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve třetí frakci F3. Velikost a průkaz molekuly flotillin-1 byla potvrzena shodou se standardou.

#### Dot blot

F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9

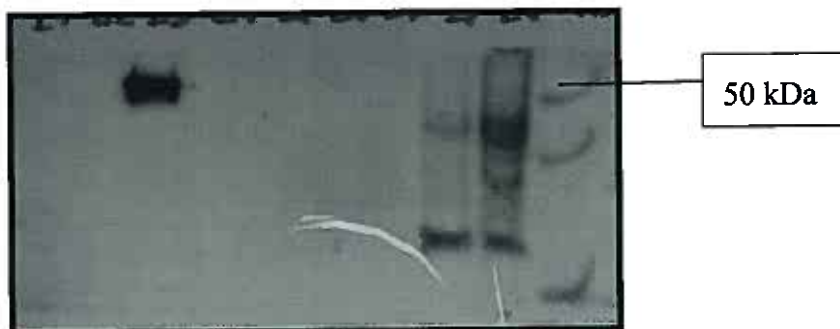


**Obr. 12.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v F3 frakci, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

### 5.3.4. Experiment 3/2, Flotillin 1, infekce (infikované buňky)

#### Western blot

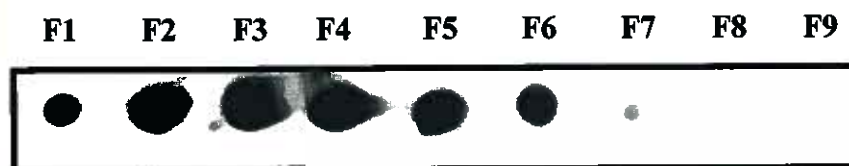
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9 st.



**Obr. 13.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9) buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774

infikované patogenem *F. tularensis* LVS byly analyzovány na přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1. Z western blot analýzy vyplývá, že proteinový raftový marker flotillin-1 je přítomen ve třetí frakci F3. Velikost a průkaz molekuly flotillin-1 byla potvrzena shodou se standardou.

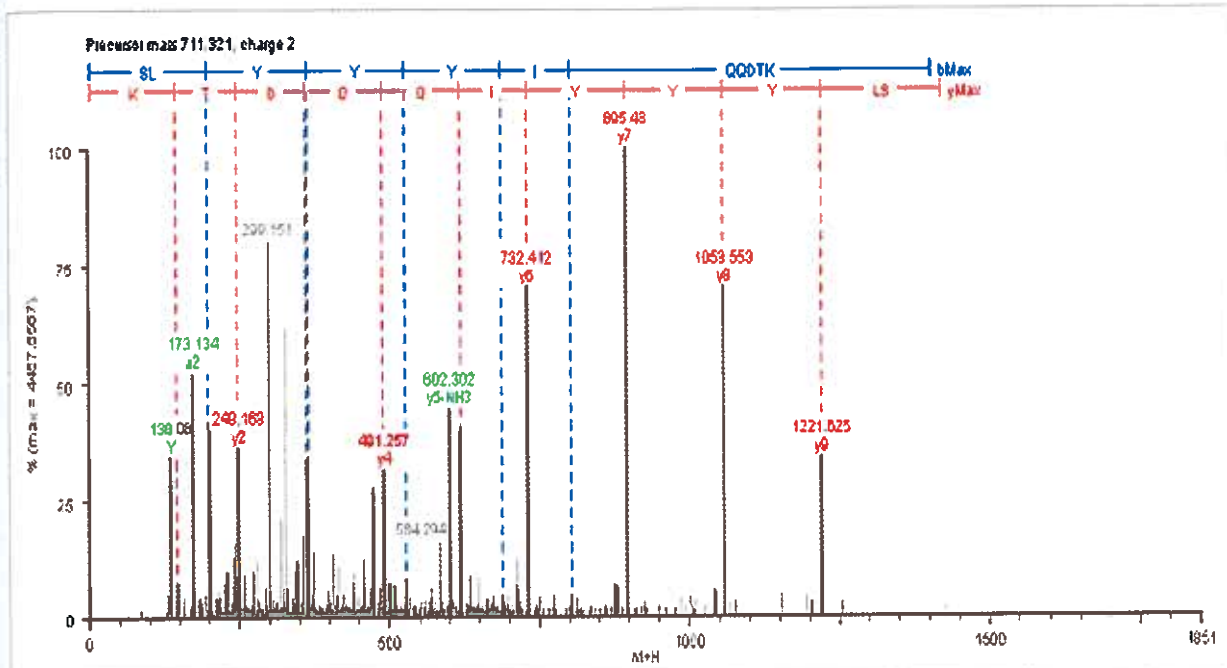
#### Dot blot



**Obr. 14.:** Jednotlivé frakce (F1 – F9), buněčného lyzátu monocyto-makrofágové linie J774 byly analyzovány na přítomnost lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 pomocí imunoanalýzy s použitím primární protilátky – B podjednotky cholera toxinu. Z dot blot analýzy je zřejmé, že nejvyšší koncentrace raftového markeru GM1 je v F3 frakci, což je v souladu s výsledky western blot analýzy.

#### **5.4. Proteomická analýza**

Frakce F3 infikovaných buněk z experimentu č.3 pozitivní na Flotillin-1 byla analyzována pomocí nanoLC/MS/MS. Výstupní program analyzátoru vydává výsledky s uvedením databázového názvu proteinu, jeho popisu, skóre, pravděpodobnosti shody, která udává pravděpodobnost shody sekvence aminokyselin se známou sekvencí aminokyselin daného proteinu. Funkce jednotlivých proteinů byla vyhledána v databázi Swiss-Prot (<http://www.expasy.org/sprot/>) a v NCBI. Jednotlivé proteiny byly rozděleny na základě funkčních charakteristik do skupin.



Obr. 15.: Příklad hmotnostního spektra proteinu Annexinu II

Tab. 3.: Souhrn proteinů detekovaných ve frakci F3 infikovaných buněk J774 z experimentu 3 identifikovaných pomocí nanoLC/MS/MS.

Název proteinu	Skóre	Pravděpo- dobnost shody [%]
<b>Annexin II Lipocortin II Calpactin I heavy chai</b>	<b>-4,159</b>	<b>0</b>
<b>Actin alpha skeletal muscle Alpha actin 1</b>	<b>-2,125</b>	<b>0</b>
<b>Myosin Ic Myosin I beta MM1b</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Myeloid-associated differentiation marker</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Cytochrome c oxidase polypeptide VA EC 1.93.1</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Cytochrome c oxidase polypeptide VA mitochondrial</b>	<b>-1,36</b>	<b>0</b>
<b>Brain acid soluble protein 1 BASP1 protein Neur</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>ATP binding cassette subfamily D member 3 70 k</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>4F2 cell surface antigen heavy chain 4F2hc</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>10.40S ribosomal protein S23</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>CD44 antigen precursor Phagocytic glycoprotein I</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Ras related protein RAP 2B</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Dolichyl diphosphooligosaccharide protein glycosy</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Acid sphingomyelinase like phosphodiesterase 3b pr</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Guanine nucleotide binding protein G k alpha sub</b>	<b>11,555</b>	<b>100,01965</b>
<b>Actin 100 Fragment</b>	<b>11,554</b>	<b>99,92203</b>
<b>Dolichyl diphosphooligosaccharide protein glycosy</b>	<b>11,554</b>	<b>99,92203</b>
<b>Tyrosin protein kinase HCK EC 2.7.1.112 P59 HC</b>	<b>10,818</b>	<b>47,849564</b>
<b>Monocyte differentiation antigen CD14 precursor L</b>	<b>10,888</b>	<b>51,33509</b>
<b>Erythrocyte band 7 integral membrane protein Stom</b>	<b>10,873</b>	<b>50,53921</b>
<b>L plastin Lymphocyte cytosolic protein 1 LCP1</b>	<b>10,862</b>	<b>49,999218</b>
<b>Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase EC 1.2.1</b>	<b>10,862</b>	<b>49,999218</b>



Název proteinu	Skóre	Pravděpo- dobnost shody [%]
Vacuolar ATP synthase subunit G 1 EC 3.6.3.14 V	10,862	49,999218
Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subun	10,862	49,999218
Vacuolar proton translocating ATPase 116 kDa subun	10,862	49,999218
Tyrosine protein kinase LYN EC 2.7.1.112	10,862	49,999218
Tyrosine protein kinase LYN EC 2.7.1.112	10,862	49,999218
Keratin type I cytoskeletal 10 Cytokeratin 10	10,427	32,34503
Keratin type I cytoskeletal 10 Cytokeratin 10	10,345	29,79764
Vacuolar ATP synthase subunit E EC 3.6.3.14 V A	10,463	33,535122
Vacuolar ATP synthase subunit B brain isoform EC	10,457	33,3392
60S ribosomal protein L7a Surfeit locus protein 3	10,457	33,3392
ATP synthase sloha chain mitochondrial precursor	10,457	33,3392
ADP ATP carrier protein fibroblast isoform ADP A	10,459	33,30666
ADP ATP carrier protein liver isoform T2 ADP A	-2,486	0
Voltage dependent anion selective channel protein	-2,478	0
Calpactin I light chain P10 protein P11 Cellu	10,137	24,201664
Gaunine nucleotide binding protein G i alpha 2 s	10,169	24,994305
Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A ubiquit	10,169	24,994305
Voltage dependent anion selective channel protein	9,781	16,96161
60S acidic ribosomal protein P0 I10E	9,933	19,752823
ATP synthase beta chain mitochondrial precursor	9,406	11,657534
Actin cytoplasmasmic 2 Gamma actin	-0,718	0
Calmodulin	9,157	9,087767

## 6. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo zavedení a optimalizace metody izolace lipidových raftů a přiblížení jejich významu pro interakci buněk monocyto-makrofágové linie J774 s intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* LVS způsobujícím tularémií. Pochopení mechanismů interakce je důležité vzhledem k vysoké patogenitě bakterie a nebezpečí jejího potencionálního zneužití jako biologické zbraně. O molekulárním mechanismu patogenního působení bakterie není zatím dostupných mnoho informací. Je však známo, že pohlcená bakterie po 3-4 hodinách uniká z endosomu do cytoplazmy (Santic a kol., 2005). Studium host-patogen interakcí je součástí rozsáhlejšího výzkumu UMP FVZ UO.

S přibývajícím poznatky o struktuře buněčných membrán se ukazuje, že její uspořádání neodpovídá zcela tzv. fluidně-mozaikovému modelu. Ve fosfolipidové dvojvrstvě buněčné membrány se nacházejí útvary nazývané lipidové rafty, které se od zbytku buněčné membrány liší svým složením a stupněm uspořádanosti. Oporou pro tuto teorii je izolace lipidových raftů.

Lipidové rafty jsou organizované struktury nacházející se uvnitř plazmatické membrány vyznačující se ojedinělým lipidovým a proteinovým složením. Nejčastější způsob izolace lipidových raftů je na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností za použití jemnějších neionogenních detergentů. V průběhu vývoje metody izolace lipidových raftů se zjistilo, že použitím různých druhů neionogenních detergentů na jednom typu buněk jsou získávány lipidové rafty různého složení. Odlišnosti v molekulárním složení izolovaných lipidových raftů se projevují jak v lipidové tak v proteinové složce. Odlišnosti složení jsou pozorovány i v závislosti na koncentraci použitého detergentu v extrakčním roztoku. Tyto důvody vedly ke sporům, zda vůbec lipidové rafty existují. (Schuck S., 2003) To, že lipidové rafty nejsou pouze arteficiálním produktem izolace použitím detergentů, dokazuje i jejich izolace bez použití detergentu pomocí uhličitanu sodného (Man a kol., 2005; Matousek a kol., 2003).

Membránové mikrodomény bohaté na sfingolipidy a cholesterol koncentrují signální molekuly jako např. G proteiny nebo tyrosin kinázy a zvyšují jejich funkční aktivitu. Ukazuje se, že tyto domény mají významnou roli v mnoha komplexních buněčných procesech, zahrnující mezibuněčnou komunikaci, buněčnou indukci či imunitní odpověď. Na základě toho je pravděpodobné a dokládají to i publikované studie, že tyto specializované části membrány jsou také důležitým místem, na které působí různé patogenní organismy při snaze kolonizovat hostitelské buňky (Duncan, M, 2002).

V našem případě byly lipidové rafty izolovány extrakcí 1 % neionogenním detergentem NP-40. Tento detergent je svými vlastnostmi ekvivalentní Tritonu X-100, který je považován za standardně používaný detergent k izolaci lipidových raftů (Man a kol., 2005), což bylo i experimentálně ověřeno.

Přítomnost lipidových raftů jsme se nejdříve pokusili prokázat přítomností klasického s rafty asociovaného proteinu caveolinu-1. Pomocí metody Western blot se tento marker nepodařilo prokázat ani v jedné z devíti frakcí buněčného lyzátu, rozděleného ultracentrifugací na sacharózovém hustotním gradientu (viz obr. 1 a obr.2). Po opakovaném provedení pokusu a negativním výsledku jsme našli práci publikovanou Gargalovicem a Dorym (2001), kteří ve své studii porovnávali přítomnost caveolinu-1 a caveolinu-2 v peritoneálních makrofázích, myší buněčné linii J774 a NIH/3T3 fibroblastů pomocí třech nezávislých metod. Z výsledků jejich studie vyplývá, že jediná forma caveolinu přítomná v myší buněčné linii J774 je caveolin-2. Tento fakt tedy koreloval s výsledky, které jsme získali ve své práci my.

Z důvodu neprokázání proteinového raftového markeru caveolinu-1 v myší buněčné linii J774 byl pro další experimenty zvolen jiný proteinový raftový marker, a to flotillin-1 (Dermine a kol., 2001). Při dodržení stejného postupu izolace lipidových raftů se metodou Western blot podařilo prokázat flotillin-1 pomocí monoklonální protilátky proti tomuto proteinu ve dvou frakcích sacharózového hustotního precipitátu s největším zastoupením třetí frakce (obr.3 a 5). V tomto pokusu bylo také provedeno potvrzení izolace membránových mikrodomén dot blot analýzou na přítomnost lipidového markeru gangliosidu GM1 (Man a kol., 2005; Magee a kol., 2002). Největší koncentrace lipidového markeru byla prokázána ve třetí, čtvrté a páté frakci (obr. 4 a 6), což je ve shodě s výsledky Western blot analýzy. V obou provedených analýzách byly pozitivní na raftové markery pouze lehčí frakce hustotního sacharózového gradientu, což je v souladu s teorií lipidových raftů (Simons, K., 2000, 2001). Na základě shody našich výsledků s již dříve provedenými experimenty jiných autorů je zřejmé, že metoda izolace lipidových raftů byla zavedena úspěšně.

Po úspěšné izolaci membránových mikrodomén u neinfikovaných buněk jsme přistoupili k izolaci lipidových raftů infikovaných buněk J774 *Francisellou tularensis* LVS. Buňky byly infikovány dle protokolu uvedeného v metodice (4.2.) experimentální části této práce.

Izolace lipidových raftů byla provedena za stejných podmínek jako v předcházejících pokusech. I v tomto pokusu byla prokázána přítomnost proteinového raftového markeru flotillinu-1 ve třetí frakci jak u neinfikovaných (obr.7 a 11) tak u infikovaných buněk (obr. 9 a

13). Z dot blot analýzy neinfikovaných (obr. 8 a 12) a infikovaných buněk (obr. 10 a 14) vyplývá, že největší intenzita skvrny odpovídající nejvyšší koncentraci lipidového raftového markeru gangliosidu GM1 je opět ve třetí frakci. Výsledky třetího experimentu opět potvrzují správnost našeho postupu izolace lipidových raftů.

Vzhledem k úspěšné izolaci lipidových raftů u neinfikovaných a infikovaných buněk pokusili jsme se určit, jak souvisí funkce lipidových raftů hostitelské buňky s infekcí *F. tularensis* LVS. Z důvodu časové tísně jsme ovšem nebyli zcela schopni najít odpověď na tuto otázku a zůstává tedy podnětem pro budoucí práci. Pokusili jsme se analyzovat proteiny třetí frakce pozitivní na flotillin-1 infikovaných buněk z experimentu 3 pomocí nanoLC/MS/MS analýzy. Výsledkem nanoLC/MS/MS analýzy bylo 44 identifikovaných proteinů, ze kterých byly vybrány proteiny, které by mohly mít vztah k buněčné signalizaci při infekci. Tyto proteiny byly rozděleny do funkčních skupin.

#### 1. Proteiny patřící do podjednotek vakuolární ATPázové protonové pumpy:

V-ATPáza je zodpovědná za okyselení různých intracelulárních kompartmentů u eukaryotních buněk. Katalyzují reakci:  $ATP + H_2O + H^+(\text{dovnitř}) = ADP + \text{fosfát} + H^+(\text{ven})$ . V-ATPáza je heteromultimerní enzym složený z periferního katalytického komplexu V1 (komentary A až H) připojený k integrálnímu membránovému V0 proton pórovému komplexu (komponenty: a, c, c', c" and d).

**Vakuolární ATP syntázová podjednotka G 1** je katalytická podjednotka periferního V1 komplexu vakuolární ATPázy.

**Vakuolární proton tanslokující ATPázová 116 kDa podjednotka a isoforma 1** je potřebná pro sestavení a aktivitu vakuolární ATPázy. Má možnou roli v diferenciacním namíření a regulaci enzymů pro specifické organely.

**Vakuolární proton tanslokující ATPázová 116 kDa podjednotka a isoforma 2** je částí protonového kanálu jímž jsou převáděny protony z jedné strany membrány na druhou.

**Vakuolární ATP syntázová podjednotka E** je podjednotka periferního V1 komplexu vakuolární ATP syntázy zásadní pro usprádaní a katalytickou funkci V-ATPázy.

**Vakuolární ATP syntáza podjednotka B**, mozková isoforma, je nekatalytická podjednotka periferního V1 komplexu vakuolární V-ATPázy.

#### 2. cytoskeletální proteiny

**Aktiny** jsou proteiny, které se účastní různých typů buněčných pohybů a jsou vyjádřeny ve všech eukaryotních buňkách. Polymerizace globulárního aktinu (G-aktinu) vede k tvorbě strukturálních filament (F-aktin) ve formě dvojkroucené helix. Každý aktin se může vázat ke čtyřem dalším. Je lokalizován v cytoplazmě. U obratlovců byly identifikovány 3

hlavní skupiny aktinových izoform – alfa, beta, gama. Alfa aktiny se nalézají ve svalové tkáni a jsou hlavním konstituentem kontraktálního aparátu. Beta a gama aktiny koexistují ve většině buněk jako komponenty cytoskeletu, a jako mediátory vnitřního buněčného pohybu.

### 3. Kalcium a fosfolipidy vázající protein

**Anexin A2** je kalciumem regulovaný, v membráně vázaný protein, jehož afinita pro kalcium je ovlivněna anionickými fosfolipidy. S vysokou afinitou váže 2 kalciové ionty. Je tvořen heterotetramerním proteinem (protein 1) obsahujícím 2 lehké řetězce S100A10/p11 a 2 těžké řetězce ANXA2/p36. V buňce je lokalizován ve vrstvě těsně pod plasmatickou membránou. Mohl by příčně vázat fosfolipidy plasmatické membrány s aktinem a cytoskeletem a být tak zapojen do exocytózy. Zprostředkovává mezimembránové interakce. Dle Burgera a kol. (1996) se kalcium-dependentním způsobem váže ke kyselým fosfolipidům a je substrátem některých protein-tyrozinkináz.

**Calmodulin** zprostředkovává kontrolu mnohých enzymů prostřednictvím  $\text{Ca}^{2+}$ . Mezi enzymy, které jsou stimulovány komplexem calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$ , patří mnohé proteinkinázy a fosfatázy. Protein obsahuje čtyři funkční vápník-vážící místa. Obsahuje čtyři EF-hand domény.

### 4. Antigen prezentující protein:

**Těžký řetězec 4F2 povrchového buněčného antigenu** je zapojen do normálního a neoplastického buněčného růstu. Stavebně je to heterodimer skládající se z 80-90 kDa glykosylovaného těžkého a 35-40 kDa neglykosylovaného lehkého řetězce, spojený disulfidickou vazbou. Je umístěn v membráně jako jednopřechodový membránový protein typu II, patřící do rodiny inducibilních povrchových molekul účastnících se T-lymfocytárního růstu a aktivace. Podle Teixeira a kol. (1987) je tento antigen vyjádřen na proliferujících buňkách, ale pouze v resting buňkách některých tkání. Jeho funkce byla navržena aby fungovala ve vztahu k  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  výměně.

### 5. Kanálové a transportní proteiny:

**ATP syntázový alfa řetězec** produkuje ATP z ADP v přítomnosti protonového gradientu přes membránu. Katalyzuje reakci:  $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}^+(\text{dovnitř}) = \text{ADP} + \text{fosfát} + \text{H}^+(\text{ven})$ . Alfa řetězec je regulační podjednotka. ATP syntáza F-typu má 2 složky, CF(1)-katalytické jádro – a CF(0)-membránový protonový kanál. CF(1) se skládá z pěti podjednotek: alfa(3), beta(3), gama(1), delta(1), epsilon(1). CF(0) se skládá z tří hlavních podjednotek: a, b a c. V buňce je lokalizována na vnitřní mitochondriální membráně..

**ADP/ATP translokáza 2** katalyzuje výměnu ADP za ATP přes vnitřní mitochondriální membránu. Je to homodimerní protein, lokalizovaný ve vnitřní

mitochondriální membráně, kterou několikrát prochází. Transmembránové spirály nejsou kolmé k ploše membrány, ale prochází skrz membránu pod určitým úhlem. Jednotlivé transmembránové šroubovice vykazují ostré smyčky, díky přítomnosti uzavřených prolinových zbytků. ADP/ATP přenašeč jsou regulovány v průběhu růstu. Exprese se zvyšuje jsou-li klidové buňky stimulovány sérem, z destiček-odvozeným růstovým faktorem nebo epidermálním růstovým faktorem, ale ne na destičky chudou plazmou nebo insulinem (Battini a kol. 1987).

**Napětově řízený anion-selektivní kanálový protein 2** tvoří kanál skrz vnější mitochondriální membránu, který umožňuje difúzi malých hydrofilních molekul. Kanál přijímá otevřenou konformaci při nízkém nebo nulovém membránovém potenciálu a zavřenou konformaci při potenciálech nad 30-40 mV. Otevřený stav má slabou aniontovou selektivitu, zatímco zavřený stav je kationtově-selektivní. Interaguje s hexokinázami. Je lokalizován na vnější mitochondriální membráně. Obsahuje hlavně v membráně do stran položené beta-skládané listy. Patří do eukaryotní mitochondriální porinové rodiny.

#### 6. Receptory:

**Monocytární diferenciační antigen CD14** patří do skupiny na membráně lokalizovaných lipolysacharidových receptorů, kotvených do membrány lipidovou kotvou. Je to multi-proteinový komplex, obsahující CD14, MD-2 a TLR4 se kterými spolupracuje při zprostředkování vrozené imunitní odpovědi na bakteriální lipopolysacharidy. Vystupuje skrz MyD88, TIRAP a TRAF6, vedouce k NF- $\kappa$ -B aktivaci, sekreci cytokinů a zánětlivé odpovědi. Up-reguluje buněčné povrchové molekuly, zahrnujíc molekuly adhezivní.

**CD44** je hlavním buněčným povrchovým receptorem pro hyaluronát, zprostředkovávající adhezi k endoteliálním buňkám vén a kolagenům typu I a VI. Pravděpodobně se účastní adheze na matrix, lymfocytární aktivaci a jejich zacílení na lymfatické uzliny. Je to jednopřechodný membránový protein typu I. Bylo popsáno 13 sestříhových izoform. Je N-glykosylovaný, O-glykocylovaný a fosforylovaný. Aktivace PKC vede k defosforylaci Ser742 (konstitutivní fosforylační místo) a fosforylaci Ser708. Byly popsány dvě alelycké formy tohoto glykoproteinu, PGP-1.1 a PGP-1.2. Vyjádřeným produktem je PGP-1.1 (Ly-24.1). Obsahuje jednu spojovací doménu. Je 95 kDa glykoproteinem, důležitým T buněčným a leukocytárním diferenciačním markerem (Zhou a kol., 1989)

#### 7. Proteinové kinázy:

**Tyrosinová proteinkináza HCK** by mohla sloužit jako část signální cesty spojující Fc receptor k aktivaci respiračního vzplanutí. Mohla by také přispívat k migraci neutrofilů a

regulovat jejich degranulaci. Katalyzuje reakci:  $ATP + a(\text{protein})\text{-L-tyrosin} = ADP + a(\text{protein})\text{-L-tyrosinfosfát}$ . Mohly by se vázat k HIV-1 Nef a VIF skrz jejich SH3 doménu. Tato interakce by mohla stimulovat jejich tyrosin-kinázovou aktivitu. Isoforma p60-HCK a isoforma p59-HCK jsou asociovány s membránami, isoforma p60-HCK je současně také cytoplazmatická. Alternativní spuštění, p60-HCK a isoforma p59-HCK jsou produkovány alternativním spuštěním. Jsou exprimovány převážně v buňkách myeloidní a B-lymfocytární řady.

**Tyrozínová protein kináza Lyn** katalyzuje reakci:  $ATP + a(\text{protein})\text{-L-tyrosin} = ADP + a(\text{protein})\text{-L-tyrosinfosfát}$ . Interaguje s fosforilovaným LIME1 po BCR aktivaci. Byly popsány dvě izoformy proteinu, vznikající na základě alternativního sestřihu - LYN A a LYN B. Vyjádřena je hlavně v B-lymfoidních a myeloidních buňkách. Patří do Tyr proteinkinázové rodiny.

#### 8. G proteiny:

**Guanin-nukleotid vázící proteiny (G proteiny)** se účastní jako modulátory nebo přenašeče různých transmembránových signálních systémů. G(k) je stimulační G protein receptorově regulovaných  $K^+$  kanálů složený ze tří podjednotek, alfa, beta, gama. Alfa řetězec obsahuje místo vázící guaninnukleotid. Guanin nukleotid-vázící regulační proteiny, známé jako G-proteiny jsou s receptory-asociované signál-přenášející molekuly, jenž se účastní na kontrole mnohých metabolických procesů. Mohly by zprostředkovávat B-lymfocytární odpověď na bakteriální lipopolysacharidy, a také by mohly přenášet signály z T-buněčných antigenních receptorů. (Beals a kol., 1987).

#### 9. Malé G proteiny:

**Ras-příbuzný protein Rap-2b** je lokalizován v buněčné membráně, má potencionální lipidovou kotvu na cytoplazmatické straně. Je to protein o Mr 22 000, specificky vázící GTP (Ohmstede a kol., 1990).

## 7. Závěr

V průběhu mé diplomové práce se podařilo vyvinout metodu izolace lipidových raftů u buněk monocyto-makrofágové linie J774, a to jak neinfikovaných, tak infikovaných bakterií *Francisella tularensis* LVS. Provedená proteomická analýza frakce F3 pozitivní na proteinový raftový marker flotillin-1 je pouze prvním pokusem tohoto druhu na pracovišti UMP FVZ UO. V průběhu naší práce jsme se potýkali s problémy jako je hydrofobicita membránových proteinů a především nemalou komplikací je v tomto případě roztok sacharózy, v kterém se proteiny nacházejí. V budoucnu je tedy třeba tuto metodu optimalizovat, aby bylo možné zidentifikovat větší množství proteinů a najít jejich potencionální vztah k infekci patogenní bakterie *Francisella tularensis* LVS.



## 8. Literatura

Battini R, Ferrari S, Kaczmarek L, Calabretta B, Chen ST, Baserga R. Molecular cloning of a cDNA for a human ADP/ATP carrier which is growth-regulated. *J Biol Chem.* 1987 Mar 25;262(9):4355-9.

Beals CR, Wilson CB, Perlmutter RM.: A small multigene family encodes Gi signal-transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(22):7886-90.

Burger A, Berendes R, Liemann S, Benz J, Hofmann A, Gottig P, Huber R, Gerke V, Thiel C, Romisch J, Weber K.: The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J Mol Biol.* 1996;vol. 257., č. 4, 839-47.

Cavaillon, J.M., Adib – Conquy, M.: The proinflammatory cytokine cascade - *Immune response in the critically ill – Update in intensive care medicine* 2002, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 37 – 66

Chazal, N., Gerlier, D.: Virus Entry, Assembly, Budding, and Membrane Rafts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; vol. 67, č. 2, 226 – 237

Clemens, D.L. a kol.: Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Inf. Imunn.* 2004; vol. 72, č. 6, 3204 – 3217

Collazo, C.M. and Galan, J.E.: The invasion associated type – III. protein secretion system in *Salmonella* – review. *Gene.* 1997; 192: 83 – 90.

Conlan J. Wayne: Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future, *Expert Rev. Future vaccines* 2004; 3, 89-96

Černý Z.: Tularémie – historie, epidemiologie, klinika, diagnostika a léčba. *Časopis lékařů českých* 2002; 9, 270-275

Dennis TD, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Layton M, Lillibridge SR, McDade JE, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl MT, Russell PK, Tonat K: Tularemia as a Biological Weapon. *The Journal of American Medical Association* 2001; vol. 285, č. 21, 2763-2773

Dermine J.-F., Duclos S., Garin J, St-Louis F., Rea S., Prton R.G., Desjardins M.: Flotillin-1-enriched lipid raft domain acumulate on maturing phagosome. *J. of Biol. Chem.* 2001; vol. 276, no. 21, 18507-18512

Dráber, P., Dráberová L.: Lipid rafts in mast cell signalling. *Mol. Immunol.* 2001; 38, 492 – 496

Duncan M. J., Shin J.-S. and Abraham S. N. : Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cellular Microbiology* 2002; vol. 4, č. 12, 783–791

Fortier, A. H. a kol.: Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: Identification of cytokines, effector cell, and effector molecules. *Inf. Immun.* 1992; vol. 60, č. 3, 817 – 825

Garalovic P., Dory L.: Caveolin-1 and Caveolin-2 Expression in Mouse Macrophages. *J. of Biol. Chem.* 2001; vol. 276, č. 28, 26164 - 16170

Gulbins E., Drescher S., Wilker B., Grassmé H. : Ceramide, membrane rafts and infections. *J. Mol. Med.* 2004; 82, 357 – 363

Hořejší, V.: Lipid rafts and their role in T cell activation. *Microbes and Infection.* 2005; 7, 310 – 316

[http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alim\\_2005\\_1\\_deklas\\_rev2\\_pdf](http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/studie/alim_2005_1_deklas_rev2_pdf)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SiteContent/MedRef/OnlineRef/FieldManuals/medman/Tularemia.htm>

Laboratory Handbook Sigma-Aldrich, Fundamental Techniques in Cell Culture, 2001

Lai, C. E. : Lipid rafts make for slippery platforms. *The Journal of Cell Biology*. 2003; vol. 162, č. 3, 365 – 370

Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS, Nano FE, Arulanandam BP, Hassett DJ, Klose KE: MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; vol. 101, č.12, 4246-9

Man P, Novák P, Cebecauer M, Horvát O, Fišerová A, Havlíček V. Bezouška K: Mass spectrometric analysis of the glycosphingolipid – enriched microdomains of rat natural killer cells. *Proteomics*. 2005; 5, 113 – 122

Matoušek P., Hodný Z., Švandová I. and Svoboda P.: Different methods of membrane domains isolation result in similar 2-D distribution patterns of membrane domain proteins. *Biochem. Cell Biol.* 2003; 81(6): 365–372

Magee T., Ppirinen N., Adler J., Pagakis S. N., Parmryd I.: Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. *Biol Res* 2002; 35, 127-131

Norkin, L.C., Wolfrom, S.A., and Stuart, E. S.: Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp. Cell. Res.* 2001; 266: 229 - 238

Ohmstede CA, Farrell FX, Reep BR, Clemetson KJ, Lapetina EG. RAP2B: a RAS-related GTP-binding protein from platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; vol. 87, č. 17, 6527-31.

Pike, L.J.: Lipid rafts : heterogeneity on the high seas. *Biochem J*. 2004; 378, 281 – 292

Quiagen News, 1, 2002, str. 25-28

Quiagen News, 3, 2002, str. 20

Rajendran, L and Simons, K.: Lipid rafts and membrane dynamics. *J. of Cell Science*. 2005; 118, 1099 – 1102

Rosenberger C. M., Brumell J. H. and Finlay B. B.: Microbial pathogenesis: Lipid rafts as pathogen portals. *Current Biology* 2000; 10 R823–R825

Santos Mañes, Gustavo del Real and Carlos Martínez-A.: Pathogens: Raft Hijackers. *Nature Reviews Immunology* 2003; vol. 3, 557 – 568

Santic M., Molmeret M., Klose K. E., Jones S, Abu Kwaik Y.: The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein Iglc and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell. Microbiology* 2005; vol. 7, č. 7, 969 – 979

Santic M, Molmeret M, Klose KE, Abu Kwaik Y.: *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol.* 2006; vol: 14, č. 1, 37 - 44

Schuck S., Honscho M., Ekroos K., Schevchenko A., Simons K.: Resistance of cell membranes to different detergents. *Cell Biology* 2003; vol. 100, č. 10, 5795-5800

Sjösted, A., Tärnvik, A., Sandström, G.: *Francisella tularensis*: Host – parasite interaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 1996; 13, 181 – 184

Sjöstedt A.: Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*, *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6, 66-71

Sjösted, A.: Intracellular survival mechanism of *Francisella tularensis*, stealth pathogen. *Microbes and Infection. Review* 2005; 1 – 7

Simons, K., Toomre, D.: Lipid rafts and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 1, 31 – 41

Simons, K., Ehehalt R.: Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 2002; 110, 597 – 603

Tärnvik A.: Nature of protective immunity to *Francisella tularensis*. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 11, 440 – 551

Tärnvik A., Berglund L.: Tularaemia. *Eur. Respir. J.* 2003; 21, 361–373

Teixeira S, Di Grandi S, Kuhn LC.: Primary structure of the human 4F2 antigen heavy chain predicts a transmembrane protein with a cytoplasmic NH<sub>2</sub> terminus. *J Biol Chem.* 1987 Jul 15;262(20):9574-80.

Telepnev, M. a kol.: *Francisella tularensis* inhibits Toll – like – receptor mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF and IL – 1 from murine macrophages. *Cell Microbial.* 2003; vol. 5, č. 1, 41 – 51

Zhou DF, Ding JF, Picker LJ, Bargatze RF, Butcher EC, Goeddel DV: Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol.* 1989 Nov 15;143(10):3390-5.