

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd



Proteomová analýza stresem indukovaných
proteinů bakterie *Francisella tularensis* LVS
(Diplomová práce)

Hradec Králové, 2006

Lukáš Kučera

Poděkování

Mé poděkování patří panu PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za umožnění vypracování mé diplomové práce na Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové, Univerzita obrany, dále mému školiteli Mgr. Juraji Lenčovi za vedení a pomoc při vzniku této práce a všem pracovníkům, kteří mi pomáhali po stránce praktické, jmenovitě laborantkám Jitce Žákové, Aleně Fyrichové a Janě Michaličkové.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Cíl práce	2
2	Teoretická část	4
2.1	Bakterie <i>Francisella tularensis</i>	5
2.1.1	Charakteristika	5
2.1.2	Taxonomie	5
2.1.3	Epidemiologie	6
2.1.4	Onemocnění tularémie	6
2.1.4.1	Klinické formy tularémie	6
2.1.4.2	Diagnostika	7
2.1.4.3	Léčba	8
2.1.4.4	Vakcinace	8
2.1.5	Molekulární mechanismy virulence u <i>F. tularensis</i>	10
2.2	Stresové odpovědi a metody jejich analýzy	11
2.2.1	Dvojměrná gelová polyakrylamidová elektroforéza	12
2.2.1.1	Isoelektrická fokusace–separace v prvním směru	12
2.2.1.2	Ekvilibrace fokusovaných proužků	14
2.2.1.3	Elektroforéza na polyakrylamidových gelech–separace v druhém směru	14
2.2.1.4	Detekce separovaných proteinů v gelech	15
2.2.1.5	Digitalizace gelů	15
3	Experimentální část	17
3.1	Materiál	18
3.1.1	Biologický materiál	18
3.1.2	Přístroje a pomůcky	18
3.1.3	Chemikálie, reagenty	19
3.1.4	Roztoky	22
3.1.5	Software	28
3.2	Kultivace bakterií	28
3.3	Zpracování vzorků	29
3.4	Přesrážení bílkovin	29
3.5	Měření koncentrace bílkoviny	30
3.6	2-D PAGE	31
3.6.1	Pracovní postup	31
3.6.1.1	Pasivní in gel rehydratace a isoelektrická fokusace	31
3.6.1.2	Lití polyakrylamidových gelů	32
3.6.1.3	Ekvilibrace IPG-proužků	32
3.6.1.4	Přenesení a zotvení ekvilibrovaných IPG-proužků do polyakrylamidového gelu	33
3.6.1.5	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu na přístroji PROTEAN II Multi-Cell	33
3.6.1.6	Barvení gelů pomocí stříbrění	33
3.6.1.7	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu na přístroji PROTEAN Plus Dodeca Cell	34
3.6.1.8	Barvení gelů pomocí Colloidal Blue Staining KIT	34

3.7	Digitalizace gelů	35
3.8	Srovnávací analýza pomocí softwaru	35
3.9	Příprava proteinových skvrn pro identifikaci pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru.....	35
3.10	Vlastní MALDI-TOF analýza	36
3.11	Vyhodnocování spekter	37
4	Výsledky	39
5	Diskuse	46
6	Závěr	49
7	Literatura	51

Použité zkratky

2D-PAGE	dvojměrná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (2-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný
BCA	kyselina bicinchonová
BIS	bisakrylamid
CFU	kolonii tvořící jednotka (Colony forming unit)
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamonio]-1-propansulfonát
DHB	kyselina 2,5-dihydroxybenzoová
DOCH	deoxycholát sodný
DTT	dithithreitol
FDA	úřad pro léčiva a potraviny (Food and Drug Administration)
IEF	isoelektrická fokusace
IPG	ukotvený pH gradient (Immobilized pH Gradient)
LPS	lipopolysacharid
LVS	živý vakcinační kmen (Live Vaccine Strain)
MALDI-TOF MS	matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem -čas letu (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)
NDS	kyselina 2,7-dinaftalensírová
O.D.	optická densita
PDA	1,4-bis(akryloyl)piperazin
PBS	pufrovaný fyziologický roztok
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného

TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRIS-HCl	hydrochlorid tris(hydroxymethyl)aminomethanu

1 Úvod

Studium patogeneze bakteriálních infekcí v současné době patří mezi oblasti biomedicínského výzkumu, kterým je věnována značná pozornost. Tento stav je způsoben především stále se rozšiřující rezistencí na antibiotika a antimikrobiální chemoterapeutika. V druhé řadě se tak děje v důsledku reálné hrozby zneužití virulentních bakteriálních kmenů jako teroristických prostředků. Tento trend je pozorovatelný v posledních několika letech zejména ve vyspělých státech západního světa.

Poznatky o molekulární patogenezi infekčních chorob mohou vést k objevu nových, molekulárních farmakologických cílů nebo ke konstrukci nových, účinnějších a bezpečnějších vakcín. Významným zdrojem informací o molekulární patogenezi bakteriálních infekcí je mimo jiné studium reakcí bakterie na prostředí, se kterým se setkává v průběhu interakce s hostitelským organismem. Z pohledu hostitelských organismů se evoluce této interakce nesla ve znamení neustálého zdokonalování strategií, jak se účinně bránit vzniku bakteriální infekce, nebo strategií, které účinně vedou k eliminaci infekce. Na straně mikroorganismů docházelo ke zdokonalování nástrojů, jak zmiňované mechanismy obejít nebo jejich účinky přežít. Studium reakcí patogenních mikroorganismů na stresové faktory, které tvoří podstatu zmiňovaných strategií hostitele, nám tak umožňuje identifikovat molekuly, které jsou pro patogenezi choroby stěžejní.

Nástup proteomických technologií poskytl ideální nástroj pro sledování změn v genové expresi na proteinové úrovni v důsledku působení nejrůznějších faktorů. Jejich postupné zdokonalování a vývoj v dnešní době umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu až tisíců proteinů v jednom plně automatizovaném procesu.

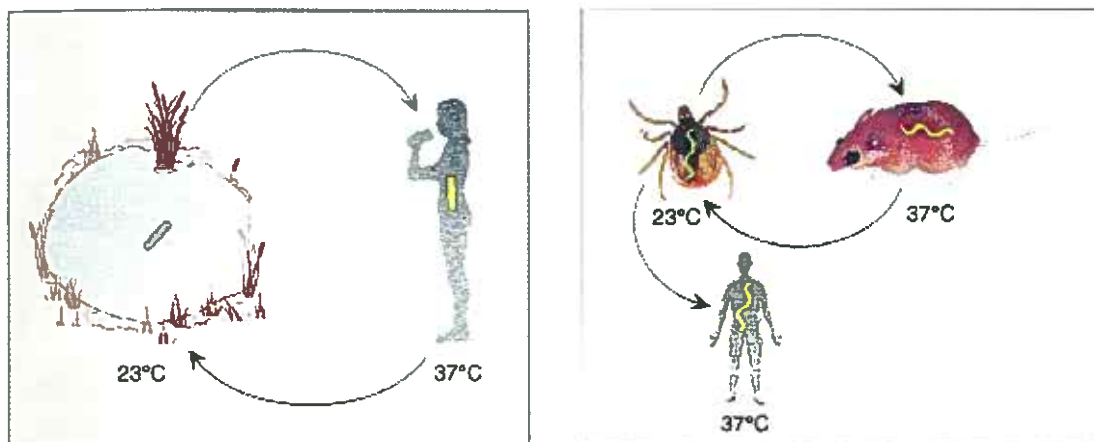
1.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo pomocí klasických proteomických metod zjistit, jak bakterie *F. tularensis* LVS/m reaguje na působení různých teplot na proteinové úrovni. Zvýšená exprese stresových proteinů, které představují faktory virulence, byla již dříve zjištěna a sledována u jiných bakterií, např. u druhů *Yersinia pestis* a *Borrelia burgdorferi*, které stejně jako bakterie

F. tularensis mají podobný přírodní rezervoár. Změnou teplotních podmínek jsem simuloval různá prostředí, ve kterých se bakterie *F. tularensis* během svého životního cyklu vyskytuje (viz obrázek 1). Teplota 25°C imitovala teplotu členovců jakožto vektorů a venkovního prostředí, např. vodních ploch, teplotou 37°C jsem napodoboval tělesnou teplotu hlodavců a teplota 42°C měla simulovat teplotu během respiračního vzplanutí v makrofágu u lidského hostitele.

Mým cílem bylo především sledovat, které ze známých faktorů virulence jeví zvýšenou expresi a doplnit tak sérii pokusů, které mapovali stresové odpovědi u bakterie *F. tularensis* působením peroxidu vodíku nebo nedostatku železa.

Obrázek 1; životní cyklus některých patogenních bakterií



Dílčím cílem práce bylo také zavést na Ústavu molekulární patologie do rutinní praxe přístroj pro elektroforézu PROTEAN Plus Dodeca Cell a pokusit se o optimalizaci procesu.

2 Teoretická část

2.1 Bakterie *Francisella tularensis*

2.1.1 Charakteristika

Francisella tularensis je gram-negativní, fakultativně intracelulární bakterie způsobující zoonózu tularémií. Jedná se o nepohyblivou, malou (0,1-0,5 µm), kokoidní bakterii. Je striktně aerobní, nesporulující, bez známek produkce toxinů [1]. Je schopná dlouhodobě přežít ve vnějším prostředí a v přírodě je široce rozšířená [2].

Bakterie byla poprvé izolována v roce 1911 G. W. McCoyem, který ji pojmenoval *Bacterium tularense* podle místa nálezu Tulare Country v centrální Kalifornii [3,4]. První popsání případy tularémie u lidí byly zaznamenány roku 1914 Wherrym a Lambem v Ohio u pacientů, kteří přišli do kontaktu s nemocnými zajíci [5]. Mikroorganismus byl později pojmenován podle E. Francise, který onemocnění a jeho původce zkoumal na lidských pacientech v roce 1919 v Utahu [2].

V období studené války zařadili Spojené státy americké stejně tak jako bývalý Sovětský svaz *F. tularensis* mezi svůj stálý biologický vojenský arsenál [6]. Také v dnešní době je na *F. tularensis* pohlíženo především z bezpečnostního hlediska. Po útocích z 11. září 2001 si západní země uvědomují nebezpečí možného teroristického zneužití této bakterie. Největší důraz je proto dnes kladen na porozumění mechanismu virulence, na hledání možností bezpečné vakcinace a způsobu zamezení šíření onemocnění [7,8,9].

2.1.2 Taxonomie

Dnešní všeobecně akceptovaný taxonomický konsensus popisuje čtyři subtypy: *F. tularensis* subtyp *tularensis* (typ A), *F. tularensis* subtyp *holarctica* (typ B, dříve označována jako *palaeartica*), dále subtyp *mediasiatica* a subtyp *novicida*. Virulence jednotlivých subtypů je velice rozdílná. Nejvíce virulentní je *F. tularensis* subtyp *tularensis*. Bez léčby dosahuje mortalita u

lidí až 30%. *F. tularensis* subtyp *holarctica*, je méně virulentní než typ A, a onemocnění nepředstavuje výrazný klinický problém.

2.1.3 Epidemiologie

Původce tularémie se vyskytuje na severní polokouli, hlášeny byly však i ojedinělé případy z Austrálie [10]. V Evropě jsou častou oblastí výskytu země bývalého Sovětského Svazu a Skandinávie. Výskyt jednotlivých subtypů vykazuje geografickou rozdílnost. Subtyp *tularensis* se například vyskytuje převážně v Severní Americe. Subtyp *holarctica* je naproti tomu častý v Evropě a Asii. Subtyp *mediasiatica* se vyskytuje převážně v centrální Asii [2,11]. V České republice není výskyt tularémie příliš častý. Podle údajů Národního referenčního centra pro analýzu epidemiologických dat během let 1994-2003 incidence onemocnění na našem území kolísala mezi 30 až 225 případy ročně. Původcem onemocnění na území České republiky je výhradně méně virulentní subtyp *holarctica*. Z těchto důvodů u nás onemocnění nepředstavuje závažnější klinický problém.

Bakterie *F. tularensis* je v přírodě značně rozšířena. Ukazuje se, že bakterie dokáže přežít ve vodě a bahně po dlouhé měsíce [2]. Jako potenciální zdroj jsou v podezření vodní améby, ve kterých *F. tularensis* úspěšně přežívá, jak dokazují výsledky některých studií [11,12]. Člověk se nejčastěji nakazí kontaktem s volně žijící divokou zvěří, kontaminovanou vodou a potravou a v neposlední řadě pomocí bezobratlých vektorů např. klíšťaty a komáry. Časté jsou i profesionální nákazy [2]. Bakterie může do lidského organismu prostoupit i neporušenou kůží.

2.1.4 Onemocnění tularémie

2.1.4.1 Klinické formy tularémie

Dle místa a způsobu průniku bakterie *F. tularensis* do lidského organismu dochází s různou závažností k rozdílným klinickým manifestacím. Inkubační doba je nejčastěji 3 – 6 dnů [13]. Vedle nespecifických příznaků se

objevuje tzv. „primární komplex“. Jedná se o ulceraci v místě vstupu bakterie do organismu a regionální lymfadenitidu.

Nejčastější formou onemocnění je ulceroglandulární forma. Dochází k ní po kousnutí infikovaným klíštětem nebo manipulací z lovnou zvěří. O glandulární formě hovoříme, pokud chybí ulcerace za přítomnosti lymfadenitidy. Okuloglandulární forma se vyskytuje po kontaktu oka s infikovaným materiálem. Dochází při ní k ulceraci spojivky a zvětšení regionálních mízních uzlin. Orofaryngeální forma je důsledkem požití kontaminované vody nebo potravy, taktéž inhalace aerosolu. Vzniká tonzilitida, faryngitida, někdy se vyskytuje ulcerace. Při gastrointestinální formě vzniká v závislosti na infekční dávce mírný perzistující průjem až akutní smrtelné onemocnění v důsledku ulcerace střešní stěny v místě Payerových plaků. Respiratorní forma je důsledkem inhalace aerosolu s obsahem bakterie *F. tularensis*. Tato forma, není-li léčena, je charakterizovaná vysokou mortalitou. Uvádí se, že inhalace již 10 CFU může vyvolat smrt organismu. Primární komplex se vyvíjí v dolních cestách dýchacích. Symptomaticky se projevuje jako pneumonie, dyspnoe, častý je dráždivý kašel a bolest na hrudi. Tularemická sepse probíhá prudce a často letálně. Projevuje se nespecificky horečkou, průjmem, zvracením, zmateností až komatem. Bez včasné léčby dochází k septickému šoku, systémové zánětlivé odpovědi, intravaskulární koagulaci a krvácením do tkání, respirační tísní a orgánovému selhání [2,8].

2.1.4.2 Diagnostika

Nejstarší metodou je kultivační průkaz bakterie. Na vhodných půdách lze kolonie pozorovat za 24 až 72 hodin [1,14]. Obvykle se používají čokoládový agar, cysteinový srdeční agar nebo pufovaný extrakt ze zuhelnatělých kvasinek a agar z beraní krve.

Nejběžnější laboratorní metodu v diagnostice tularémie je sérologické vyšetření. Hladina specifických protilátek je však detekovatelná často až za dva týdny po nákaze [15]. Metodou ELISA se může dále stanovit přítomnost LPS nebo glykoproteinové frakce membrán. [16,17]. Imunofluorescenčním

značením je možno dokázat přítomnost *F. tularensis* během několika hodin [2].

Klinicky pořád ještě málo využívanou, ale velice spolehlivou a rychlou metodu představuje PCR. Při použití gelové PCR se detekuje přítomnost genů kódujících proteiny vnější membrány *fopA* a *tul4* [17,18,19]. Ještě vyšší citlivost vykazuje real-time PCR [20].

Potřebujeme-li přesně určit subtyp *F. tularensis*, lze využít techniky jako restriction fragment linked polymorphism (RFLP), southern blot, pulse-field gel electrophoresis (PFGE) nebo multi-locus variable tandem repeat assays (MLVA) [21,22,23]. Při větším množství materiálu lze dále využít proteomické metody 2D-PAGE, SELDI-TOF a MALDI-TOF profiling, jejichž použití je však zatím jen experimentální.

2.1.4.3 Léčba

Lékem volby u infekce *F. tularensis* jsou aminoglykosidová antibiotika gentamicin a streptomycin. Tato léčiva působí na *F. tularensis* baktericidně [8]. Pro úspěšnou léčbu je však nutno je podávat parenterálně a dlouhodobě [24], nejméně po 10 dní [2]. Dále lze použít fluorochinolové antibiotikum ciprofloxacin, u kterého se popisuje nejméně terapeutických selhání a nežádoucích účinků. U imunodeficientních pacientů se používá levofloxacin [8].

Tetracyklinová antibiotika jako doxycyklin, společně s chloramfenikolem jsou látky působící bakteriostaticky. Léčba jimi trvá déle, zpravidla 2 až 3 týdny a dochází k častějším relapsům onemocnění [25,26].

Antibiotika a chemoterapeutika z řad betalaktamů, makrolidů, linkosamidů či sulfonamidů jsou v léčbě infekce *F. tularensis* neúčinná [8].

2.1.4.4 Vakcinace

První pokusy o vývoj živé vakcíny byly prováděny na území bývalého Sovětského svazu ve 30. letech 20. století ještě před započatím druhé světové války. Oslabení plně virulentních kmenů se prováděla společnou kultivací bakterií *F. tularensis* subtyp *holarctica* s antisérem nebo jen

sušením kultur [27]. Takto získaná vakcína byla nejprve aplikována zvířatům, posléze i tisícům dobrovolníkům. Tento kmen byl pojmenovaný Moscow. Posléze byl vyvinut kmen 15, kterým byly v Sovětském svazu do začátku 60. let 20. století očkovány miliony lidí. Tato vakcína byla považována za bezpečnou, nicméně pro myši byla stále virulentní. Po ztrátě virulence kmene 15 pro myši byl vakcinační kmen obnovován v Gamaleya institutu v Moskvě, kde byl také vyvinut kmen 155. Roku 1956 získaly tento kmen USA [28].

Po následné rekultivaci kmene 155 v USA byly získány dva typy kolonií. Modrá varianta byla shledána jako více virulentní a imunogenní pro laboratorní zvířata [29]. Po testování imunizace proti plně virulentnímu kmenu Schu S4 byla vyvinuta vakcína LVS (Live Vaccine Strain). Série testů ukázaly, že subdermální vakcinace LVS neposkytuje dostatečně spolehlivou ochranu proti inhalační formě tularémie, která přichází v úvahu při bioteroristickém zneužití [30]. Lepší protekci proti inhalační formě vykazala imunizace aerobní a orální cestou [31,32]. V současné době lze vakcínu LVS používat jen v klinických studiích a pro imunizaci laboratorních pracovníků, přičemž jejímu schválení úřadem FDA brání několik faktů [8,33]:

- není znám princip oslabení LVS kmene
- nejsou s jistotou známy antigeny nutné k vyvolání imunizace
- nebyla charakterizována úroveň ochrany po imunizaci
- kmen je plně virulentní u myši při intraperitoneálním podání, ale po podání intradermálním je avirulentní, z tohoto faktu plynou obavy, že vakcína by mohla být virulentní pro imunodeficientní pacienty

Současný vývoj směřuje k vývoji subjednotkové vakcíny s cílem určit antigeny odpovědné za imunitní odpověď. Dřívější studie provedené na lidech vakcinovaných kmenem LVS prokázaly CD4⁺ a CD8⁺ odpověď na mozaiku proteinových antigenů unikátní pro každého jedince [34]. Pokroky v proteomických metodách nedávno umožnily charakterizovat další desítky antigenů vyvolávajících protilátkovou odpověď u myši a lidí. [35,36]. Přes určité pokroky není dodnes hlavně kvůli zmíněné heterogenitě imunogenních antigenů spolehlivá subjednotková vakcína vyvinuta.

2.1.5 Molekulární mechanismy virulence u *F. tularensis*

Přes intenzivní výzkum nebyl do dnešní doby jednoznačně poznán mechanismus virulence a identifikovány jeho faktory. Doposud učiněné analýzy však ukázaly, že jsou velice odlišné od jiných bakterií [1]. K jejich poznání přispívá i zveřejnění kompletní genomové sekvence *F. tularensis* [37]. Dalšími užitečnými zdroji dat jsou proteomové analýzy. Doposud bylo identifikováno několik molekul s prokázaným nebo potenciálním vztahem k virulenci *F. tularensis*.

LPS *F. tularensis* vykazuje strukturní i biologické anomálie. Struktura O-bočního řetězce je jedinečná mezi gram-negativními bakteriemi. Schopnost LPS indukovat produkci IL-1 a TNF α je tisíckrát menší než u LPS *E. coli* [38] a schopnost nespecifické aktivace B lymfocytů k proliferaci postrádá zcela [39,40]. LPS společně s lipidem A brání produkci oxidu dusnatého v myších makrofázích. Studie s mutanty ukázaly, že regulace O-antigen je nezbytný pro sérovou rezistenci i růst uvnitř makrofágů.

Během růstu uvnitř makrofágů nebo při působení peroxidu vodíku na *F. tularensis* LVS byla zjištěna vysoká exprese IgIC proteinu (dříve 23-kDa protein), jehož aminokyselinová sekvence nejeví podobnost s žádným dosud známým proteinem. Mutanty s poškozeným genem pro tento protein nebyly schopné intracelulárního růstu ani nevykazovaly cytopatogenní efekt.

Kyselá fosfatáza některých intracelulárních parazitů se řadí mezi faktory virulence, které usnadňují přežití těchto bakterií uvnitř buňky mechanismem potlačení respiračního vzplanutí. Kyselá fosfatáza *F. tularensis* vykazuje jisté odlišné znaky ve struktuře a substrátové specifitě a není nezbytná pro intracelulární přežití [41,42].

Proteiny kódované geny *mglA* a *mglB* u *F. tularensis* subtyp *novicida* jsou nezbytné pro intracelulární proliferaci. Předpokládá se, že to jsou transkripční regulátory během nutričního stresu. Jeví sekvenční podobnost s *sspAB* geny *E. coli* [43].

Jedním z kandidátů na složku subjednotkové vakcíny je 17-kDa lipoprotein. Tento konzervativní lipoprotein je exprimován všemi subtypy

F. tularensis, ale i např. bakterií *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Myši očkované rekombinantně připraveným 17-kDa lipoproteinem jevíly známky částečné ochrany proti následné infekci [44].

Byly nalezeny i další geny důležité pro růst uvnitř makrofágů. Jmenovat lze geny *pdpA*, *pdpD*, gen pro *ClpB* teplem inducibilní proteázu, dále homolog glutamin fosforibosyl-pyrofosfát amidotransferázu nebo alanin racemázu [45].

Nedávno byl popsán ostrov patogenity FPI v rozsahu přibližně 30-kB, ve kterém se nachází již zmiňované operony *igl* a *pdp*. Jak v genomu kmene LVS tak v genomu subtypu *tularensis* se FPI nachází ve dvou kopiích. [46].

Analýza spontánního mutantního kmene FSC043 odvozeného od vysoce virulentního subtypu *tularensis* nedávno odhalila spojitost mezi delecí genu pro 58-kDa protein a nižší schopností intracelulární proliferace. Nově připravený kmen s definovanou mutací tohoto genu navíc u myší vykazuje protektivní vlastnosti proti plně virulentnímu subtypu *tularensis* [47].

2.2 Stresové odpovědi a metody jejich analýzy

Patogenní bakterie se během infekčního cyklu setkávají s velmi odlišným životními podmínkami. Nejčastějšími proměnnými jsou teplota, přítomnost živin, dostupnost kyslíku, pH a osmolarita prostředí [48]. Některé podmínky, zejména podmínky působící během interakce s hostitelským organismem, jsou pro bakterie likvidační. Bakterie proto vyvinuly nástroje, jak se na jejich přítomnost rychle adaptovat a tím přežít jejich působení. Tyto nástroje se označují jako faktory virulence.

Produkce faktorů virulence je spouštěna jako reakce na působení jednotlivých fyzikálních a chemických signálů uvedených výše. I velmi komplexní prostředí hostitele totiž bakterie vnímají až po rozložení na jednotlivé signály. Jednoduchou změnou kultivačních podmínek tak můžeme vyvolat změnu fenotypu, která se odehrává během interakce s hostitelskou buňkou. Studium stresových odpovědí je proto velmi důležitým nástrojem vedoucím k identifikaci molekul, které bakterie využívá pro vlastní přežití a rozhodují o dalším osudu makroorganismu.

Odpovědi na působení stresu lze studovat na úrovni transkriptomu nebo na úrovni proteomu. Tak jako v jiných oblastech biologicko-medicínského výzkumu také ve studiu interakce hostitel-patogen se do popředí dostaly metody, jenž umožňují simultánní analýzu exprese celého genomu nebo jeho velké části. Jedná se především o technologie DNA microarrays a v oblasti analýzy proteinů o 2D-PAGE a MudPIT. Genomické i proteomické přístupy mají své přednosti i limitace a tak jsou jejich výstupy komplementární.

2.2.1 Dvojměrná gelová polyakrylamidová elektroforéza

Dvojměrná elektroforéza patří mezi elektroforetické metody, které se používají k dělení látek nesoucích elektrický náboj. K dělení dochází na základě rozdílné pohyblivosti iontů ve stejnosměrném elektrickém poli. Pohyblivost dělených částic je závislá na náboji, velikosti, viskozitě, velikost pórů, pH pufrů, iontové síle a teplotě média. Metodu 2D-PAGE můžeme rutinně použít pro paralelní vyhodnocení kvalitativních nebo kvantitativních změn exprese velkého množství proteinů. 2D-PAGE kombinuje dvě základní metody, isoelektrickou fokusaci (IEF–metoda umožňující dělení proteinů na základě rozdílné hodnoty isoelektrické bodu proteinů) a elektroforézu na SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE–metoda umožňující rozdělení proteinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti). Kombinací těchto dvou metod vznikl nástroj proteomové analýzy o vysoké citlivosti (schopnost detekce <1ng proteinu na jednu skvrnu). Kombinace 2-D PAGE a hmotnostní spektrometrie je základní proteomický nástroj pro identifikaci proteinů. Obecný pracovní postup při zahrnuje přípravu vzorku, separaci v prvním rozměru, ekvilibraci, separaci v druhém rozměru a detekci separovaných proteinů.

2.2.1.1 Isoelektrická fokusace–separace v prvním směru

Isoelektrická fokusace je elektroforetická metoda používaná pro separaci amfoterních molekul v pH gradientu. Při umístění proteinů do média s pH gradientem a aplikaci elektrického pole proteiny s elektrickým nábojem

migrují směrem k opačně nabitě elektrodě. Během migrace v médiu se zakotveným pH gradientem proteiny ztrácí nebo získávají protony, což vede ke snižování velikosti jejich nábojů i pohyblivosti. Jakmile dosáhnou v pH gradientu bodu, který odpovídá jejich pI, zastaví svou migraci.

IEF využívá k separaci nejčastěji komerčně vyráběné proužky s imobilizovaným pH gradientem—tzv. IPG-proužky (immobilized pH gradient). Imobilizovaný pH gradient vzniká kovalentní inkorporací gradientu kyselých a bazických pufrů do polyakrylamidové matrice. IPG-proužky se vyrábí v různých délkách a rozmezí pH.

Komerčně vyráběné IPG-proužky jsou dodávány dehydratované a před použitím se musí rehydratovat. Následuje nanášení vzorku na proužek, jedním ze způsobů je pasivní in gel nanášení vzorku. Při tomto způsobu se vzorek smísí s rehydratačním pufrům. V průběhu hydratace se proteiny absorbují ze vzorku a distribuují se po celé délce proužku. Je důležité, aby vzorky byly v kontaktu s proužky dostatečně dlouhou dobu, nejméně 12 hodin před vlastní fokusací. Tím se zajistí absorpce velkých proteinů, které přecházejí do gelové matrice až poté, co je proužek plně hydratován a póry dosáhnou maximální velikosti. Po ukončení rehydratace je spuštěna vlastní IEF, kdy jsou proužky vystaveny působení elektrického pole.

Aby bylo při opakování IEF dosaženo stejných výsledků, je nutné zajistit, aby velikost napětí aplikovaného na proužky stejně jako doba, po kterou bylo toto napětí aplikováno, byly neměnné. Přístroje proto umožňují předem nastavit průběh IEF v několika krocích, pro které se přímo zvolí doba trvání a počet volt hodin. Volba parametrů pak závisí na vlastnostech použitého proužku, typu vzorku a pufru a určuje se empiricky. Nastavování napětí po jednotlivých krocích může být nahrazeno kontinuálním navyšováním napětí. Po ukončení IEF mohou být fokusované IPG-proužky uchovávány při -20°C v rehydratační misce nebo uzavíratelných tubách neomezenou dobu, aniž by došlo ke změnám v rozdělení proteinů.

2.2.1.2 Ekvilibrace fokusovaných proužků

Ekvilibrace rozdělených IPG-proužků je proces, který předchází separaci proteinů v druhém rozměru. Nejprve se proužky ponoří do redukujícího ekvilibračního roztoku, který zajistí rozštěpení disulfidických můstků mezi proteiny. Poté se proužky vloží do ekvilibračního roztoku obsahujícího alkylační činidlo, které alkyluje vzniklé SH-skupiny a trvale tak brání opětovné tvorbě disulfidických můstků mezi proteiny a tím i jejich agregaci.

Oba ekvilibrační roztoky současně obsahují dodecylsírán sodný (SDS). Ten se váže na všechny rozdělené proteiny v proužku proporcionálně k jejich hmotnosti a uděluje tak všem proteinům uniformní poměr negativního náboje ke hmotnosti, takže pohyblivost proteinů závisí jen na jejich velikosti. Kromě toho, že uděluje všem proteinům negativní náboj, čímž maskuje jejich individuální náboje, také štěpí vodíkové můstky, ruší hydrofobní interakce a brání tak agregaci fokusovaných proteinů.

2.2.1.3 Elektroforéza na polyakrylamidových gelech—separace v druhém směru

K rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti se využívá polyakrylamidová gelová elektroforéza s přidavkem SDS (SDS-PAGE) a probíhá v kolmém směru na první rozměr. Molekuly proteinu s negativním nábojem v elektrickém poli migrují přes póry gelové matrice v závislosti na jejich molekulové hmotnosti, přičemž proteiny o malé molekulové hmotnosti se pohybují rychleji než proteiny o velké molekulové hmotnosti. Elektroforéza probíhá při konstantní hodnotě napětí tak dlouho, dokud není indikační barvivo, které má vyšší migrační rychlost než proteiny, z gelu odstraněno.

Gradientové gely obsahují koncentrace akrylamidu, které se zvyšují od vrcholu gelu směrem k jeho spodní části. Proteiny tak migrují z oblasti s relativně velkými póry k regionům s nízkou velikostí pórů, přičemž se zpomaluje rychlost jejich migrace. Tyto gely tak umožňují současnou analýzu proteinů v širokém rozmezí molekulových hmotností a jsou vhodné pro separaci složitých proteinových směsí.

2.2.1.4 Detekce separovaných proteinů v gelech

Nejčastějším způsobem detekce je značení proteinů pomocí barviv nebo kovů. Je-li cílem elektroforézy identifikovat málo se vyskytující protein nebo srovnávací analýza, je vhodné použít vysoce citlivou metodu detekce proteinových skvrn. Chceme-li pomocí 2D-PAGE získat dostatek proteinů, které budou dále využity např. jako antigeny nebo pro hmotnostně spektrometrickou analýzu, je nutné použít detekční metodu, která je kompatibilní s MALDI-TOF měřením.

Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250, které patří mezi nejčastěji používaný typ barviva při detekci 2D-PAGE gelech. Druhou metodou je detekce proteinů stříbrem. Tento postup je založen na metodě vyvinuté Gottliebem a Chavkem. Proteiny se v gelu fixují roztokem metanolu, kyseliny octové a glycerolu. Po promytí jsou gely ponořeny do roztoku, který obsahuje aminostříbrný komplex. Stříbrné ionty pak přecházejí z tohoto komplexu na proteiny v gelu a jejich redukce je zajištěna alkalickým roztokem formaldehydu. Vyvíjení hnědočerného zbarvení se ukončuje pomocí kyseliny octové.

2.2.1.5 Digitalizace gelů

Rozdělené a vhodně označené proteiny na polyakrylamidových gelech se dále převádí do formy digitálního zobrazení a v této podobě se pak prostřednictvím softwarů objektivně porovnávají. Získaná data se statisticky vyhodnocují, interpretují a shromažďují v proteinových databázích. K získání gelových zobrazení lze použít řadu přístrojů jako jsou denzitometry, fosforové a fluorescenční skenery, které umožňují digitalizaci 2D-gelů značených fluorescenčními barvivy nebo radioaktivními isotopy, a nebo lze využít nejrůznější kamerové systémy, které podle nastavení expozičního času a clony poskytují digitální zobrazení gelu.

Po převedení gelů do digitální podoby následuje vlastní analýza pomocí speciálních programů jako je např. PDQuest nebo Melanie. Program nejprve zkoriguje celkové zobrazení, odečte pozadí a následně automaticky zdetekuje proteinové skvrny a označí je zvoleným způsobem. Současně je

možná ruční korekce, kdy lze v rámci čištění zobrazení smazat skvrny, které nejsou proteinové povahy.

3.1.1.1. M...

3.1.1.2. T...

3.1.1.3. R...

3.1.2.1. ...

3.1.2.2. ...

3.1.2.3. ...

3.1.2.4. ...

3.1.2.5. ...

3.1.2.6. ...

3.1.2.7. ...

3.1.2.8. ...

3.1.2.9. ...

3.1.2.10. ...

3.1.2.11. ...

3.1.2.12. ...

3.1.2.13. ...

3.1.2.14. ...

3.1.2.15. ...

3.1.2.16. ...

3.1.2.17. ...

3.1.2.18. ...

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

- Bakterie *Francisella tularensis* subtyp *holarctica*, kmen LVS/m

3.1.2 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy AX 105, Mettler-Toledo, Greifensee, Švýcarsko
- Automatické mikropipety Pipetman Ultra, Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
- Automatické mikropipety Proline, Biohit, Helsinky, Finsko
- Centrifuga JOUAN A14, Jouan, Francie
- Centrifuga JOUAN BR4i, Jouan, Francie
- Gradientní mixér Gradient former 395, Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA
- Hmotnostní spektrometr Voyager-DE STR, Perseptive Biosysteme, Framingham, Maine, USA
- Hybridizér HYBRIDISER HB-1D, Techne, Cambridge, Velká Británie
- Chladicí zařízení Multitemp II, Uppsala, Švédsko
- Chladicí zařízení Refrigerated Recirculator Model 4860, Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA
- Inkubátor INKUBATOR 1000, Heidolph Instruments, Schwabach, Německo
- Inkubátor Orbital Shaking Incubator SI6, ShellLab, Cornelius, Oregon, USA
- Laminární box S@FE FLOW 1.2, Bio-air Instruments, Siziano, Itálie
- LKB-Multiphor II, Pharmacia, Uppsala, Švédsko
- Magnetická míchačka Hotplate & Stirrer JENWAY 1000, Dunmow, Velká Británie
- Mrazicí box PowerFREEZE -87°C VXE, Jouan, Francie
- MS1 minishaker, IKA, Wilmington, Severní Karolína, USA
- MS2 minishaker, IKA, Wilmington, Severní Karolína, USA

- Orbitální třepačka Cymatics, Naperville, Illinois, USA
- pH metr inoLab Level 1, Wiessenschaffelich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Německo
- PROTEAN II Multi-Cell, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- PROTEAN Plus Dodeca Cell, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- Protein IEF Cell, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- Příruční densitometr CO8000 Cell Density Meter, WPA Biowave, Cambridge, Velká Británie
- Rychlováhy NAGATA EK 15000, Nagata Seiki Co., Ltd, Niigata-ken, Japonsko
- Sonikační lázeň Ultrasonic LC 30 H, Elma, Německo
- Speed Vac, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Stanice KODAK Image Station 2000R, Eastman Kodak Copany, Rochester, New York, USA
- Spektrofotometr HELIOS GAMMA, Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie
- Termomixer, Eppendorf, Hamburg, Německo
- Třepačka PROMAX 1020, Heidolph Instruments, Schwabach, Německo
- Třepačka RED ROTOR, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornie, USA
- Zdroj elektrického napětí a proudu EC 6000P, Hoefer Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornie, USA
- Zdroj elektrického napětí a proudu PowerPac Universal, Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA
- Běžný laboratorní materiál: skleněné zkumavky, plastové zkumavky, zátky na baňky, plastové pipety, očkovací klička, misky na barvení gelů, pinzeta, skalpel, filtrační papír, odměrné válce, celofán

3.1.3 Chemikálie, reagensie

- Aceton, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- ACN, Sigma, St. Louis, Montana, USA

- Agaróza, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Akrylamid, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- Amfolyty pH 9-11 40%, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- APS, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- Benzonase 90+%, 324 U/ml, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Bicinchonic Acid Protein Assay Kit, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Bromfenolová modř, Serva, Heidelberg, Německo
- Colloidal Blue Staining Kit (Coomassie G-250), Novex, Carlsbad, Kalifornie, USA
- Complete, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo
- De Streak reagent 12 μ l / 1 ml, Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko
- Deionizovaná voda, Těchonín
- DOCH, USB Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko
- DHB Matrix Kit, LaserBio Labs, Francie
- Dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- DTT, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- Dusičnan stříbrný, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Formaldehyd, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Glutaraldehyd, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Glycerol, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Glycin, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Hydrogenfosforečnan draselný, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Hydrogenfosforečnan sodný monohydrát, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- Hydrogenuhlíčitán amonný, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Hydroxid amonný, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Hydroxid sodný, Merck, Darmstadt, Německo
- Chamberlainovo médium, Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové
- CHAPS, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- Chlorid draselný, Fluka, Buchs, Švýcarsko

- Chlorid sodný, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Iodoacetamid, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- IPG-proužky Immobiline DryStrip pH 4-7, 18 cm, Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko
- IPG Buffer pH 4-7, Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko
- Kyselina citronová, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Kyselina octová, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Methanol, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Močovina, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- NDS, Fluka, Buchs, Německo
- Octan sodný, Merck, Darmstad, Německo
- Parafínový olej, Merck, Darmstadt, Německo
- PDA, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- Peptide calibration MIX 1 1000-2500 Da, LaserBio Labs, Francie
- ReadyPrep 2-D Cleanup Kit, Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA
- Sekundární butanol, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- SDS, Bio-Rad, Richmont, Kalifornie, USA
- Siran amonný, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- TCA, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- TEMED, USB (Amersham Pharmacia Biotech), Uppsala, Švédsko
- TFA, Fluka, Buchs, Švýcarsko
- Thiomočovina, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Thiosulfát, Merck, Darmstad, Německo
- TRIS, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- TRIS-HCl, Sigma, St. Louis, Montana, USA
- Trypsin, Promega, Madison, Wisconsin, USA

3.1.4 Roztoky

Kód	Název roztoku a složení	Celková koncentrace	Odměřené množství
A1	Pufrovaný fyziologický roztok- PBS		
	NaCl	0,08% (w/v)	0,8 g
	KCl	0,02% (w/v)	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,315% (w/v)	3,15 g
	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,015% (w/v)	0,15 g
	KH ₂ PO ₄	0,02% (w/v)	0,2 g
	Deionizovaná voda		do 1000 ml
A2	LPA pufr		
	Tris-HCl	28mM	44,1 mg
	Tris-baze	22mM	26,6 mg
	SDS	0,25% (w/v)	25,0 mg
	Complete inhibitor EDTA Free		1 tableta
	Deionizovaná voda		do 10 ml
B1	1% roztok SDS		
	SDS	1% (w/v)	10 mg
	Deionizovaná voda		do 1 ml
B2	Roztok benzonázy 30 U/ml		
	Benzonase 90+% 324 U/ml	9,25% (v/v)	92,5 µl
	Deionizovaná voda		do 1 ml
B3	Roztok benzonázy v LPA pufru		
	Roztok benzonázy 30 U/ml (B2)	10% (v/v)	10 µl
	LPA pufr	90% (v/v)	90 µl
B4	20% roztok TCA v acetonu		
	TCA	20% (v/v)	200 µl
	Aceton	80% (v/v)	800 µl
	2% roztok amfolytů pH 9-11		

B5	Amfolyty pH 9-11 40% roztok	5% (v/v)	25 µl
	Deionizovaná voda	95% (v/v)	do 500 µl
B6	UP-D pufr		
	Močovina	9 M	5,4 g
	CHAPS	4% (w/v)	0,4 g
	Tris-baze	40 mM	48,5 mg
	De Streak Reagent	1,2% (v/v)	120 µl
	2% amfolyty pH 9-11 (B5)	5% (v/v)	500 µl
	Deionizovaná voda		do 10 ml
C1	0,15% roztok DOCH		
	DOCH	0,15% (w/v)	1,5 mg
	Deionizovaná voda		do 1 ml
C2	72% TCA		
	TCA	72% (v/v)	720 µl
	deionizovaná voda	28% (v/v)	280 µl
C3	5% SDS v 0,1M roztoku NaOH		
	SDS	5% (w/v)	50 mg
	NaOH	0,4% (w/v)	4 mg
	Deionizovaná voda		do 1 ml
D1	Roztok RTS-D s IPG pufrům 4-7		
	Močovina	6 M	1,8 g
	Thiomočovina	2 M	0,76 g
	CHAPS	4% (w/w)	0,2 g
	Tris-baze	40 mM	24,25 mg
	De Streak Reagent 12µg/1ml	0,12% (v/v)	60 µl
	Bromfenolová modř 0,5% roztok	0,02% (v/v)	10 µl
	IPG Buffer pH 4-7	0,1% (v/v)	50 µl
	Deionizovaná voda		do 5 ml
D2	Roztok akrylamidu s PDA		
	Akrylamid	30% (w/v)	96 g
	PDA	8% (w/v)	2,56 g

D2	Deionizovaná voda		do 320 ml
D3	5% roztok thiosulfátu		
	Thiosulfát	5% (w/v)	0,5 g
D1	Deionizovaná voda		do 10 ml
D4	10% roztok APS		
	APS	10% (w/v)	0,4 g
	Deionizovaná voda		do 4 ml
D5	9% polyakrylamidový gel-lehký		
	Roztok akrylamidu s PDA (D2)	20,71% (v/v)	104,1 ml
	TRIS-HCl pH 8,8	18,18% (v/v)	91,4 ml
	5% roztok thiosulfátu (D3)	0,36% (v/v)	1,785 ml
	Deionizovaná voda	32,99% (v/v)	165,8 ml
	10% roztok APS (D4)	0,27% (v/v)	1,381 ml
	TEMED	27,48% (v/v)	138,13 ml
D6	16% polyakrylamidový gel-těžký		
	Roztok akrylamidu s PDA (D2)	40,75% (v/v)	204,9 ml
	TRIS-HCl pH 8,8	18,17% (v/v)	91,4 ml
	5% roztok thiosulfátu (D3)	0,36% (v/v)	1,785 ml
	Deionizovaná voda	12,43% (v/v)	65,2 ml
	10% roztok APS (D4)	0,27% (v/v)	1,381 ml
	TEMED	27,47% (v/v)	138,13 ml
D7	Sekundární butanol saturovaný vodou		
	Sekundární butanol	83,33% (v/v)	50 ml
	Deionizovaná voda	16,67% (v/v)	10 ml
D8	Ekvilibrační roztok		
	Močovina	36% (w/v)	18 g
	SDS	2% (w/v)	1 g
	1,5M TRIS pH 8,8 s 0,4% SDS	3,34% (v/v)	1,67 ml
	Glycerol	30% (v/v)	15 ml
	Deionizovaná voda		do 50 ml

D9	Ekvilibrační roztok s DTT		
	Ekvilibrační roztok (D8)		75 ml
	DTT	1% (w/v)	0,75 g
D10	Ekvilibrační roztok s iodoacetamidem a bromfenolovou modří		
	Ekvilibrační roztok (D8)	95,69% (v/v)	75 ml
	Iodoacetamid	3,82% (w/v)	3 g
	0,5% bromfenolová modř	0,48% (v/v)	375 µl
D11	1% roztok agarózy		
	Agaróza	1% (w/v)	1 g
	Deionizovaná voda		do 100 ml
D12	Horní pufr na 2D		
	Glycin	384 mM	288 g
	TRIS	50 mM	60 g
	SDS	0,1% (w/v)	10 g
	Deionizovaná voda		do 10 l
E1	Barvicí lázeň s G-250		
	Methanol	20% (v/v)	360 ml
	Roztok A-KIT	20% (v/v)	360 ml
	Roztok B-KIT	5% (v/v)	90 ml
	Deionizovaná voda	55% (v/v)	990 ml
E2	20% roztok síranu amonného		
	Síran amonný	20% (w/v)	10 g
	Deionizovaná voda		do 50 ml
F1	Fixační roztok 1		
	Methanol	40% (v/v)	480 ml
	Kyselina octová	10% (v/v)	120 ml
	Deionizovaná voda	50% (v/v)	600 ml
F2	Fixační roztok 2		
	Methanol	5% (v/v)	60 ml

	Kyselina octová	5% (v/v)	60 ml
	Deionizovaná voda	90% (v/v)	1080 ml
F3	Roztok glutaraldehydu		
	Glutaraldehyd	8% (v/v)	96 ml
	Octan sodný	4,15% (w/v)	49,218 g
	Deionizovaná voda		do 1200 ml
F4	0,05% roztok NDS		
	NDS	0,05% (v/v)	1,2 g
	Deionizovaná voda		do 2400 ml
F5	Roztok dusičnanu stříbrného		
	Dusičnan stříbrný	20% (w/v)	9,6 g
	Deionizovaná voda		do 48 ml
F6	Amoniakální roztok stříbra		
	10 M roztok NaOH	0,74% (v/v)	2,4 ml
	Hydroxid amonný koncentrovaný	4,96% (v/v)	15,99 ml
	Deionizovaná voda	79,41% (v/v)	256,005 ml
	Roztok dusičnanu stříbrného (F5)	14,89% (v/v)	48 ml
F7	Roztok kyseliny citronové		
	Kyselina citronová	50% (w/v)	5 g
	Deionizovaná voda		do 10 ml
F8	Roztok vývojky		
	Roztok kyseliny citronové (F6)	0,00001% (v/v)	120 μ l
	Formaldehyd	0,1% (v/v)	1,2 ml
	Deionizovaná voda		do 1200 ml
F9	Přerušovací lázeň		
	Kyselina octová	5% (v/v)	250 ml
	Deionizovaná voda		5000 ml
F10	Fixační roztok 3		
	Methanol	45% (v/v)	2250 ml
	Kyselina octová	7,5% (v/v)	375 ml
	Glycerol	3% (v/v)	150 ml

	Deionizovaná voda		2225 ml
G1	50% roztok ACN		
	ACN	50% (v/v)	2,5 ml
	Deionizovaná voda	50% (v/v)	2,5 ml
G2	Promývací a dehydratační pufr pH 8,5		
	TRIS-baze	100 mM	157,6 mg
	50% roztok ACN (G1)	50% (v/v)	5 ml
	Deionizovaná voda	50% (v/v)	5ml
	pH vyrovnané na hodnotu 8,5		
G3	Ekvilibrační a štěpící pufr pH 7,8		
	Hydrogenuhličitan amonný	50 mM	395 mg
	ACN	5% (v/v)	5 ml
	Deionizovaná voda	95% (v/v)	95 ml
	pH vyrovnané na hodnotu 7,8		
G4	Roztok trypsinu ve štěpícím a ekvilibračním pufru		
	Roztok trypsinu o koncentraci 0,1 µg/µl	10% (v/v)	0,5 µl
	Štěpící a ekvilibrační pufr (G3)	90% (v/v)	4,5 µl
G5	0,1% roztok TFA v ACN		
	TFA	1% (v/v)	1 µl
	ACN	99% (v/v)	999 µl
G6	0,1% roztok TFA ve vodě		
	TFA	0,1% (v/v)	1 µl
	Deionizovaná voda	99,9% (v/v)	999 µl
G7	Roztok matrice		
	DHB	10% (w/v)	10 mg
	0,1% TFA v ACN (G5)	20% (v/v)	20 µl
	0,1% TFA ve vodě (G6)	80% (v/v)	80 µl
F7	Kalibrační vzorek		

Peptide calibration MIX 1 1000- 2500 Da	10% (v/v)	1 μ l
Roztok matrice (G7)	90% (v/v)	9 μ l

3.1.5 Software

- PDQuest, verze 7.3.1, Bio-Rad, Herkules, Kalifornie, USA
- KODAK 1D Image Analysis Software, Eastman Kodak Company, Rorchester, New York, USA
- VOYAGER CONTROL PANEL, Perseptive Biosysteme, Framingham, Maine, USA
- DATA EXPLORER, Perseptive Biosysteme, Framingham, Maine, USA
- PROTEIN PROSPECTOR MS-FIT

3.2 Kultivace bakterií

Bakterie se kultivují v tekutém médiu, které zajišťuje vhodné nutriční podmínky. Promícháváním kultur na třepačce se zajišťuje přísun kyslíku. Bakterie byly kultivovány za různých tepelných podmínek. Teplota 37°C simuluje teplotu teplokrevného hostitele, teplota 25°C simuluje teplotu prostředí a 42°C působí jako teplotní stresor.

Kulturu *Francisella tularensis* LVS/m jsem přeočkoval z pevných půd dle McLeoda do zkumavek s 6 ml tekutého Chamberlainova média a kultivoval jsem po dobu přes noc při 225 rpm a 37°C. Poté jsem kultury zcentrifugoval při 5000 rpm, 25°C po dobu 5 minut, supernatant odtranil a pelety resuspendoval v 5 ml nového Chamberlainova média. Tuto bakteriální suspenzi jsem postupně přidával do kultivační Erlenmayerovy baňky k Chamberlainovu médiu až do dosažení hodnot O.D. 0,12. Jednotlivé kultury jsem potom kultivoval zvlášť za teplot 25°, 37° a 42°C ve vhodných inkubátorech a po různě dlouhou dobu, až dosáhly hodnot O.D 0,60.

3.3 Zpracování vzorků

Cílem zpracování vzorku je rozrušit buňku, zajistit rozpuštění a denaturaci proteinů, zabránit chemickým modifikacím a vzájemným agregacím. Dále důkladně odstranit či rozštěpit nukleové kyseliny, např. benzonázou. Nezbytné je též inaktivovat proteázy.

Po ukončení kultivace jsem bakterie zcentrifugoval při 7500 rpm, 4°C po dobu 5 minut a pelet promyl v 5 ml PBS (A1), zcentrifugoval při 7500 rpm, 4°C po dobu 5 minut a následně promyl v 1 ml PBS a opět za stejných podmínek zcentrifugoval. Poté jsem pelety resuspendoval v 0,5 ml LPA pufru (A2) a přenesl do mikrozkušavek. Následně jsem vzorky zamrazil při -80°C do dalšího zpracování. Suspenzi kultur v LPA pufru jsem rozmrazil a ke každému vzorku přidal 20 µl 1% roztoku SDS (B1). Zkušavky jsem ponořil na krátkou dobu do vroucí lázně až do jejich vyjasnění. Poté jsem vzorky centrifugoval 10 minut při 10000 rpm a 4°C a k supernatantu jsem přidal 500 µl LPA pufru a opět vařil ve vodní lázni po dobu 3 minut. Následně jsem přidal 2 µl směsi benzonázy v LPA pufru (B3) a vzorky jsem kultivoval 1 hodinu při 4°C v termomixeru. Vzorky jsem dále zcentrifugoval při 12000 rpm, 4°C po dobu 6 minut a supernatant přenesl do inkubačních zkušavek.

3.4 Přesrážení bílkovin

Selektivní přesrážení proteinů brání degradaci proteinů, odstraňuje rušící prvky jako jsou např. soli přítomné v roztoku, polysacharidy, polyfenoly či nukleové kyseliny, které mohou snižovat reprodukovatelnost 2D-PAGE. Existují různé postupy pro srážení bílkovin založené na rozdílných principech. Jednou z metod je takzvané vysolování, kdy za použití anorganických sloučenin s velkou afinitou k vodě dochází k odnímání hydratačních obalů molekulám bílkovin a následně jejich precipitaci. Použit lze například bezvodý síran amonný. Stejným mechanismem působí i organické sloučeniny, např. aceton, ethanol a polyethylenglykol. Principem je snížení dielektrické konstanty a následné zesílení interakcí elektricky nabitých skupin na povrchu molekul. Další metodou je změna pH roztoku,

přičemž obecně platí, že bílkoviny mají nejnižší rozpustnost při pH blízkém jejich bodu pl.

První srážení bílkovin jsem provedl k zkoncentrování vzorku, přičemž při použití směsi TCA/acetón nedochází k plnému odstranění SDS ze vzorku. Proto jsem pro druhé přesrážení proteinů použil komerční set ReadyPrep 2-D Cleanup Kit, který je vhodný právě pro tento účel.

Vzorek jsem smísil se 4 ml vychlazené směsí 20% TCA v acetonu (B4). Po proběhnutí precipitace v prostředí -80°C jsem supernatant odstranil a pelety rozpustil v 1 ml UP-D pufru (B6) na vortexu. Poté jsem je centrifugoval 5 min při 14000 rpm a 4°C a supernatant oddělil do nových zkumavek a zamrazil při -80°C do dalšího zpracování. Vzorky v UP-D pufru jsem rozmrazil a zpracoval dle manuálu ke komerčnímu setu ReadyPrep 2-D Cleanup Kit. Takto zpracované vzorky jsem poté zcentrifugoval po dobu 5 minut při 9800 rpm a 4°C a po vysušení na vzduchu jsem pelety rozpustil v 250 μl UP-D pufru a následně je sonikoval po 20 min až do vyjasnění.

3.5 Měření koncentrace bílkoviny

Koncentraci bílkovin lze měřit spektrofotometricky. Bílkoviny reagují s měďnatými ionty za vzniku barevných komplexů, kdy intenzita zabarvení je přímo úměrná jejich koncentraci v roztoku. Za pomoci vzorků o známé koncentraci bílkoviny se sestrojí kalibrační křivka. Měření probíhá při vlnové délce 562,0 nm.

Protože jsem předpokládal nižší obsah proteinů ve vzorcích, použil jsem na měření 10 μl vzorku, namísto standardně používaných 5 μl . Vzorky jsem zpracovával metodou dle manuálu k Bicinchonic Acid Protein Assay Kit. Za použití BCA činidla, BCA standardy a deionizované vody jsem připravil kalibrační roztoky. Vlastních 10 μl od každého vzorku jsem smísil s 995 μl deionizované vody a 100 μl roztoku 0,15% DOCH (C1), zvortexoval a nechal 10 minut ustát. Poté jsem přidal do všech zkumavek 100 μl 72% TCA (C2), zcentrifugoval při 12000 rpm při laboratorní teplotě, supernatant ze zkumavek odstranil a supernatant nechal vysušit na vzduchu. K peletům jsem přidal 50 μl směsi 5% SDS v 0,1M roztoku NaOH (C3) a 1 ml BCA

čínidla. Zkumavky jsem poté inkuboval 30 minut při 37°C v termomixeru a po ochlazení změřil koncentraci bílkoviny na spektrofotometru při vlnové délce 562,0 nm.

3.6 2-D PAGE

Prvním krokem je rozdělení proteinů na základě jejich pI na IPG-proužcích. V druhé dimenzi, na polyakrylamidových gelech, se bílkoviny rozdělují dle relativní molekulové hmotnosti. Podrobnější informace jsou v teoretické části.

Zpracování gelů jak pro modření, tak i pro stříbření, jsem zpracoval za totožných podmínek na stejných přístrojích, vyjma kroku vlastní elektroforézy a detekce proteinových skvrn. Gely na stříbření jsem zpracoval jako první na přístroji PROTEAN II Multi-Cell a gely určené na modření jsem zpracoval na přístroji Protean Plus Dodeca Cell. Příslušné podrobnosti a rozdíly zmiňuji dále v textu.

3.6.1 Pracovní postup

3.6.1.1 Pasivní in gel rehydratace a isoelektrická fokusace

Do mikrozkušavek jsem odebral taková množství vzorku, které odpovídalo nanášce 500 µg proteinu pro gely barvené modřením a 75 µg pro gely barvené stříbřením a doplnil směsí roztoku RTS-D s IPG puřem pH 4-7 (D1) do celkového objemu 350 µl. Vzorky jsem poté přenesl do rehydratační misky. Jednotlivé IPG-proužky jsem vložil do roztoku vzorků, zalil parafinovým olejem a nechal rehydratovat přes noc za laboratorní teploty. Další den jsem si připravil navlhčené proužky IEF-filtračního papíru. Proužky IEF-filtračního papíru jsem položil na IPG-proužky a přes ně jsem položil elektrody přístroje. Na přístroji jsem zvolil předem nastavený program s parametry pro isoelektrickou fokusaci, která probíhala při 20°C. Po ukončení isoelektrické fokusace jsem stripy vyjmul, uložil do zkumavek a zamrazil při -80°C do dalšího zpracování.

Tabulka 1; parametry isoelektrické fokusace

Základní parametry	6 mA, 15 W, 20°C
El. napětí	čas
300 V	30 min
600 V	30 min
1000 V	30 min
2000 V	30 min
2500 V	30 min
3000 V	30 min
3000 V	30 min
5000 V	12 hod

3.6.1.2 Lití polyakrylamidových gelů

Připravil jsem si roztoky pro lití 9 a 16% polyakrylamidových gelů (D5 a D6) dle rozpisu a během rozpouštění jsem připravil skla pro lití gelů. Ty jsem očistil koncentrovaným lihem, vysušil a upevnil do stojanu. Mezi skla upevněné do stojanu pro lití roztoků jsem pomocí gradientní míchačky napustil gelové roztoky. Horní část gelu tak měla koncentraci 9% a dolní 16 % polyakrylamidu. Poté jsem tento roztok převrstvil roztokem sekundárního butanolu saturovaného vodou (D7) a nechal polymerovat 2 hodiny. Po ukončení polymerace jsem vodou saturovaný sekundární butanol odsál.

3.6.1.3 Ekvilibrace IPG-proužků

Rozmražené fokusované IPG-proužky jsem ve zkumavkách smísl se 75 ml ekvilibračního roztoku s přídavkem DTT (D9) a nechal 15 minut za laboratorní teploty na třepačce. Poté jsem tento roztok slil a do zkumavek naplnil vždy po 75 ml ekvilibračního roztoku s přídavkem iodoacetamidu a 0,5% roztokem bromfenolové modře (D10) a opět nechal 15 minut na třepačce a následně opláchnul deionizovanou vodou.

3.6.1.4 Přenesení a zotavení ekvilibrovaných IPG-proužků do polyakrylamidového gelu

Na vrchní strany zpolymerovaných gelů mezi krycí skla jsem umístil opláchnuté IPG-proužky. Poté jsem je převrstvil 1 ml předem připraveným horkým roztokem agarózy (D11). Po zchladnutí agarózy jsou gely pevně ukotveny na polyakrylamidovém gelu a připraveny na vlastní elektroforézu.

3.6.1.5 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu na přístroji PROTEAN II Multi-Cell

Gely se zakotvenými IPG-proužky jsem umístil do držáků přístroje PROTEAN II Multi-Cell. Do vnější nádoby přístroje jsem nalil část horního pufru na 2D (D12) a z gelů jsem odstranil vzduchové bubliny. Nádobu jsem doplnil zbytkem pufrovacího roztoku, připojil přístroj PROTEAN II Multi-Cell na programovatelný zdroj elektrického napětí a zařízení pro chlazení aparatury a nastavil jsem podmínky elektroforézy. Proces jsem ukončil po vyplavení indikačního barviva bromfenolové modři z gelů. Podmínky procesu uvádí následující tabulka. Po ukončení elektroforézy jsem slil z aparatury pufr a vyjmul skleněné desky s gely. Ty jsem pak rozebral, označil a následně podrobil stříbření.

Tabulka 2; podmínky průběhu elektroforézy na přístroji PROTEAN II Multi-Cell

	El. proud	El. napětí	Příkon	Počet volthodin	Doba trvání
1. krok	5 mA/gel	500 V	100 W		1 hod 30 min
2. krok	40 mA/gel	500 V	100 W	1327 Vh	5 hod

3.6.1.6 Barvení gelů pomocí stříbření

Gely po elektroforéze jsem dal na 5 minut propláchnout v deionizované vodě na třepačce a pak jsem je přenesl do prvního roztoku na fixaci (F1), kde jsem je třepal 1 hodinu. Gely jsem přenesl do druhého fixačního roztoku (F2), kde zůstaly přes noc. Ráno jsem je opláchnul 5 minut v deionizované vodě vychlazené na 4°C a poté přenesl do roztoku

glutaraldehydu (F3) na půl hodiny. Poté jsem je 3x propláchnul deionizovanou vodou, vždy po 10 minutách. Pak jsem gely ponechal v 0,05% roztoku NDS (F4), 2x po půl hodině, vždy v čerstvém roztoku. Po opláchnutí vychlazenou deionizovanou vodou 4x po 15 minutách jsem gely dal na půl hodiny do čerstvého amoniakálního roztoku stříbra (F6), a opláchnul 4 krát vychlazenou deionizovanou vodou po 15 minutách. Pak jsem gely ponořil do vychlazeného roztoku vývojky (F8) a počkal, dokud se skvrny na gelech dostatečně vyvinou. Pak jsem je opláchnul 15 minut v přerušovací lázni (F9), dále 10 minut v deionizované vodě a následně jsem je ponořil na 3 hodiny do třetího fixačního roztoku (F10). Nakonec jsem je usušil v celofánové folii.

3.6.1.7 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu na přístroji PROTEAN Plus Dodeca Cell

Gely ve skleněných deskách se zakotvenými IPG-proužky jsem umístil do přístroje PROTEAN Plus Dodeca Cell. Pak jsem postupoval obdobně, jako u aparatury PROTEAN II Mult-Cell. Příslušné hodnoty během procedury jsou níže v tabulce. Takto zpracované gely jsem poté obarvil pomocí barviva Coomassie blue G-250.

Tabulka 3; podmínky průběhu elektroforézy na přístroji PROTEAN DODECA Plus Cell

	El. proud	El. napětí	Příkon	Počet volthodin	Doba trvání
1. krok	5 mA/gel	500 V	100 W		1 hod 30 min
2. krok	40 mA/gel	500 V	100 W	1453 Vh	7 hod 35 min

3.6.1.8 Barvení gelů pomocí Colloidal Blue Staining KIT

Jednotlivé gely jsem barvil pomocí naředěného komerčního setu Colloidal Blue Staining KIT (E1). Procedura probíhla přes noc na třepače a ráno jsem gely přenesl do deionizované vody pro odbarvení. Průběžně jsem měnil vodu a další den jsem gely zatavil do celofánové folie společně s 20% roztokem síranu amonného (E2) a uschoval v lednici do dalšího zpracování.

3.7 Digitalizace gelů

Gel jsem skenoval na přístroji KODAK Image Station 2000R. Takto jsem získal digitalizované obrazy jednotlivých stříbrných gelů, které byly dále vyhodnocovány pomocí softwaru PDQuest pro srovnávací analýzu.

3.8 Srovnávací analýza pomocí softwaru

Cílem srovnávací analýzy je porovnat a vyhodnotit expresi proteinů detekovaných na jednotlivých gelech. Gely připraveny ze vzorků bakterií kultivovaných za určité teploty byly vždy porovnány vůči ostatním. Jelikož cílem práce nebylo provést kompletní proteomovou analýzu, pro každou teplotu kultivace byly připraveny pouze dva stříbřené gely. Toto množství sice neumožňuje kompletní, statisticky vyhodnocenou analýzu, ale poskytuje dostatečně podrobný obraz pro nalezení proteinů s výraznou změnou exprese v závislosti na různé teplotě.

Vzhledem k náročnosti byla vlastní srovnávací analýza prováděna Mgr. Jurajem Lenčem.

3.9 Příprava proteinových skvrn pro identifikaci pomocí MALDI-TOF hmotnostního spektrometru

Principem přípravy vzorku je nejprve za použití sekvenčně specifické proteázy trypsinu rozštěpit proteiny na menší peptidy, jejichž molekulové hmotnosti jednoznačně identifikují daný protein a jsou tedy vlastním předmětem měření na přístroji MALDI-TOF. Po enzymatickém štěpení následuje vymytí peptidů z gelu.

Vybrané proteinové skvrny jsem vyhledal na modřených gelech, vyřezal, a v mikrozkušavkách jsem je smíchal s 200 μ l promývacího a dehydratačního pufru (G2). Vzorky jsem pak inkuboval 30 minut v termomixeru při 30 $^{\circ}$ C a rychlosti třepání 1500 rpm. Potom jsem zkumavky odstředil ve Speed-Vacu, supernatant odstranil a ke gelům jsem přidal 200 μ l štěpícího a ekvilibračního pufru (G3) a vzorky nechal 30 min třepat

v termomixeru při 30°C a 1500 rpm. Pak jsem odstranil supernatant a vzorky sušil 30 minut ve Speed-Vacu do kompletního zaschnutí. Následně jsem si připravil roztok trypsinu ve štěpícím a ekvilibračním pufru (G4). Vysušené gely jsem pak smísil s 5,0 μ l tohoto roztoku a v lednici nechal 30 minut botnat. Pak jsem vzorky převrstvil přibližně 50 μ l štěpícího a ekvilibračního pufru a inkuboval přes noc při 37°C v termomixeru při 1500 rpm. Trypsinové štěpení jsem ráno ukončil přidavkem 30 μ l 0,1% roztoku TFA v ACN (G5), zkumavky zcentrifugoval a supernatant přenesl do termomixeru na 30 minut při 1500 rpm a 25°C. Na měřicí terčik hmotnostního spektrometru MALDI-TOF jsem nanesl po 0,5 μ l roztoku od každého vzorku a po mírném zaschnutí jsem kapky převrstvil 0,5 μ l roztoku matrice (G7) a nechal zcela zaschnout. Na terčik jsem také nanesl 1 μ l vzorku Peptide calibration MIX 1 1000-2500 Da ve směsi s roztokem matrice (F7).

3.10 Vlastní MALDI-TOF analýza

Hmotnostní spektrometrie pomocí přístroje MALDI-TOF MS je analytická metoda, která měří molekulové hmotnosti sloučenin. Vzorky se nanášejí na měřicí terčik ve směsi s matricí. Matrice absorbuje energii z laserového zdroje přístroje, excituje se a navozuje přechod vzorku do plynné fáze. Matrice přenáší jeden kladný náboj na molekuly vzorku ($M-H^+$). Rozlišovací schopnost MALDI-TOF MS lze zlepšit pomocí tzv. opožděné extrakci iontů (time-delayed ion extraction), kdy se ionty vzniklé po aplikaci laserového pulsu ponechají v oblasti zdroje po určitou dobu volně migrovat. Až poté se aplikuje urychlující potenciál, čímž se kompenzuje ztráta rozlišení vlivem distribuce kinetických energií iontů při ionizaci. K separaci iontů dochází během jejich letu trubicí (vlastní hmotnostní analyzátor), kde se ionty pohybují různou rychlostí v závislosti na poměru hmotnosti a náboje (efektivních hmotností m/z) a v různém čase dopadají na iontový detektor. Výstupem je hmotnostní spektrum jako závislost intenzity píku na efektivní hmotnosti m/z .

Kovový terčik se vzorky jsem vložil do přístroje a pomocí programu VOYAGER CONTROL PANEL jsem nastavil základní nastavení měření.

Kalibrace přístroje se provádí pomocí měření vzorku standardu. Odstřelováním vzorku laserovým paprskem jsem zahájil měření, které jsem opakoval 2-3x. Získaná spektra se akumulují. Kalibrace přístroje a následnou úpravu spekter jsem provedl pomocí programu DATA EXPLORER. Výstupem měření byly číselné hodnoty naměřených píků, tzn. molekulové hmotnosti peptidů.

3.11 Vyhodnocování spekter

Vyhodnocování získaných spekter se provádí pomocí programu PROTEIN PROSPECTOR, který se nachází na adrese <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>. Principem je porovnání naměřených hodnot s teoretickými hodnotami všech proteinů, které jsou uloženy v příslušných databázích.

Číselné hodnoty píků jsem vložil do programu PROTEIN PROSPECTOR MS – FIT. Nastavil jsem parametry, podle kterých dojde k jejich porovnání s teoretickými spektry ve vybrané databázi. Dále jsem zadal použité štěpení, chybu měření, modifikace, organismus a missed cleavages– číslo udávající, kolik cílových míst proteasy v peptidu zůstalo nedotčeno, viz tabulka nastavení parametrů.

Výsledkem je seznam proteinů a jejich sekvencí, jejichž teoretickému spektru s určitou pravděpodobností odpovídá spektrum naměřené. U každého proteinu v seznamu je uvedeno:

-
- „MOWSE Score“, číslo, které udává, s jakou pravděpodobností se jedná o daný protein (čím větší, tím lepší, minimum 20)
- Hodnota „Masses matched“ uvádí, kolik ze zadaných píků se shoduje s píky teoretického spektra proteinu
- Teoretická molekulová hmotnost a pI
- „Accession Number“, přístupové číslo proteinu v mezinárodní databázi
- „Species“, druh, u kterého byl protein identifikován
- Název proteinu

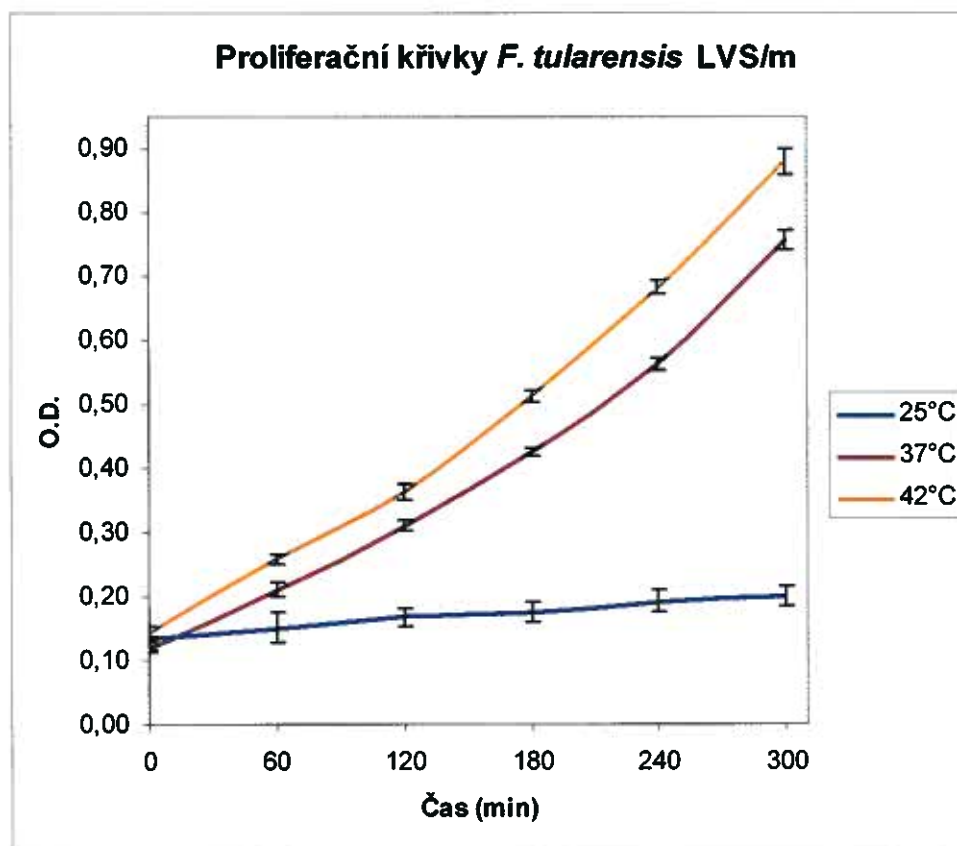
Tabulka 4; parametry nastavené v programu PROTEIN PROSPECTOR MS-fit

Srovnávací databáze	NCBI nr.2006.02.16
Organismus	FRANCISELLA TULARENSIS
Minimální počet shodných píků	4
Tolerance hmotnosti píku	+/- 100 ppm
Štěpící enzym	Trypsin
Modifikace cysteinu	karbamidomethylace iodoacetamidem
Možné modifikace	Oxidace methioninu Dehydratace N-terminálního glutaminu za tvorby pyroglutamátu Acetylace N-konce peptidu

4 Výsledky

Bakterie jsem kultivoval při teplotě 37°C 270 minut, při teplotě 42°C 240 minut a při teplotě 25°C po dobu 22 hod. V průběhu pokusu jsem průběžně zaznamenával hodnoty optické density pro sestrojení proliferačních křivek, jak je znázorněno v grafu 1. Celkově jsem získal devět vzorků buněčných suspenzí v LPA pufru, vždy tři vzorky z kultivace při dané teplotě.

Graf 1; proliferační křivky kultivace bakterie *F. tularensis* za různých teplot



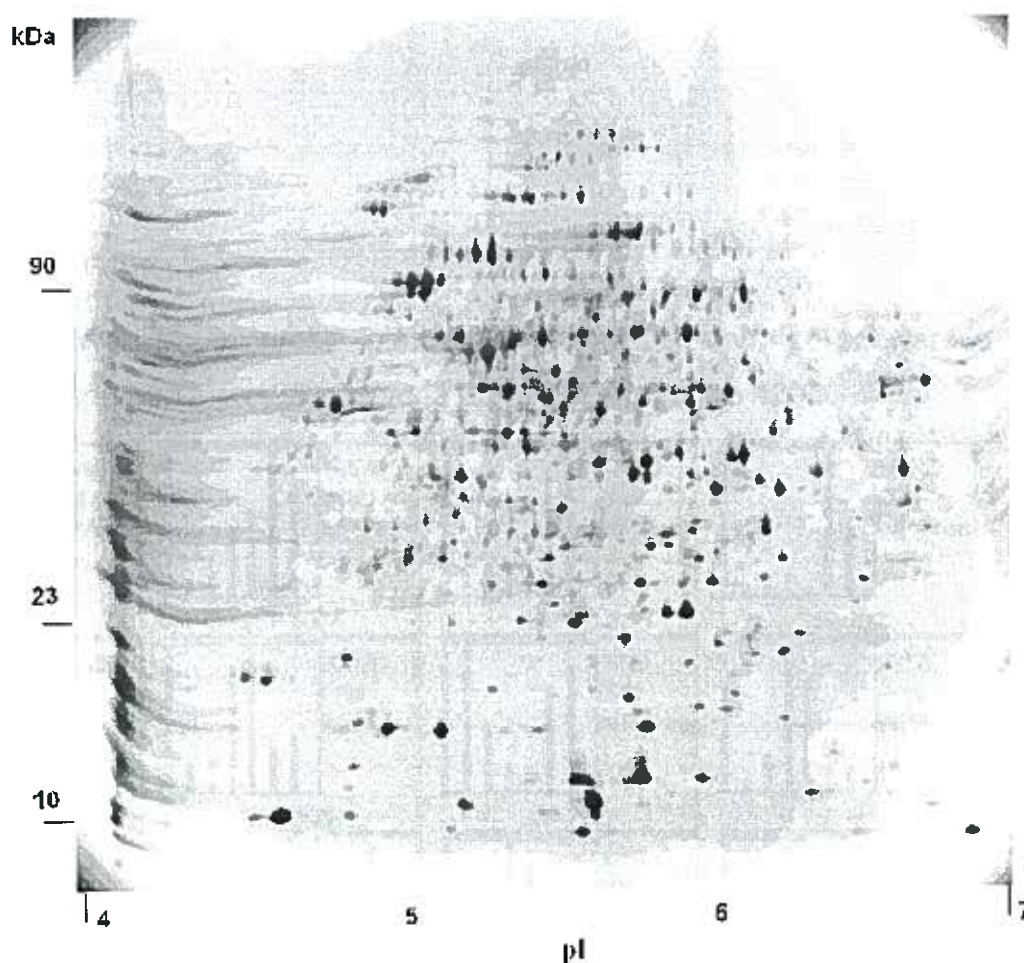
Vzorky z UP-D pufru jsem pro následné měření koncentrace zpracoval metodou přesrážení. Jako standarda pro kalibrační křivku je hovězí albumin dodávaný jako součást komerčně vyráběného kitu. Následující tabulka uvádí výsledky měření na spektrofotometru.

Tabulka 5; výsledky měření koncentrace bílkoviny ve vzorcích

Vzorek číslo	Název vzorku	Absorbance	Koncentrace v mg/ml	Průměrná koncentrace v mg/ml
1	LK 37 A	0,376	1,8027	1,846
		0,377	1,8893	
2	LK 37 B	0,499	3,0194	2,8613
		0,465	2,7032	
3	LK 37 C	0,436	2,4322	2,2742
		0,491	2,1161	
4	LK 42 A	0,325	1,4119	1,2372
		0,287	1,0625	
5	LK 42 B	0,530	3,3051	3,1853
		0,504	3,0655	
6	LK 42 C	0,538	3,3743	3,5831
		0,583	3,7918	
7	LK 25 A	0,504	3,0664	3,3735
		0,571	3,6785	
8	LK 25 B	0,842	6,1746	6,0668
		0,818	5,9589	
9	LK 25 C	0,882	6,5433	5,7432
		0,708	4,9431	

Výsledky z měření koncentrace bílkovin jsem použil k výpočtům objemů nanášky odpovídající 500 μg a 75 μg proteinu na jeden IPG-proužek. Zbytek do objemu 350 μl jsem doplnil roztokem RTS-D s IPG puforem 4-7. Po jejich isoelektrické fokusaci, ekvilibraci a vlastní elektroforéze jsem získal dvě série gelů. První jsem detekoval stříbřením a použil jsem ji pro digitalizaci a následné vyhodnocení pomocí softwaru PDQuest. Sérii gelů obarvených Coomassie Blue G-250 jsem uschoval jako vlastní zdroj proteinů určených pro MALDI-TOF analýzu. Ukázka stříbřeného gelu je na obrázku 2.

Obrázek 2; stříbřený gel vzorku LK 37 B, kultivační teplota 37°C

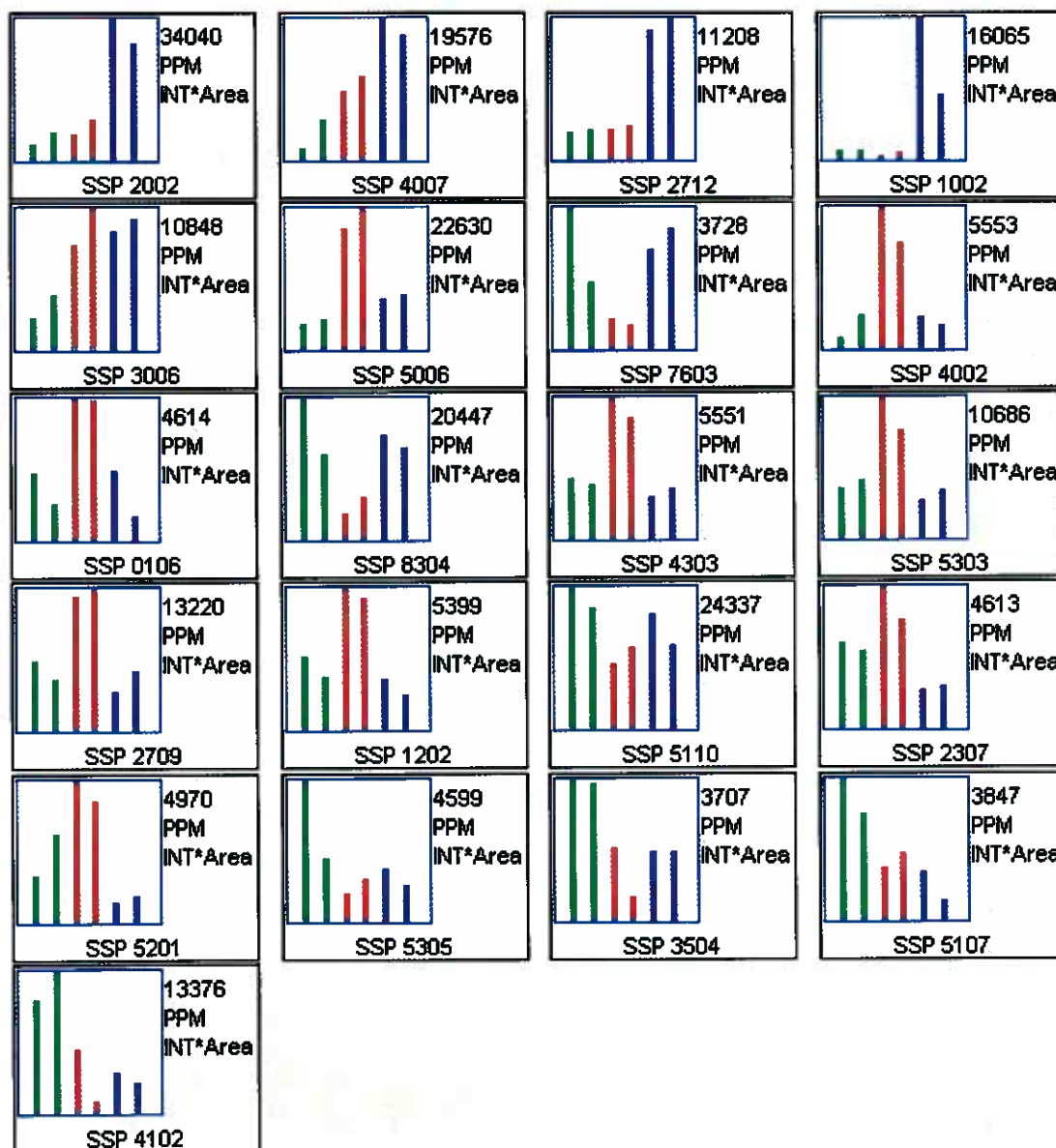


Během softwarové analýzy bylo vybráno celkem 21 proteinových skvrn, u kterých byla pozorována nejméně dvojnásobná změna v expresi vlivem určité teploty. Graficky jsou změny znázorněny na obrázku 3, který zobrazuje vybrané profily jednotlivých skvrn. Z těchto 21 vybraných skvrn jsem na modřených gelech vyhledal, vyřezal a měření na MALDI-TOF podrobil 20 z nich, jedna skvrna nebyla pomocí modření detekována.

Celkem jsem získal 18 MALDI-TOF spekter, neboť vzorky ze dvou skvrn generovala spektra bez výrazných píků. Z těchto 18 spekter jsem v programu PROTEIN PROSPECTOR MS-FIT získal 11 signifikantních identifikací, 7 proteinů tedy identifikováno nebylo. Celkově shrnuto, ve 21

vybrané skvrně jsem identifikoval 7 různých proteinů, jak je patrné z tabulky 6.

Obrázek 3; kvantifikační profily jednotlivých proteinových skvrn ze softwarové analýzy; zelená barva pro 25°, červená pro 37° a modrá pro 42°C

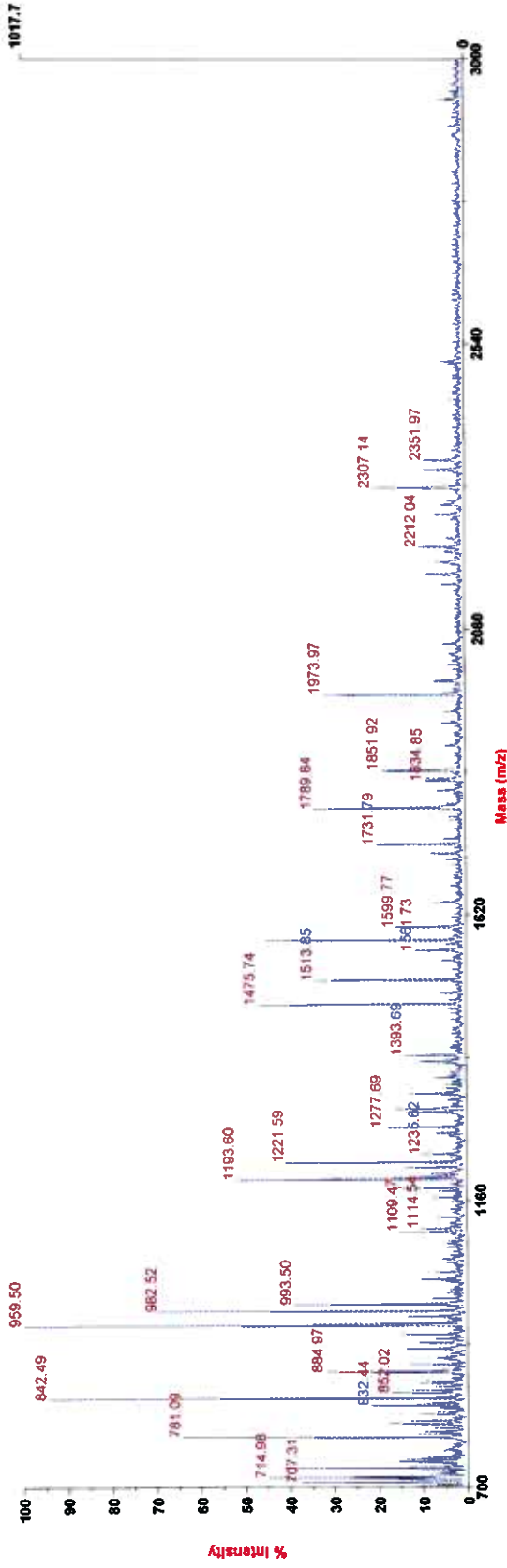


Tabulka 6; výstup z databáze PROTEIN PROSPECTOR MS-FIT

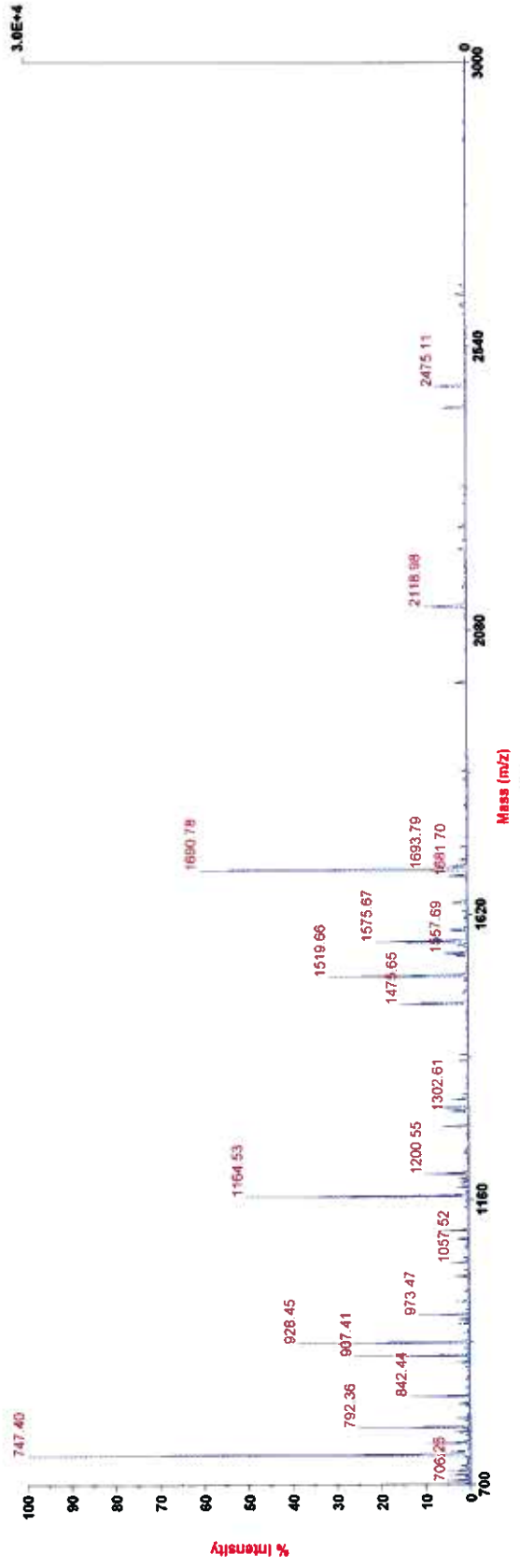
Číslo spoty	MOWSE score	Název proteinu	Mr/pi	Pokrytí sekvence	Accession No.	Počet píků
0106	667	Inorganic pyrophosphatase	19602/4.9	21	YP_170013	4/7
1202	9.456e+07	Triosephosphate isomerase	27656/5.0	26	YP_169155	6/27
2002	3904	Chaperonin protein, groES	10245/5.5	36	YP_170600	6/16
2307	218	Capsule biosynthesis protein capB	44894/7.0	9	YP_169812	4/60
2709	2.591e+05	30S ribosomal protein S1	61590/5.2	20	YP_169244	10/18
2712	191	Riboflavin biosynthesis protein ribD	39580/9.2	16	YP_170577	5/15
4007	1.068e+05	Chaperonin protein, groES	10245/5.5	56	YP_170600	9/16
4102	5536	Intracellular growth locus, subunit C	22433/5.9	24	YP_170617	5/16
4303	5.483e+04	Protein chain elongation factor EF-Ts	30988/5.6	32	YP_169363	8/15
5006	4844	Heat shock protein	16712/5.6	40	YP_170678	4/13
5303	3.194e+07	Protein chain elongation factor EF-Ts	30988/5.6	47	YP_169363	14/26
7603	840	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II	44080/5.8	14	YP_170326	5/31
8304	1351	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit	30095/6.1	24	YP_169538	6/19

Obrázek 4; ukázky MALDI-TOF spekter změřené z proteinových skvrn 2709 a 5303.

Voyager Spec #1=>AdvBC(32,0.5,0.1)->NF0.7[BP = 959.5, 1018]



Voyager Spec #1=>AdvBC(32,0.5,0.1)->NF0.7[BP = 747.4, 29876]



5 Diskuse

Pomocí metody 2D-PAGE a následném měření na přístroji MALDI-TOF jsem získal identifikace proteinů bakterie *F. tularensis*, které produkuje během teplotního stresu.

Celkově se mi podařilo identifikovat 7 proteinů, z nichž některé představují známe faktory virulence bakterie *F. tularensis*. U každého z enzymů uvádím jeho funkci a vztah k virulenci.

Podařilo se mi tak ověřit, že klasický proteomický přístup lze použít ke sledování změn exprese virulenčních faktorů bakterie *F. tularensis* vlivem teploty.

- **Anorganická pyrofosfatáza**

Tento enzym katalyzuje přeměnu difosfátu na fosfáty za odštěpení jedné molekuly ATP. Není známým faktorem virulence. Jeho exprese je výrazně snížena během růstu při 25 i 42°C.

- **Triózaefosfátisomeráza**

Tento enzym se účastní glykolýzy a glukoneogeneze, katalyzuje přeměnu D-glyceraldehyd-3-fosfátu na dihydroxyacetonfosfát. Není známým faktorem virulence. Jeho exprese je zvýšená během růstu v prostředí o teplotě 42°C.

- **Chaperoninový protein, groES, 10kDa**

Zástupce skupiny Hsp proteinů (Heat-shock proteins), jejich zvýšená exprese je pozorována u různých bakterií nejen během teplotního šoku. Jejich funkce spočívá v zabránění denaturace jiných proteinů během pobytu v nepříznivém prostředí. Některé studie ukazují, že se může jednat o imunogenní molekuly. Zvýšenou hladinu exprese tohoto proteinu jsem pozoroval během kultivace při 42°C.

- **30S ribozomální protein S1**

Tento protein je jednou ze složek prokaryotního ribozomu, proteosyntetické jednotky. Vzhledem ke zvýšené expresi mnoha proteinů během teplotního šoku není jeho vlastní zvýšení exprese udivující. Není známým faktorem virulence. Úroveň exprese tohoto proteinu je snížena během kultivace při 25 i 42°C.

- **Vnitrobuněčný růstový lokus, podjednotka C**

Také označován jako hypotetický 23 kDA protein. Vůbec první známý faktor virulence, jehož aminokyselinová sekvence nejeví podobnost s žádným dosud identifikovaným proteinem. Zvýšená exprese tohoto proteinu byla zjištěna během růstu uvnitř makrofágů nebo při působení peroxidu vodíku. Mutanty s poškozeným genem pro tento protein nebyly schopny intracelulárního růstu ani nevykazovaly cytopatogenní efekt. Jeho úroveň exprese je zvýšená během růstu při 25°C.

- **Elongační faktor EF-Ts**

Tento protein je nezbytný v procesu elongace polypeptidového řetězce během proteosyntézy. Regeneruje neaktivní formu EF-Tu GDP na její aktivní formu, EF-Tu GTP, která se přímo účastní proteosyntézy. Zvýšená hladina EF-Tu byla pozorována u některých intracelulárních parazitů během pobytu v makrofágu. Předpokládá se, že je jedním z faktorů, které umožňují přežít drsné prostředí panující v makrofázích, ačkoliv se nezdá, že by se jednalo o bezprostřední faktor virulence. Sníženou hladinu exprese tohoto proteinu jsem pozoroval během kultivace při 25 i 42°C.

- **3-oxoacyl-[acyl-přenašečový-protein] syntáza II**

Tento enzym se je zodpovědný za odštěpení CO₂ z molekul enzymů přenášející acetylmalonylovou skupinu za vzniku enzymů nesoucích skupinu acetoacetylovou. Není známým faktorem virulence. Exprese tohoto proteinu se zvyšuje během kultivace při teplotě 25 i 42°C.

- **Sukcinyl-CoA syntetáza, podjednotka alfa**

Enzym sukcinyl-CoA-syntetáza katalyzuje přeměnu sukcinátu a koenzymu A na koenzym A a fosfát, za účasti GTP nebo ATP. Není známým faktorem virulence. I u tohoto proteinu jsem pozoroval zvýšenou expresi při během kultivace při 25 i 42°C.

6 Závěr

Výsledky mé práce vedou k domněnce, že i u bakterie *F. tularensis* dochází vlivem teploty ke změně expresi proteinů, z nichž některé představují faktory virulence, podobně jako např. u bakterií *Yersinia pestis* a *Borrelia burgdorferi*. Na výsledky mé práce bude proto navazovat kompletní proteomová analýza stejných vzorků. Tato analýza nebude již prováděna pomocí klasického přístupu (za použití 2D-PAGE s návazností na MALDI-TOF), ale za pomoci metody nano-RP-HPLC/MSMS na přístroji ESI-QTOF.

Závěrem lze říci, že se mi podařilo identifikovat některé z proteinů, které představují faktory virulence bakterie *F. tularensis* a ověřit tak, že 2D-PAGE je metodou vhodnou k jejich vyhodnocování.

K problematice optimalizace procesu přístroje PROTEAN Plus Dodeca Cell lze dodat, že jsem přístroj s úspěchem vyzkoušel, nicméně proces jeho zavedení do rutinní praxe vyžaduje více času, než který jsem měl v této oblasti v rámci diplomové práce vyčleněn.

7 Literatura

1. Sjostedt A. Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes Infect.* 2006 Feb;8(2):561-7. Epub 2005 Sep 15
2. Tarnvik A, Berglund L. Tularaemia. *Eur Respir J.* 2003 Feb;21(2):361-73
3. McCoy GW, Chapin CW. Bacterium tularensis, the cause of a plague-like disease of rodents. *Public Health Bull* 1912; 53:17-23
4. Wherry WB, Lamb BH. Infection of man with *Bacterium tularensis*. *J Infect Dis* 1914; 15:331-340
5. McCoy G.W., Chapin C.W., Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularensis*, *J. Infect. Dis.* 10 (1912) 61-72
6. Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM Jr. Biological warfare. A historical perspective. *JAMA.* 1997 Aug 6;278(5):412-7
7. Dennis DT, 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 TM, Russell PK, Tonat K; Working Group on Civilian Biodefense. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 2001 Jun 6;285(21):2763-73
8. Petersen JM, Schriefer ME. Tularemia: emergence/re-emergence. *Vet Res.* 2005 May-Jun;36(3):455-67
9. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 2002 Oct;15(4):631-46
10. Whipp MJ, Davis JM, Lum G, de Boer J, Zhou Y, Bearden SW, Petersen JM, Chu MC, Hogg G. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J Med Microbiol.* 2003 Sep;52(Pt 9):839-42
11. Berdal BP, Mehl R, Meidell NK, Lorentzen-Styr AM, Scheel O. Field investigations of tularemia in Norway. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996 Mar;13(3):191-5

12. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Jan;69(1):600-6
13. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore).* 1985 Jul;64(4):251-69
14. Sjöstedt A., Family XVII. Francisellaceae, Genus I. *Francisella*, in: Brenner DJ (Ed.), *Bergey's manual of systemic bacteriology*, Springer-Verlag, New York, 2005
15. Bevanger L, Maeland JA, Kvan AI. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994 Mar;1(2):238-40
16. Viljanen MK, Nurmi T, Salminen A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with bacterial sonicate antigen for IgM, IgA, and IgG antibodies to *Francisella tularensis*: comparison with bacterial agglutination test and ELISA with lipopolysaccharide antigen. *J Infect Dis.* 1983 Oct;148(4):715-20
17. Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1996 Apr;54(4):364-6
18. Long GW, Oprandy JJ, Narayanan RB, Fortier AH, Porter KR, Nacy CA. Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993 Jan;31(1):152-4
19. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tarnvik A. Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997 May;35(5):1045-8
20. Versage JL, Severin DD, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5492-9

21. Farlow J, Smith KL, Wong J, Abrams M, Lytle M, Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. *J Clin Microbiol.* 2001 Sep;39(9):3186-92
22. Garcia Del Blanco N, Dobson ME, Vela AI, De La Puente VA, Gutierrez CB, Hadfield TL, Kuhnert P, Frey J, Dominguez L, Rodriguez Ferri EF. Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug;40(8):2964-72
23. Thomas R, Johansson A, Neeson B, Isherwood K, Sjostedt A, Ellis J, Titball RW. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):50-7
24. Alford RH, John JT, Bryant RE. Tularemia treated successfully with gentamicin. *Am Rev Respir Dis.* 1972 Aug;106(2):265-8
25. Enderlin G, Morales L, Jacobs RF, Cross JT. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clin Infect Dis.* 1994 Jul;19(1):42-7
26. Syrjala H, Herva E, Ilonen J, Saukkonen K, Salminen A. A whole-blood lymphocyte stimulation test for the diagnosis of human tularemia. *J Infect Dis.* 1984 Dec;150(6):912-5
27. Khatenever, L.M., 1943. The allergic diagnosis, specific prophylaxis and vaccine therapy of tularemia. p62-79. In E.B. Balsky, I.G. Kochergin and V.V. Porin (ed.) *Microbiology and Epidemiology*, Medical Publications Ltd, London
28. Sandstrom G. The tularaemia vaccine. *J Chem Technol Biotechnol.* 1994 Apr;59(4):315-20
29. Eigelsbacg HT, Downs CM. Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white mouse and guinea pig. *J Immunol.* 1961 Oct;87:415-25

30. Saslaw S, Eigelsbacg HT, Prior JA, Wilson HE, Carhart S. Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. Arch Intern Med. 1961 May;107:702-14
31. Hornick RB, Eigelsbach HT. Aerogenic immunization of man with live Tularemia vaccine. Bacteriol Rev. 1966 Sep;30(3):532-8
32. Hornick RB, Dawkins AT, Eigelsbach HT, Tulis JJ. Oral tularemia vaccine in man. Antimicrobial Agents Chemother (Bethesda). 1966;6:11-4
33. Conlan JW. Vaccines against Francisella tularensis--past, present and future. Expert Rev Vaccines. 2004 Jun;3(3):307-14
34. Tarnvik A, Eriksson M, Sandstrom G, Sjostedt A. Francisella tularensis--a model for studies of the immune response to intracellular bacteria in man. Immunology. 1992 Jul;76(3):349-54
35. Havlasova J, Hernychova L, Halada P, Pellantova V, Krejsek J, Stulik J, Macela A, Jungblut PR, Larsson P, Forsman M. Mapping of immunoreactive antigens of Francisella tularensis live vaccine strain. Proteomics. 2002 Jul;2(7):857-67
36. Havlasova J, Hernychova L, Brychta M, Hubalek M, Lenco J, Larsson P, Lundqvist M, Forsman M, Krocova Z, Stulik J, Macela A. Proteomic analysis of anti-Francisella tularensis LVS antibody response in murine model of tularemia. Proteomics. 2005 May;5(8):2090-103
37. Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Halltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjostedt A, Svensson K, Thompson N, Vergez L, Wagg JK, Wren BW, Lindler LE, Andersson SG, Forsman M, Titball RW. The complete genome sequence of Francisella tularensis, the causative agent of tularemia. Nat Genet. 2005 Feb;37(2):153-9. Epub 2005 Jan 9
38. Sandstrom G, Sjostedt A, Johansson T, Kuoppa K, Williams JC. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from Francisella tularensis LVS. FEMS Microbiol Immunol. 1992 Oct;5(4):201-10

39. Dreisbach VC, Cowley S, Elkins KL. Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect Immun*. 2000 Apr;68(4):1988-96
40. Kieffer TL, Cowley S, Nano FE, Elkins KL. *Francisella novicida* LPS has greater immunobiological activity in mice than *F. tularensis* LPS, and contributes to *F. novicida* murine pathogenesis. *Microbes Infect*. 2003 Apr;5(5):397-403
41. Reilly TJ, Baron GS, Nano FE, Kuhlenschmidt MS. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J Biol Chem*. 1996 May 3;271(18):10973-83
42. Baron GS, Reilly TJ, Nano FE. The respiratory burst-inhibiting acid phosphatase AcpA is not essential for the intramacrophage growth or virulence of *Francisella novicida*. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Jul 1;176(1):85-90
43. Baron GS, Nano FE. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol*. 1998 Jul;29(1):247-59
44. Sjostedt A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Feb;6(1):66-71
45. Gray CG, Cowley SC, Cheung KK, Nano FE. The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett*. 2002 Sep 24;215(1):53-6
46. Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Cheung KK, Roberts MJ, Ludu JS, Letendre GW, Meierovics AI, Stephens G, Elkins KL. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol*. 2004 Oct;186(19):6430-6
47. Twine S, Bystrom M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, Kelly J, Lindgren H, Svensson K, Zingmark C, Conlan W, Sjostedt A. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun*. 2005 Dec;73(12):8345-52

48. Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol.* 1992 Jan;174(1):1-7