

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Interakce intracelulárního patogena *Francisella tularensis*

LVS s myší monocyto - makrofágovou linií J774.2

(charakterizace lipidových raftů z myší monocyto – makrofágové linie J774.2 po interakci s intracelulárním patogenem *Francisella tularensis* LVS)

Bc. Miroslava Kalabusová

DIPLOMOVÁ PRÁCE
2009

**University of Pardubice
Faculty of chemical technology**

Interaction of intracellular pathogen *Francisella tularensis*

LVS with mouse macrophage - like cell line J774.2

(analysis of lipid rafts from mouse macrophage - like cell line J774.2
upon *Francisella tularensis* LVS internalization)

Bc. Miroslava Kalabusová

**DIPLOMA THESIS
2009**

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslava KALABUSOVÁ**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Interakce intracelulárního patogena Francisella tularensis LVS s myší monocyto-makrofágovou linií J774.2**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1) Teoretická část:

a) Obecný úvod o patogenezi bakterie Francisella tularensis - původce onemocnění, epidemiologie onemocnění, klinické příznaky, léčba, molekulární mechanismus patogeneze v primární infekci a charakteristika modelu infekce.

b) Rešerše o membránových raftech a jejich úloze v bakteriální infekci.

2) Praktická část:

a) Provedení synchronizované infekce, průkaz: metoda fluorescenční mikroskopie, metoda CFU.

b) Průkaz role membránových raftů při vstupu Francisella tularensis LVS do hostitelské buňky: metoda fluorescenční mikroskopie, metoda CFU.

c) Izolace detergent-rezistentních membrán (DRMs) na sacharózovém gradientu. Ověření správné izolace DRMs, metoda: western blot.

d) Kvantitativní proteomická analýza proteinového složení DRMs jako modelu membránových raftů po interakci s intracelulárním patogenem Francisella tularensis LVS.

e) Identifikace proteinů asociovaných s membránovými rafty po interakci s intracelulárním patogenem Francisella tularensis LVS.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

Mgr. Anetta Härtlová

FVZ UO Hradec Králové

Datum zadání diplomové práce:

1. října 2008

Termín odevzdání diplomové práce:

7. května 2009



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Miroslava Kalabusová

Mé poděkování věnuji:

Vedoucím pracovišť Centra pokročilých studií a Ústavu molekulární patologie, a to jmenovitě Prof. RNDr. Aleši Macelovi, DrSc., Doc. MUDr. Pavlu Bošíkovi, PhD. a Prof. MUDr. Jiřímu Stulíkovi, CSc. za poskytnutí výborných pracovních podmínek. Děkuji také své školitelce doc. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D. a odborné konzultantce Mgr. Anettě Härtlové za profesionální vedení, drahocenné rady a trpělivost. Za velmi přátelskou pracovní atmosféru vděčím všem pracovníkům Centra pokročilých studií a Ústavu molekulární patologie. Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům a příteli za podporu po dobu mého studia.

Souhrn a klíčová slova:

V průběhu minulého desetiletí bylo potvrzeno, že specializované membránové domény, známé též jako lipidové rafty, organizují biologické procesy uvnitř plazmatické membrány. Uspořádáním vybraných proteinů a lipidů dochází k tvorbě specifických signálních platforem, kde spolu molekuly vzájemně interagují. Stále větší počet intracelulárních bakterií využívá tyto domény pro svůj vstup a přežití uvnitř hostitelské buňky. *Francisella tularensis* LVS je fakultativně intracelulární patogen, který způsobuje onemocnění tularémie. Její virulence závisí na schopnosti přežít a množit se uvnitř fagocytující buňky. Cílem diplomové práce bylo charakterizovat role lipidových raftů monocyto – makrofágové linie J774.2 během interakce s *Francisellou tularensis* LVS pomocí fluorescenční mikroskopie a iTRAQ kvantitativně proteomické analýzy. Rozdílné proteiny asociované s rafty byly určeny po interakci s *Francisellou tularensis* LVS.

Klíčová slova: *Francisella tularensis* LVS, intracelulární patogen, makrofág, J774.2 buněčná linie, lipidové rafty, iTRAQ kvantitativní proteomická analýza

Summary and keywords:

Over the past decade it has become apparent that specialised membrane microdomains, commonly called lipid rafts, organize biological processes within plasma membrane by sorting selected proteins and lipids to form a signal platform. A growing number of various bacteria uses these domains as an infectious strategy to survive inside host cells. *Francisella tularensis* LVS is a facultative intracellular pathogen that causes a tularaemia disease. Its virulence depends on the ability to survive and replicate in the cytosol of infected phagocytes. The aim of our study was to examine the role of membrane rafts of macrophage-like cell line J774.2 in the interaction with *Francisella tularensis* LVS early interaction using microscopy and iTRAQ quantitative proteomic approach. The different raft-associated proteins upon *Francisella tularensis* LVS interaction were determined.

Keywords: *Francisella tularensis* LVS, intracellular pathogen, macrophage, J774.2 cell line, lipid rafts, iTRAQ quantitative proteomic analysis

Seznam zkratek:

AMK	aminokyselina
APS	persíran amonný
bb	buňky
BIS	bisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
CD	diferenciační antigen (cluster of determination)
CFU	jednotka formující kolonie (Coloni forming unit)
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenylindol
DMEM	Eaglovo kultivační medium modifikované dle dulbecco (Dulbecco's modified Eagle medium)
DMSO	dimetylsulfoxid
DRMs	detergent rezistentní membrány (detergent resistant membranes)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
eNOS	endoteliální syntézy oxidu dusného (endothelium nitric oxide synthetase)
FCS	fetální telecí sérum (fetal calf serum)
FTSI	fetální telecí sérum inaktivované
GEM	mikrodomény bohaté na glykosfingolipidy (glycosfingolipid-enriched microdomains)
GPI	glykosylfosfatidylinositol

CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
IFN- γ	interferon gama
IgG	imunoglobulin gama
IL-1	interleukin 1
IL-6	interleukin 6
LAMP	lysozomální membránový protein (lysosome-associated membrane protein)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LPS	lipopolysacharid
LVS	živý vakcinační kmen (live vaccine strain)
MALDI	laserová ionizace na matrici (Matrix-assisted laser desorption/ionization)
MBCD	metyl beta cyklodextrin
MBL	lektin vážící mannózu (mannose-binding lectin)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MOI	multiplicita infekce
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NF κ B	nukleární faktor kappa B
NK	přirozený zabíječ (natural killers)
NO	oxid dusnatý (nitric oxide)

O.D.	optická denzita
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy (pathogen associated molecular patterns)
PBS	fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku (phosphate buffered saline)
PRR	patogenní protilehlé receptory (pathogen recognition receptors)
PVDF	polyvinylidenfluorid
rDNA	ribosomální deoxyribonukleová kyselina
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulfate)
TBS	tris-fosfátový pufr (tris buffered saline)
TEMED	N,N,N,N-tetrametylendiamid
TLR	receptory skupiny Toll (Toll – like receptor)
TRIS	Tris(hydroxymetyl)aminometan
TNF α	tumor-nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor)
TOF	hmotnostní analyzátor (time of flight)

Obsah:

1. Úvod	11
2. Teoretická část	12
2.1 Francisella tularensis a tularémie	12
2.1.1 Původce onemocnění - Francisella tularensis	12
2.1.2 Epidemiologie nemoci	13
2.1.3 Klinické příznaky	14
2.1.4 Léčba	15
2.1.5 Prevalence onemocnění na území České republiky	15
2.1.6 Francisella tularensis – biologická zbraň	16
2.2 Role přirozené imunity v obraně proti intracelulárním bakteriím	16
2.2.1 Úloha makrofágů v obraně proti intracelulárním bakteriím	16
2.2.2 Úloha makrofágů v tularémické infekci	18
2.3 Membránové rafty a bakteriální infekce	20
2.3.1 Membránové rafty – nový pohled na model plazmatické membrány ...	20
2.3.2 Membránové rafty a intracelulární bakterie	23
3. Experimentální část	25
3.1 Chemikálie a roztoky	25
3.2 Kultivace buněčné monocytární - makrofágové linie J774.2	28
3.2.1 Buněčná linie	28
3.2.2 Základní pravidla při práci s buněčnými liniemi	28
3.2.3 Pasáž buněk	29
3.2.4 Stanovení viability a počtu buněk	29
3.2.5 Uchovávání a rozmrazování buněk	30
3.3 Kultivace bakterií	30
3.3.1 Bakteriální kmen	30
3.3.2 Bakteriální suspenze	30
3.4 Postup infekce	31
3.4.1 Synchronizovaná fagocytóza	31
3.5 Deplece cholesterolu	31

3.5.1	Deplece cholesterolu - princip metody	31
3.5.2	Deplece cholesterolu – vlastní provedení	32
3.5.3	Fluorescenční mikroskopie - princip metody	32
3.5.4	Fluorescenční mikroskopie – vlastní provedení	32
3.6	Metoda CFU	33
3.6.1	CFU metoda- princip metody	33
3.6.2	Postup CFU	34
3.7	Izolace detergent rezistentních membrán na sacharózovém gradientu	
	34	
3.7.1	Lyzování buněk.....	34
3.7.2	Izolace lipidových raftů	34
3.8	Určení raftové oblasti western blotem	35
3.8.1	Western blot – princip metody.....	35
3.8.2	Postup Western blot	35
3.9	Stanovení bílkoviny.....	36
3.9.1	Princip stanovení koncentrace bílkoviny	36
3.9.2	Postup stanovení koncentrace bílkoviny.....	36
3.10	Proteomická analýza detergent – rezistentních membrán.....	37
3.10.1	Hmotnostní spektrometrie – princip metody	37
3.10.2	iTRAQ kvantitativní proteomická analýza	38
3.11	Použité pomůcky a přístroje	39
4.	Výsledky	42
4.1	Model interakce <i>Francisella tularensis</i> LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2	42
4.1.1	Přímá interakce <i>Francisella tularensis</i> LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 – fluorescenční mikroskopie	42
4.1.2	Přímá interakce <i>Francisella tularensis</i> LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 – metoda CFU	44
4.2	Vstup <i>Francisella tularensis</i> LVS přes lipidové rafty	44
4.2.1	Vstup <i>Francisella tularensis</i> LVS přes lipidové rafty – metoda fluorescenční mikroskopie	44
4.2.2	Vstup <i>Francisella tularensis</i> LVS přes lipidové rafty – metoda CFU ..	46

4.3	Izolace detergent – rezistentních membrán (DRMs) buněk J774.2	47
4.4	iTRAQ kvantitativní proteomická analýza DRMs izolovaných z buněk J774.2 po interakci s <i>Francisellou tularensis</i> LVS	48
5.	<i>Diskuze</i>	55
6.	<i>Závěr</i>	57
7.	<i>Přílohy</i>	58
8.	<i>Seznam literatury</i>	61

1. Úvod

Organismus jako celek má vyvinuté ochranné mechanismy, které ho chrání před napadením patogenů. Tuto obranou linii tvoří imunitní systém svými antigenně nesespecifickými a specifickými složkami. Obě složky imunitního systému spolu navzájem spolupracují a snaží se nás chránit před napadením škodlivými patogeny. Současně i patogenní mikroorganismy vyvinuly mnoho důmyslných strategií, jak naopak uniknout před „dozorem“ imunitního systému. Jde tedy o střet dvou strategií, imunity na straně jedné a patogena na straně druhé, které ovlivňují výsledek vzájemné interakce mikroba a hostitele.

Francisella tularensis se řadí mezi fakultativně intracelulární patogeny. Intracelulární bakterie mají schopnost přežít a množit se uvnitř makrofágů, kde nacházejí příznivé prostředí. Jakým způsobem bakterie vstupuje do buňky není zatím zcela objasněno. V minulém roce vyšla publikace zabývající se vstupem bakterie do hostitelské buňky přes specializované membránové útvary tzv. lipidové rafty. Předpokládá se, že bakterie vstupem přes lipidové nebo-li membránové rafty do hostitelské buňky ovlivňuje svůj osud uvnitř buňky. Pochopení způsobu využití lipidových raftů bakteriemi ve svůj prospěch je stále předmětem výzkumu.

Cílem této diplomové práce je charakterizovat roli lipidových raftů hostitele během interakce intracelulárního patogena *Francisella tularensis* LVS s makrofágy na modelu myší monocyto - makrofágové linie J774.2.

2. Teoretická část

2.1 *Francisella tularensis* a tularémie

Historie onemocnění pochází z 18. století z Japonska, kdy byly nalezeny první zmínky o tularémii. Bakterii *Francisella tularensis* poprvé jako etiologické agens plakovitého onemocnění pozemních veverek izolovali McCoy a Chaplin roku 1911 ve městě Tulare v Kalifornii. Podle místa prvního nálezu získal mikroorganismus název *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, který bakterie izoloval z hnisu bobonů osob trpících nemocí zvanou deer-fly-fever. Na jeho počest byla také později bakterie přejmenována na *Francisella tularensis*.¹

2.1.1 Původce onemocnění - *Francisella tularensis*

Francisella tularensis (*F. tularensis*) je malá, polymorfní, nepohyblivá bakterie žijící v aerobním prostředí. Je to fakultativně intracelulární, gramnegativní kokobacil dosahující velikosti 0,2 až 0,5 µm na 0,7 až 1,0 µm. Bakterie vyvolávají onemocnění zvané tularémie, někdy označované jako zaječí nemoc.

Na základě analýz složení mastných kyselina, 16S rDNA sekvenace, analýz polymorfismu délky restričních fragmentů, analýz virulence, patogenity a geografického rozšíření dělíme *F. tularensis* do čtyř podtypů:

- *F. tularensis* subspecies *tularensis* – varianta dominující na severoamerickém kontinentu. Jedná se o vysoce virulentní kmen pro člověka i většinu hospodářských zvířat. Ve starších zdrojích bývá označován také jako typ A, který je evolučně nejstarší. Nejnižší infekční dávkou způsobující onemocnění je asi 10 CFU. Většinou bývá získán od králíků nebo přenesen klíšťaty, která na nich cizopasí.
- *F. tularensis* subspecies *holartica* – varianta rozšířená po celé severní polokouli, způsobující mírnější formu onemocnění. V Severní Americe se tento podtyp vyskytuje

u vodních hlodavců. V Evropě a Asii je výskyt spojen s drobnými hlodavci, zajíci, ptáky a klíšťaty, u nichž je hlavním vyvolavatelem onemocnění. Tato varianta se vyznačuje velkou odolností 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 *mediasiatica* – 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.^{2,3}

2.1.2 Epidemiologie nemoci

Tularémie se řadí mezi nákazy s přírodní ohniskovostí. Jedná se o antropozoonózu tj. nemoc postihující primárně zvířata, která však může být sekundárně přenesena i na člověka. Bakterie způsobující onemocnění se vyznačují snadnou šířitelností a vysokou virulencí. Inhalace dávkou obsahující 10 CFU nejvíce virulentní *F. tularensis* subtyp *tularensis* vede u neléčených jedinců až k 30% mortalitě.⁴

Přírodním rezervoárem onemocnění jsou divoce žijící zvířata, zejména hlodavci, divocí králíci, zajíci, krtek, ondatry, veverky, křečci, syslové a další. Onemocnění je možné získat přes vektor, nejčastěji se jedná o klíšťata, ovady a komáry. Členovci nejsou nejčastějšími vektory přenosu onemocnění na člověka. Častěji dochází k infekci člověka poraněním při odchytu, stahování a porcování nemocných zvířat. Výjimku netvoří 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.⁵

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 dnů, v závislosti na virulenci kmene a velikosti infekční dávky. Uvádí se, že inhalace již 10 CFU může vyvolat smrt organismu.⁴ Klinické projevy infekce závisí na bráně vstupu agens do těla. Tularémie se může manifestovat v těchto formách:

- 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 vředovatěním, 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.⁶

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 – gentamycinem podávaným intravenózně po dobu 14 dnů.

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.⁷

2.1.5 Prevalence onemocnění na území České republiky

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 podle informací státní veterinární správy známo zhruba 120 přírodních ohnisek nákazy. Trvalý výskyt tularémie byl zaznamenán v Jihomoravském kraji, občasná ohniska nákazy jsou hlášena z krajů Jihočeského, Královéhradeckého a Pardubického.⁸

2.1.6 Francisella tularensis – biologická zbraň

Francisella tularensis subsp. *tularensis* a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* jsou řazeny do skupiny A - potenciálně biologických zbraní, i když tularémie není nějak rozšířené onemocnění. Po roce 2001 se zvýšil vědecký zájem o tularémii především z důvodu reálné hrozby bioterorismu. Nebezpečí spočívá ve snadném šíření bakterií aerosolem, vysoké nakažlivosti, odolnosti bakterií před vnějšími vlivy, nízké infekční dávce a schopnosti způsobit až smrt.^{9,10}

2.2 Role přirozené imunity v obraně proti intracelulárním bakteriím

2.2.1 Úloha makrofágů v obraně proti intracelulárním bakteriím

Vniknutím patogenního agens do organismu dochází k aktivaci ochranné zánětlivé reakce zprostředkované imunitním systémem. Imunitní systém zahrnuje dva základní spolupracující mechanismy obrany. Buněčné a humorální složky nespecifických mechanismů se vyznačují rychlou reakcí na přítomnost antigenu v organismu. Zahrnují především fagocyty buňky, cytotoxické NK buňky a komplementový systém. Po nespecifickém rozpoznání antigenu a jeho zpracování dochází k aktivaci specifické imunity, která je charakterizována tvorbou protilátek specifických k dané antigenní determinantě a rozvoji komplexní obranné reakce. S tím souvisí tvorba imunologické paměti zprostředkovaná T a B - lymfocyty.

Za klíčové buňky v obranné imunitní reakci hostitele proti invadujícímu patogenu jsou považovány profesionální fagocyty, jejichž charakteristickým rysem je eliminace patogena prostřednictvím fagocytózy.¹¹ Do skupiny profesionálních fagocytů se řadí neutrofilní, eozinofilní granulocyty, aktivované monocyty a makrofágy. Přes určité rozdíly v receptorové a enzymatické výbavě je většina charakteristik pro tyto různé buňky shodná.¹²

Jako první infiltrují zánětlivou oblast neutrofilny. Neutrofilny žijí krátce a nemají schopnost prezentovat antigen. Po pohlcení nebezpečného patogenu dochází k jeho zničení působením kyslíkových radikálů s výrazným baktericidním účinkem.¹³

Mezi další neméně důležité efektorové buňky přirozené imunity patří makrofágy. Makrofágy plní ve vztahu k likvidaci patogenu tři hlavní funkce: mají

schopnost pohlcovat patogenní mikroorganismy a vše, co do organismu nepatří, následně antigen zpracovat na menší fragmenty, které prezentují na svém povrchu. Povrchové antigeny jsou dále rozpoznávány T-lymfocyty, čímž dochází k indukci antigenně specifické imunitní odpovědi.¹⁴

Makrofágy mají schopnost v infikovaných tkáních svými rozpoznávacími mechanismy odhalit struktury na povrchu mikroorganismů. Jedná se o skupinu různých molekul, jejichž struktura je typická pro jednotlivé mikroorganismy jako např. endotoxiny gramnegativních bakterií, peptidoglykany, glukany, fosfolipidy atd. souhrnně označené jako PAMP struktury (pathogen associated molecular patterns – molekuly asociované s patogenem). Tyto molekuly jsou rozpoznávány prostřednictvím tzv. PRR (pathogen recognition receptors – receptory rozpoznávající patogeny), které jsou exprimovány převážně na antigen – prezentujících buňkách (makrofágy a dendritické buňky).¹⁵ Hlavní úlohou receptorů rozpoznávající patogeny je opsonizace, aktivace komplementu, fagocytóza, aktivace prozánětlivých signálních cest a indukce apoptózy. Většina z těchto receptorů zprostředkovává na povrchu makrofágů fagocytózu mikroorganismů. Jedná se o manózoový receptor, scavenger receptor, komplementový receptor, Fc – receptor a skupinu TLRs (Toll – like receptors).¹⁶

Mezi nejlépe prostudované povrchové receptory rozpoznávající patogeny přímo patří skupina TLRs. Jejich název je odvozen od receptoru popsáno u mušky octomilky (*Drosophila*). V současné době je známo 13 TLRs.¹⁷

Kromě povrchových receptorů rozpoznávací antigen, existují také receptory reagující na antigen uvnitř buňky. Tyto receptory se nazývají NOD – like proteins a rozeznají mikroba v cytozolu.¹⁸

Po aktivaci receptoru příslušným ligandem dochází k indukci signálních cest a spuštění tvorby prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, TNF, IL-6).^{19, 20} Po složité signalizaci a aktivaci povrchových rozpoznávacích receptorů mezi fagocytem a mikroorganismem tzv. chemotaxí, dochází k pohlcování cizorodé částice za účelem zničení. Pseudopodie makrofágu obklopí částici, až se buněčná membrána uzavře, a vytvoří se za pomoci kontraktilních proteinů fagozóm. Tvar částice ovlivňuje rozhodnutí zda pohlcení částice bude zahájeno či nikoliv.²¹

Poté do fagozómu prostupují azurofilní granula – lyzozómy obsahující

baktericidní látky a hydrolytické enzymy, za vzniku fagolyzozómu. V něm pak dochází k usmrcování pohlcených mikroorganismů a rozkladu buněčných zbytků. Podle zapojení metabolických systémů a buněčných fagocytů lze rozlišit 2 mikrobicidní systémy: a) závislé na O₂ (např. rozklad H₂O₂, oxidační vzplanutí) nebo b) nezávislé na O₂ (v lysozomech obsažené hydrolytické enzymy jako např. hydrolázy a proteázy rozkládají za nízkého pH glykoproteinové složky bakteriálních stěn). Za ideálních podmínek celý proces fagocytózy končí exocytózou.²²

V průběhu vývoje však řada patogenních organismů vyvinula nejruznější 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*).^{23, 24}

2.2.2 Úloha makrofágů v tularemické infekci

Většina intracelulárních bakteriálních patogenů se snaží uniknout baktericidním mechanismům fagocytujících buněk. Patogeny vymyslely různé ochranné strategie pro zajištění svého přežití a množení v buňce:

- extrafagozomální cesta, ve které patogen uniká z fagozomu do cytoplazmy po degradaci fagozomální membrány např. *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*, *Trypanozoma cruzi*
- patogen se adaptuje na kyselé prostředí fagolyzozomu jako např. *Coxiella burnetii*, *Leishmania amazonensis*
- patogen zůstává usídlen uvnitř fagozomu, ale zabráni jeho fúzi s lysozomem a tvorbě fagolyzozomu, jako např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*.²⁵

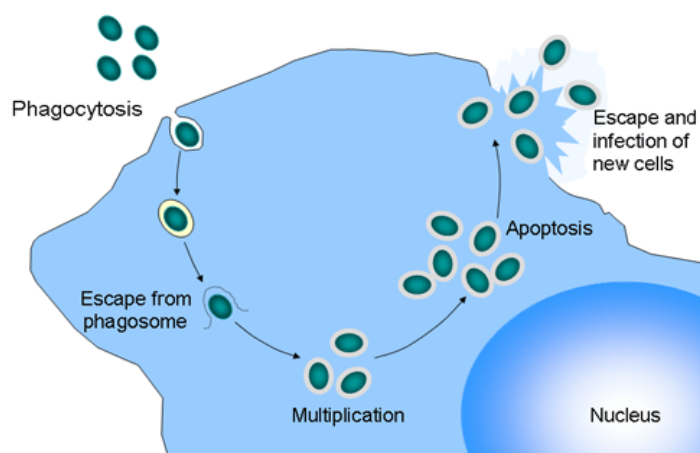
F. tularensis patří mezi fakulativně intracelulární bakterie se schopností infikovat a rozmnožovat se v různých typech eukaryotních buněk. Patří k nim profesionální fagocyty, hepatocyty, fibroblasty a endotelové buňky člověka, myši, králíků a morčat. Jsou to právě makrofágy, které představují vhodné místo pro přežití a replikaci bakterií.²⁶

Při vstupu *F. tularensis* LVS do makrofágu je bakterie obklopena dlouhými, asymetrickými smyčkami pseudopodií a vtažena do buňky. Jedná se o odlišný

způsob pohlcení oproti jiným bakteriím, které vstupují do buněk konvenční fagocytózou, při které jsou pseudopodie cytoplazmy menší a symetrické. Přesné, receptorem zprostředkované mechanismy vstupu do buňky nejsou známy, ale byla potvrzena úloha komplementových receptorů, Fc – receptorů, mannózoového receptoru a TLR2 receptoru.^{26, 27, 30}

Primárním baktericidním mechanismem lidských a myších makrofágů je splynutí fagozomu s primárním lysozomem a jeho mikrobicidními látkami a enzymy. Po pohlcení bakterie makrofágem se ve fagozomu vyskytuje i glykoproteinem LAMP-1, což je typickým endozomální znak.²⁸ Bez ohledu na to, jestli je makrofág lidského či myšího původu, bakterie po 2-4 hodinách začíná unikat z fagozomu a po 4-8 hodinách je velká většina bakterií volná v cytoplazmě.^{29, 30} Bakterie je schopná změnit dozrávání fagozomu, o čemž svědčí vyloučení cathepsinu D, a pak neznámým mechanismem rozruší fagozomální membránu. Předpokládá se, že únik je zprostředkován uvolňováním rozličných proteinů fagocytovanými bakteriemi. Pro počáteční multiplikaci patogenu v buňkách je nutné kyselé prostředí fagozomu, ve kterém se uvolňuje železo tvořící jednu ze živin *F. tularensis*. Po úniku bakterie do cytosolu dochází k dalšímu množení bakterie, což vede u infikované buňky ke vstupu do apoptózy, takzvané programované smrti buňky.^{30, 31}

V případě *F. tularensis* není doposud dostatek informací o jejím intracelulárním osudu v hostitelské buňce. 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.³² 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*.³³



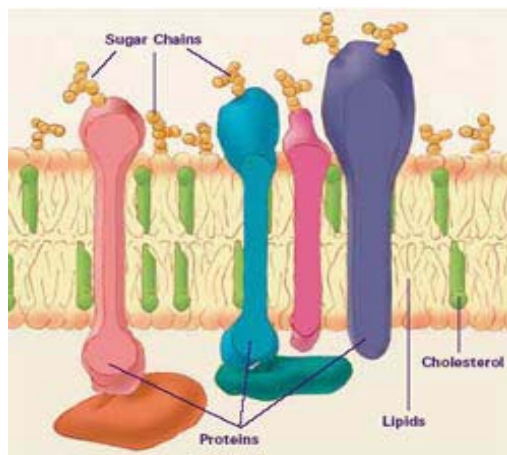
Obr.1: Replikace *Francisella tularensis* uvnitř makrofága (převzato z ⁶²).

Popis obr.1: Po kontaktu patogena s makrofágem dochází k pohlcení částic fagocytózou a následně vzniku fagozómu, odkud bakterie uniká. Díky příznivým podmínkám v prostředí se bakterie množí až do apoptické smrti hostitelské buňky, kdy se bakterie uvolní do prostředí.

2.3 Lipidové rafty a bakteriální infekce

2.3.1 Lipidové rafty – nový pohled na model plazmatické membrány

Živá eukaryotická buňka je obalena plazmatickou membránou, která tvoří vnější obal okolo buněčné protoplazmy, a tím odděluje jednu buňku od druhé. Plazmatická membrána působí jako selektivně propustná bariéra bránící úniku obsahu buňky. Dále zajišťuje regulaci výměny látek a energií mezi buňkou a okolím. Proto je membrána prostoupena vysoce selektivními kanály a pumpami, které umožňují spojení důležitých signálních cest. Má tedy významnou roli v rozvoji imunitní odpovědi, neurotransmise, signální transdukce, mezibuněčné komunikace a udržení buněčné homeostázy.³⁴

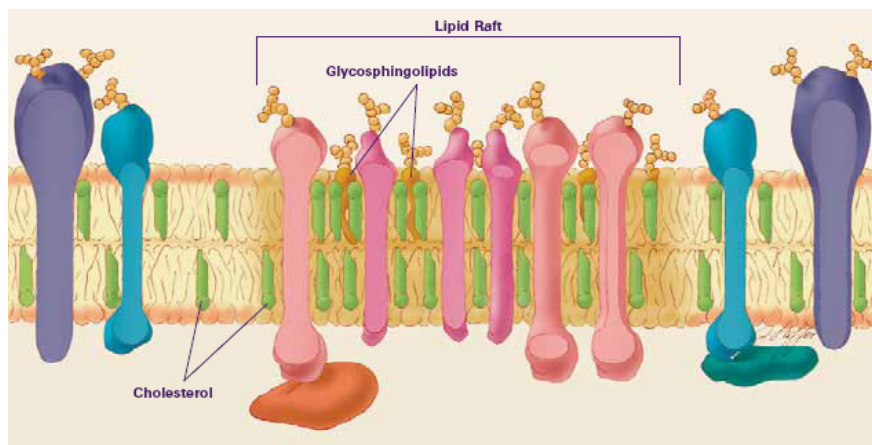


Obr.2: Složení plazmatické membrány (převzato z ⁶⁰).

Popis obr.2: Znárodnění polotekuté neuspořádané struktury plazmatické mozaiky. Nepravidelné rozmístění lipidových, cholesterolových i proteinových struktur v buněčné fluidní mozaice.

Podle dříve přijímaného názoru je struktura membrány chápána jako fluidní mozaikový model, v němž glykosfingolipidy a sfingomyelin tvoří polotekuté prostředí, kde plavou membránové proteiny uspořádané do dvojvrstvy. Od tohoto modelu se ustupuje a v současné době se předpokládá, že plazmatická membrána již nevypadá jako proměnlivé moře lipidů, ale uvnitř tohoto lipidového moře se nacházejí lipidové „struktury“ označované lipidové rafty.³⁵

Lipidové rafty jsou malé dynamické shluky proteinů a lipidů, které volně plují uvnitř polotekuté, neuspořádané dvojvrstvy, kde také mohou tvořit větší seskupení v podobě plošin – platforem (viz. obr. 3). Rafty jsou bohaté na glykosfingolipidy, cholesterol v anglické literatuře označovány jako GEM (glycosphingolipid – enriched microdomains).³⁶ Rafty jsou obohaceny o proteiny uplatňující se v buněčných procesech přenosu informací a mezibuněčné signalizaci např. glycosphatidylinositol (GPI) kotvené proteiny, acylované proteiny např. tyroxin kinázy z Src rodiny, G α subjednotky G proteinů a endoteliální syntetázy oxidu dusného (eNOS).^{37, 38} K detekci membránových struktur se používají buď raftové proteinové markery (caveolin-1, flotilltin-1) nebo lipidové raftové markery (cholesterol, gangliosidy).^{39, 40}



Obr.3: Lipidový raft v plazmatické membráně (převzato z ⁶⁰).

Popis obr.3: Na obrázku je znázorněno formování malých ostrůvků lipidových raftů v plazmatické membráně. Rafty mají uspořádanou strukturu obsahující především cholesterol a glykosfingolipidy a proteiny.

Tyto shluky jsou více organizované a pevně zhuštěné než zbytek plazmatické membrány. Rozdíly v pevnosti uspořádání raftů vyplývají z nasycených uhlovodíků v řetězci sfingolipidů ve srovnání s nenasycenými částmi mastných kyselin fosfolipidů v neuspořádané fázi membrány. Cholesterol zde slouží jako rozpínavý tmel mezi uhlovodíkovými řetězci sfingolipidů, který udržuje raft a představuje klíčovou molekulu ve stabilizaci domén.⁴¹ Odstraněním cholesterolu z raftů pomocí metyl- β -cyklodextrinu (MBCD) dochází k rozrušení jejich struktury a tím i ztráty jejich funkce.⁴²

Lipidové rafty jsou malé, pohyblivé, nestálé domény obsažené v plazmatické membráně. Z těchto důvodů studium lipidových raftů *in vivo* zůstává problematické. 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.³⁸

Jedním z možných přístupů jak studovat lipidové rafty je nerozpustnost raftových proteinů a lipidů při lýzi buněk neionogenním detergentem jako např. Triton X-100, CHAPS.⁴³ Díky tomuto přístupu je možné získat informaci o

proteinech obsažených v raftové oblasti, jejichž složení se mění na základě průběhu biologického procesu. Rafty izolované na základě jejich nerozpustnosti se označují jako tzv. DRM – detergent rezistentní membrány.^{44,35}

Caveola je jedinou morfologicky identifikovatelnou lipidovou mikrodoménou. Snadno se rozpozná od ostatních lipidových domén přítomností cholesterol vázícího proteinu caveolinu.⁴⁵ Caveoly jsou většinou pozorovány jako vchlípeniny připomínající tvar baňky o velikosti 100 nm v průměru přítomné na mnoha buněčných typech. Buňky jako adipocyty, endoteliální buňky, buňky hladké svalové hmoty, které na svém povrchu obsahují velké množství caveol vzniklých zhlukováním raftů na buněčném povrchu. Za tvar caveolární prohlubně a regulaci intracelulárních hladin cholesterolu odpovídají tři druhy caveolinu: caveolin 1,2 a caveolin 3. Primární funkce caveol slouží k regulaci a ukládání raftových proteinu, slouží jako zásobárna raftů.⁴⁶

2.3.2 Lipidové rafty a intracelulární bakterie

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 vstup patogena do hostitelské buňky. Široký okruh patogenů včetně virů a bakterií si vyvinul mechanismus napadení hostitelských buněk.⁴⁷ Některé patogeny jsou známé vstupem do buňky přes tradiční endocytózu s využitím klatrinových váčků. Studie ukazují, že některé viry a bakterie využívají k napadení hostitelské buňky lipidové rafty v membráně. Lipidové rafty jako vstupní brána umožňují patogenním mikroorganismům se navázat na příslušné receptory a aktivovat tak dané signální cesty, které zabrání aktivaci hostitelského imunitního systému a vytvoří tak vhodné podmínky pro replikaci patogena uvnitř buňky. Ačkoliv se bakterie liší různou klinickou manifestací a patogenezí onemocnění, jejich intracelulární život v hostiteli u všech závisí na bráně vstupu a tím typu endocytózy.^{48,49}

Lipidové rafty jsou také spojovány se vstupem intracelulárního patogena *Mycobacterium tuberculosis* do makrofágů. Vstup bakterie je podmíněn přítomností cholesterolu, který tvoří důležitou součástí raftů. Bakterie jsou schopny přežít uvnitř

buňky díky proteinu obsahující tryptofan a aspartát, tzv. TACO protein prezentovaný na fagozomální membráně, který zabrání fúzi fagozomu s lysozomem. Důležitou roli hraje i komplementový receptor CR3 spojený s GPI kotvenými proteiny.⁵⁰

Dalším patogenem, který může vstupovat do buňky prostřednictvím lipidových raftů je *Brucella abortus*, u kterého bylo stejně jako u mykobakterií prokázáno, že cholesterol-chelatující činidla inhibují jejich vstup do epiteliálních buněk. Ukazateli vstupu *Brucella* přes rafty makrofágu jsou GM1 a cholesterol. Je známo, že bakterie obsahují IV sekreční systém, důležitý pro invazi do hostitele a zábraně fúze s lysozome.⁵¹

Interakce bakterie *Shigella ssp.* s hostitelskou buňkou je zprostředkována proteinem IpaB a hostitelským transmembránovým proteinem CD44. Dalšími molekulami zapojenými do invazivních procesů jsou povrchové glykoproteiny působící společně s ERM (erzin/radixin/moesin). Při adhezi *Shigella* zprostředkovává přeskupení a změny v cytoskeletu Rho proteinem. V procesu se zapojují i molekuly cholesterolu a sfingolipidů.^{56, 58}

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-6.⁵⁹

Tab.1: Aktivované části raftu při vstupu bakterie do hostitelské buňky

Bakterie	Aktivované části uvnitř raftu	Vstup závislý na cholesterolu	Literatura
<i>Mycobacterium ssp.</i>	CR3, GPI proteiny (CD55, CD66b, CD16b, CD14)	ano	47,48,50,55
<i>Brucella ssp.</i>	GM1, GPI protein (CD48)	ano	48,52,53,54
<i>Shigella ssp.</i>	CD44, GPI protein, sfingolipid	ano	56,57,58

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie a roztoky

Tab.2: Chemikálie a roztoky metody CFU a kultivace buněk

	Chemikálie a roztoky	Firma
1	DMEM kultivační medium	GIBCO
2	10 % Fetální bovinní sérum inaktivované	GIBCO
3	Gentamycin	GIBCO
4	0,5% roztok trypanové modři v PBS	Sigma – Aldrich
5	DMSO	Sigma – Aldrich
6	chemikálie McLeod agaru: bovinní hemoglobin Thayer-Martinův agar Bacto agar Iso Vitalex	

Tab.3: Roztoky Metody Fluorescenční mikroskopie

	Roztoky
1	Pufrovaný fyziologický roztok – PBS: 0,8 g NaCl 0,2 g KCl 3,15 g - Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O 0,15 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ Aqua pro injectione ad 1 000 ml
2	roztok 3,8% Paraformaldehyd v 1 x PBS, pH 7,2
3	roztok 50 mM NH ₄ Cl v 1 x PBS
4	blokační roztok – 2% FCS a 1% BSA v 1 x PBS
5	roztok 0,1 % Triton X-100
6	purifikované imunní anti-tularemské králičí sérum ředěné 1:3000 v blokačním roztoku

Tab.4: Barviva a chemikálie Metody Fluorescenční mikroskopie

	Barviva a chemikálie	Firma
1	AlexaFluor 546 Zenon anti-rabbit IgG	Invitrogen, Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA
2	AlexaFluor 488 Zenon anti-rabbit IgG	Invitrogen, Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA
3	Flourofor DAPI	Invitrogen, Molecular Probes™, Eugene, Oregon, USA
4	metyl-β- cyklodextrin o koncentraci 10 mM	Sigma/
5	filipin o koncentraci 5 µg/ml	Fluka

Tab.5: Roztoky metody Western Blot

	Roztoky
1	Zaostřovací gel: 1,3ml Akrylamid + PDA 2,5ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8 6,1ml vody 100µl 10% SDS 50µl 10% APS 10µl TEMED
2	Roztok dělicího 10% polyakrylamidového gelu: 6 ml vodného roz. akrylamid a PDA
3	10 x koncentrovaný Tris pufr pH 7,6 – TBS: 24,2 g Tris base 80,0 g NaCl 38,0 ml 1M HCl voda do 1 000 ml
4	1 x koncentrovaný Tris pufr pH 7,6 s 0,05 % Tweenu
5	Transfer pufr: 3,03 g Tris-base 14,4 g Glycin 200 ml MeOH voda do 1 000 ml

6	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
7	Blokační roztok: 5% mléko rozpuštěné v TBS s Tween 0.1%
8	Chemilunimiscenční roztok: ECL- kit

Tab.6: Chemikálie metody Western Blot

	Chemikálie	Firma
1	Akrylamid	USB (Amersham Pharmacia Bitech) Švédsko
2	APS (persíra amonný)	Bio-Rad, USA
3	TEMED (N,N,N,N-tetramethylendiamid)	USB (Amersham Pharmacia Bitech) Švédsko
4	PDA (bis(akryoyl)piperazin)	Bio-Rad, USA
5	SDS (dodecylsírán sodný)	Bio-Rad, USA
6	Sušené mléko, Blotting Grade Blocker	Bio-Rad, USA
7	β -merkaptoethanol	Fuka, Buchs, Švýcarsko
8	Metanol	Fluka, Buchs, Německo
9	Dusičnan stříbrný	Sigma – Aldrich
10	Glutaraldehyd	Fluka, Buchs
11	Bromfenolová modř	Serva, Německo
12	Tween 20	Sigma, USA
13	Tris-baze (tris(hydroxymethyl)aminometha))	Sigma, USA
14	Sírán železnatý	Sigma, USA

Tab.7: Protilátky metody Western blot

	Protilátky	Firma
1	Primární protilátka proti hledanému antigenu: anti-mouse Flotillin-1, 1:125	Transduction lab. Pharmingen
2	Primární protilátka proti hledanému antigenu: human-anti-mouse Tfr rc, 1:1000	

3	Sekundární protilátka: goat-anti-mouse HPR 1:1000	Dako
4	Standarda : Precision Plus Protein™ standarda Kaleidoscope™	Biorad

Tab.8: Roztoky a chemikálie Metody sacharózového gradientu

	Chemikálie a roztoky	Firma
1	lyzační pufr: 25mM TRIS pH=7.5 150mM NaCl 10mM glycerofosfát 5mM EDTA 0,5% Triton X-100	Sigma, USA
2	inhibitory proteáz EDTA free cocktail	Roche
3	inhibitory fosfatáz	Callbiochem
4	Ředící roztok na sacharózový gradient: 25 mM TRIS-HCl, pH 7,5 125 mM NaCl 2 mM EDTA	
5	80 % sacharóza : 80 g sacharózy rozpustit v 100 ml deí H ₂ O	
6	0,1% roztoku rapigestu	

3.2 Kultivace buněčné monocytární - makrofágové linie J774.2

3.2.1 Buněčná linie

Monocyto-makrofágová linie J774.2 odvozená z myších makrofágů BALB/c. Buňky jsou semiadherentní. Znamená to, že buňky rostoucí v suspenzi přisedají k povrchu kultivační láhve a nejsou v médiu volně rozptýleny. V běžné praxi se kultivuje $3-9 \times 10^5$ buněk/ml média při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

3.2.2 Základní pravidla při práci s buněčnými liniemi

Buněčné linie mohou být potenciálně nebezpečné pro lidské zdraví. Při manipulaci s buněčnými kulturami je nutné dodržovat základní laboratorní a

bezpečnostní zásady, aby se zamezilo případnému riziku vzniku infekce pracovníka potenciálně infekčním agens. Dále je důležité zabránit kontaminaci kultivovaných buněk např. mikroorganismy nebo buňkami cizího původu. Tímto způsobem může dojít ke znehodnocení kultur a k ovlivnění správnosti prováděných experimentů.

Základní pravidla při manipulaci s buněčnými liniemi je práce ve sterilním laminárním boxu s použitím desinfekčních prostředků, plamene a používáním ochranných pomůcek pracovníka jako jsou latexové rukavice a ochranný oděv vhodný do laboratoře. Práce by měla probíhat co nejrychleji a bezdotykově. Použitý materiál a odpad se likviduje dle interních směrnic dané laboratoře.

3.2.3 Pasáž buněk

Pro udržení vhodných podmínek růstu buněk v kultivační láhvi je důležitá obměna nového kultivačního média a vhodně zvolená velikost kultivační láhve. Po delší době rostoucí buňky vyčerpají živiny v kultivačním médiu a plochu kultivační láhve, která je důležitá pro adherující buňky. Velké množství přisedlých buněk vytvoří souvislou vrstvu na dně láhve, přestanou proliferovat a začnou odumírat.

Pasážováním buněk získáme opět vhodné podmínky pro růst buněk. Při pasážování se nejprve uvolní adherované buňky od stěn kultivační lahve. Pro uvolnění se použije mechanický způsob seškrábání buněk z povrchu scraperem nebo metoda trypsinizace, která využívá proteolytického enzymu trypsinu. Do nové kultivační láhve s čerstvým kultivačním médiem se odpipetuje část buněčné suspenze. Při kultivaci se mění médium a kontroluje růst buněk. Rozdělením původní suspenze buněk na několik částí a následnou kultivací v jednotlivých láhvích získáme několika násobný počet buněk.

Buňky J774.2 monocyto - makrofágové linie se kultivují ve 25, 75 nebo 150 cm² kultivačních láhvích v Dulbecco's modified Eagle mediu (DMEM) s přídavkem 10% FTSI v termostatu při teplotě 37 °C a atmosféře s obsahem 5% CO₂. Kultivační médium se mění každé dva dny.

3.2.4 Stanovení viability a počtu buněk

Pro pasážování a izolaci buněk je důležité znát životnost a počet buněk. K tomu se využívá mikroskopické 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. Na základě toho je možné rozlišit buňky uvnitř zbarvené, tedy mrtvé, od buněk prosvícených, živých.

Buňky se počítají v Bürkerově komůrce ve 25 čtvercích, buňky zasahující do hrany čtverce se počítají po dvou stranách. Viabilita se určí podle jednoduchého vzorce: viabilita [%] = počet živých buněk / počet všech buněk v 25 čtvercích*100. Pro pokus jsou vhodné buňky s životností okolo 95 %. Pro nasazení buněk nové pasáže je třeba stanovit přibližný počet buněk v 1 ml suspenze. Počet se stanoví dle vzorce: počet buněk v 1 ml suspenze = počet živých buněk x ředění x 10 000.

3.2.5 Uchovávání a rozmrazování buněk

Pro dlouhodobější uchování buněk se využívá zamražení buněk při teplotách v intervalu od -135 °C do -190 °C. K tomu je vhodný hlubokomrazicí box nebo tekutý/plynný dusík. Při nízkých teplotách se sníží riziko mikrobiální kontaminace buněk, vzájemná kontaminace buněčných linií a genetických či morfologických změn. Pro uchovávání buněk při těchto nízkých teplotách je třeba použít kryoprotektivní látky, které zabrání poškození buněk, zejména jejich buněčné membrány, tvorbou krystalků 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.

3.3 Kultivace bakterií

3.3.1 Bakteriální kmen

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

3.3.2 Bakteriální suspenze

Den před zahájením pokusu je nutné masivně naočkovat McLeod plotny ze štokové plotny kmene *Francisella tularensis* LVS a inkubovat 24hodin při teplotě 37°C, v atmosféře 5% CO₂. Z 24 hodinové kultivace bakterií byla připravena

bakteriální suspenze v 1x PBS o O.D.= 1.00. Jako blank slouží čistý 1x PBS. 1 ml takto připravené bakteriální suspenze o hodnotě optické denzity jedna (O.D.=1.00) 1 obsahuje 3×10^9 bakterií.

3.4 Postup infekce

3.4.1 Synchronizovaná fagocytóza

V závislosti na velikosti použitého panelu se nechal příslušný počet J774.2 buněk (24 jamkovému panelu odpovídá 5×10^5 , 6ti jamkovému panelu odpovídá 3×10^6) naadherovat na povrch jamky nebo v případě mikroskopických studií na podložní skličko. Multiplicita byla stanovena na hodnotu 500 (500 bakterií na 1 hostitelskou buňku). Vstup bakterií do makrofágů byl synchronizován centrifugací bakterií na naadherované makrofágy o rychlosti 400g po dobu 2min. Kontakt bakterií s makrofágy po centrifugaci byl označen jako čas 0. Po synchronizaci byly bakterie dále inkubovány s makrofágy po dobu 5, 10, 20, 30, 60 minut při teplotě 37 °C a atmosféře 5% CO₂. Po uplynutí doby daného intervalu infekce byly extracelulární bakterie odmyty 3 x 1x PBS. V případě metody CFU byly extracelulární bakterie odstraněny v přítomnosti gentamycinu o koncentraci 5ug/ml po dobu 30 minut a 3 x promyty 1 x PBS.

K ověření správné multiplicity byla zvolena metoda CFU. Bakteriální suspenze byla naředěna 1 x PBS na koncentrace 10^{-6} , 10^{-7} a vyseta v duplicitě pro každé ředění na McLeod kultivační plotny. Narostlé kolonie byly spočítány po 72 hodinové kultivaci v termostatu při teplotě 37 °C a atmosféře 5% CO₂.

3.5 Deplece cholesterolu

3.5.1 Deplece cholesterolu - princip metody

Úloha lipidových raftů při vstupu *Francisella tularensis* LVS byla zjištěna ovlivněním buněk látkami vyvazující (metyl- β -cyklodextrin) nebo pouze blokuující (filipin) membránový cholesterol. Deplecí cholesterolu dochází k porušení struktury lipidových raftů. Pokud bakterie využívá při svém vstupu do hostitelských buněk

oblast lipidových raftů, dochází k snížení počtu internalizovaných bakterií. Počet internalizovaných bakterií byl určen metodou fluorescenční mikroskopie nebo metodou CFU. Princip metod a vlastní postup jsou popsány v následujícím textu.

3.5.2 Deplece cholesterolu – vlastní provedení

5×10^5 J774.2 buněk naadherovaných na podložním sklíčku v případě mikroskopických studií nebo na povrchu jamky v případě CFU metody bylo inkubováno s 10mM roztokem MBCD nebo roztokem filipinu o koncentraci 5 μ g/ml po dobu 30ti minut při 37 °C a atmosféře 5% CO₂. Po 30 minutách inkubace byly buňky 2 x promyty kultivačním médiem. Po promytí buněk byl proveden synchronizovaný vstup bakterií do makrofágů. Počet internalizovaných bakterií byl zjištěn metodou fluorescenční mikroskopie nebo metodou CFU. Princip metod a vlastní postup jsou popsány níže.

3.5.3 Fluorescenční mikroskopie - princip metody

Fluorescenční mikroskopie umožňuje detekovat různé specifické molekuly buněk s navázaným fluoroforem. Fluorescenční mikroskop obsahuje silný zdroj a tři filtry, které jsou schopné detekovat fluorofory. Fluorofor patří mezi látky schopné absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o delší vlnové délce. Filtry mikroskopu rozdělí světlo různých vlnových délek a tím umožní použití více flouoroforů při barvení buněčných struktur najednou.

Fluorofor DAPI (4'-6-diamidino-2-fenylindol) vytváří vazbu s buněčnou DNA. V mikroskopu se jeví jádra buněk modrou barvou. Pro barvení bakterií se využívá vazby primární protilátky se specifickými částmi bakteriálního povrchu, která se vyzualizuje pomocí sekundární protilátky kovalentně modifikované fluoroforem Alexa 488 (zelená) nebo Alexa 546 (červená) pro rozlišení intracelulárních a extracelulárních bakterií.

3.5.4 Fluorescenční mikroskopie – vlastní provedení

Bakterie byli centrifugovány na naadherované buňky J774.2, které byly předem ovlivněné filipinem či MBCD nebo ponechány bez ovlivnění (kontrolní skupina). Po internalizaci bakterií byli buňky 5 x promyty 1 x PBS a fixovány roztokem 3,8% paraformaldehydu v PBS při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Pro

blokaci paraformaldehydu byl přidán 50 mM NH₄Cl po dobu 10 minut. Poté byly buňky promyty 1x PBS. Při barvení extracelulárních bakterií bylo použito purifikované imunní anti-tularemské králičí sérum jako primární protilátka ředěná 1:3000 v blokačním roztoku. Po promytí 1x PBS byla navázána anti-králičí sekundární protilátka AlexaFluor 546 Zenon anti-rabbit IgG ředěná 1:500. Buňky byly 3x promyty 1x PBS a poté fixovány a permeabilizovány 0,1 % Triton X-100 po dobu 5 minut s přidáním roztoku 3,8 % paraformaldehydu v 1 x PBS. Na intracelulární bakterie byla navázána primární protilátka z purifikovaného imunního anti-tularemského králičího séra ředěná 1:3000 v blokačním roztoku po dobu 30 minut. Po třech promytích 1x PBS byla aplikována anti-králičí sekundární protilátka AlexaFluor 488 Zenon anti-rabbit IgG ředěná 1:500. Před i po barvení buněčných jader roztokem DAPI ředěným 1:3000 po dobu 3 minut byly buňky promyty 1x PBS. Podložní sklíčka byla před aplikací do montovacího média promyta v destilované vodě. Pro analýzu fluorescenčních preparátů byl používán mikroskop Nikon Eclipse E 400. Vyhodnocení počtu internalizovaných bakterií bylo provedeno spočítáním bakterií u 200 buněk J774.2. Za extracelulárně lokalizované bakterie byly považovány bakterie obarvené červeně (AlexaFluor 546) a za intracelulárně lokalizované bakterie byly považovány bakterie obarvené zeleně (AlexaFluor 488).

3.6 Metoda CFU

3.6.1 CFU metoda- princip metody

CFU (Colony Forming Units) značí "počet jednotek tvořících kolonie". Metoda CFU se používá ke stanovení počtu živých bakterií ve vzorku. Množství živých bakteriálních buněk je možno stanovit výsevem známých objemů vhodné ředěných suspenzí na plotny s McLeod agarem. Při této metodě se předpokládá, že při inkubaci vyrostou z každé buňky jedna kolonie. Touto metodou bylo ověřeno počet živých bakterií při interakci s makrofágy J774.2. Narostlé kolonie bakterií jsou důkazem, že bakterie pronikly do buněk a infekce proběhla.

3.6.2 Postup CFU

Po synchronizovaném vstupu bakterií do buněk ovlivněných (cyklodextrin, filipin) nebo neovlivněných buněk monocyto-makrofágové linie J744.2 byly buňky 3 x promyty kultivačním médiem a inkubovány 30 minut s gentamycinem o koncentraci 5 ug/ml. Po inkubaci buněk s gentamycinem byly buňky J774.2 3 x promyty 1 x PBS. Po promytí buněk byly buňky lyzovány ve 100 ul roztoku 0,1 % Tritonu X-100 v 1 x PBS po dobu 20ti minut na ledu. Uvolněné bakterie byly vysety na McLeod plotny v ředění 10^{-4} a 10^{-5} . Narostlé CFU kolonie byly spočítány po 72 hodinové inkubaci ploten při 37 °C a atmosféře 5% CO₂

3.7 Izolace detergent rezistentních membrán na sacharózovém gradientu

3.7.1 Lyzování buněk

Prvním krokem pro izolaci lipidových raftů je rozrušení buněčných membrán infikovaných buněk. Lyzování buněk probíhá chemickou cestou pomocí lyzačního pufru, jehož součástí je neionogéní detergent Triton X-100, který vytváří lipidové micely ve vodných roztocích. Dále obsahuje inhibitory proteáz a fosfatáz. Buňky byly lyzovány na ledu při 4 °C. Poté byly buňky mechanicky lyzovány pomocí pístového homogenizátoru. Lýzu buněk byla zkontrolována pod mikroskopem barvením roztokem trypanové modři.

3.7.2 Izolace lipidových raftů

Buněčný lyzát byl smíchán s roztokem 80 % sacharózy. Vznikl tak 40 % roztok sacharózy obsahující vzorek. Sacharózový gradient byl navrstven pomocí tuberkulinové stříkačky do speciálních 12 ml zkumavek (Ultra Clar Beckman TUBES 12 ml, Biotech) dle následujícího předpisu:

1. fáze.....5 ml 40 % sacharózy obsahující vzorek
2. fáze.....5 ml 30 % sacharózy/ roztok ředící sacharózu
3. fáze.....2 ml 5 % sacharózy/ roztok ředící sacharózu

Po navrstvení sacharózového gradientu byly zkumavky před ultracentrifugací vyváženy roztokem 5 % sacharózy. Důkladně vyvážené zkumavky byly

ultracentrifugovány s použitím rotoru SW41 po dobu 17 hodin rychlostí 200 000g při teplotě 4 °C. Po ukončení ultracentrifugace byly zkumavky se vzorky vyjmuty z kovových kapslí a opět umístěny na led. Vytvořený hustotní precipitát byl separován použitím 1 ml pipety. Celkově bylo získáno 12 frakcí o objemu 1 ml.

3.8 Určení raftové oblasti western blotem

3.8.1 Western blot – princip metody

Western blot je biochemická analytická metoda. Používá se k identifikaci specifického proteinu v komplexní směsi. Interakce protilátka-antigen umožňuje identifikaci jediného proteinu v heterogenní směsi bílkovin. Metoda se skládá z několika kroků. V první části se proteiny elektroforeticky dělí na polyakrylamidovém gelu, kdy vzniknou jednotlivé proteinových frakce rozdělené podle molekulové hmotnosti. Ve druhém kroku se frakce proteinů blotováním přenesou z polyakrylamidového gelu na PVDF membránu. Ve třetí části dochází k detekci hledaných proteinů pomocí navázání specifických protilátek a následné vizualizaci reakce na fotografickém filmu.

3.8.2 Western blot – vlastní stanovení

Proteiny jednotlivých frakcí získaných ze sacharózového gradientu byly rozděleny SDS elektroforézou na 10% polyakrylamidovém gelu. 40 µl každé frakce bylo smícháno s 20 µl SDS vzorkového pufru za denaturujících podmínek. 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 při 0,17 A a 17 V za 25 minut. Přenesené proteiny na PVDF membráně byly blokovány po dobu 1 hodiny v 5 % mléku v TBS s 0,1 % Tweenem. Po blokaci byly membrány inkubovány přes noc při 4 °C se specifickou protilátkou proti proteinovému raftovému markeru flotillinu-1 (1:250) a neraftovému markeru transferinovém receptoru (1:1000). Druhý den byly membrány 5 x promyty

v TBS s 0,1 % 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 0,1 % tweenem a 1x promyty v samotném TBS. Aktivita peroxidázy byla vizualizovaná pomocí chemiluminiscenčního substrátu, který reakcí s enzymem jako vedlejší produkt reakce emituje světlo. Světelný výtěžek byl zachycen použitím fotografického filmu s jeho následným vyvoláním v přístroji CURIX 60 od firmy Kodak.

3.9 Stanovení bílkoviny

3.9.1 Stanovení koncentrace bílkoviny – princip metody

Koncentrace bílkoviny ve vzorku se stanovuje pomocí microBCA kitu, který je chemicky založený na biuretové reakci. V alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí dávají bílkoviny purpurové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení. V průběhu reakce se vytvářejí komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb. Vzniklý komplex silně absorbuje světlo v oblasti 562 nm. Intenzita purpurově zbarveného komplexu se měří spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Součástí činidel je síran měďnatý, který poskytuje Cu^{2+} pro tvorbu komplexů s peptidovými vazbami bílkovin. Citlivost metody se pohybuje kolem 0,5 – 20 μg bílkoviny/ml.

3.9.2 Stanovení koncentrace bílkoviny – vlastní provedení

Nejprve byla připravena kalibrační řada roztoků obsahujících známé koncentrace standardu BSA. Koncentrační rozmezí proteinu BSA je uvedeno v tabulce 9. Dále byly připraveny roztoky vzorků o neznámé koncentraci. Ke vzorkům bylo přidáno stejné množství pracovního roztoku, který vznikne smícháním 3 roztoků z kitu v poměru MA : MB : MC = 25 : 24 : 1 dílů. Každý vzorek byl připraven v triplicátu. Připravený vzorek jak o známé koncentraci tak o neznámé byl inkubován s pracovním roztokem po dobu 1hod. při teplotě 60 °C. Po uplynutí inkubační doby byly zkumavky ochlazeny na pokojovou teplotu. Intenzita zbarvení byla změřena při absorpenci 562 nm do deseti minut, která je přímo úměrná koncentraci proteinu. Výsledná hodnota koncentrace proteinu byla určena z průměrných hodnot naměřených koncentrací proteinu.

Tab.9: Příprava standardů (BSA)

Roztok	Objem vody (ml)	Objem BSA (ml)	Konc. BSA (µg/ml)
A	2,25	0,25 zás. roz. BSA	200
B	4	1A	40
C	2	2B	20
D	2	2C	10
E	2	2D	5
F	2	2E	2,5
G	2,4	1,6F	1
H	2	2G	0.5
I	4	0	blank

3.10 Proteomická analýza detergent – rezistentních membrán

3.10.1 Hmotnostní spektrometrie – princip metody

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.

Tato analytická metoda je všestranná, rychlá a citlivá. Umožňuje především identifikaci neznámých sloučenin, kvantifikaci látek při chemické analýze a získání informací o vzorku a jeho struktuře. Výhodou je jednoduchá interpretace dat. Detekci sloučenin můžeme dosáhnout již ve velmi nízkých koncentracích (10^{-12} g, 10^{-15} molů látky o hmotnosti 1000 Da).

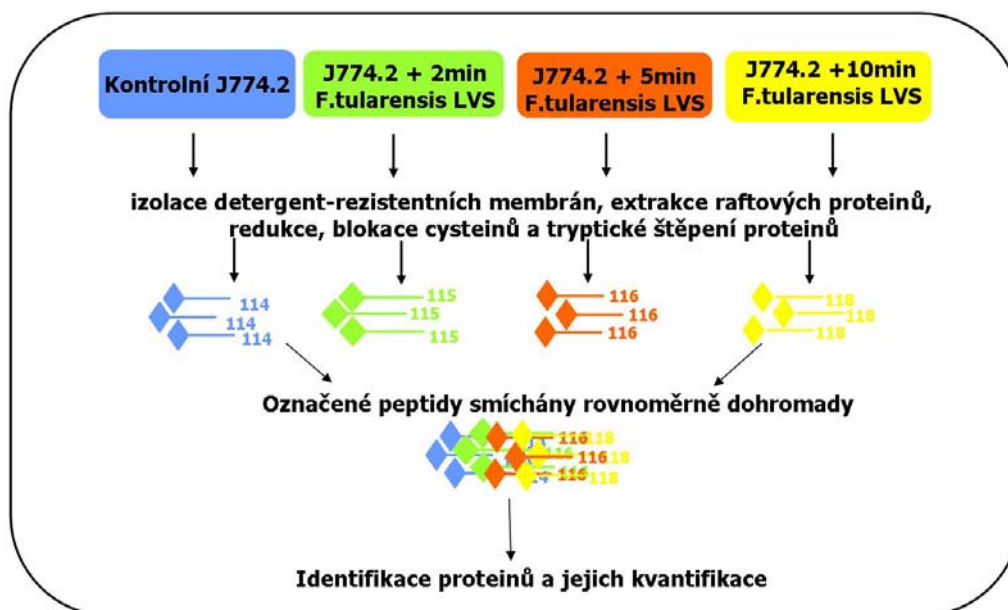
Základem je měření hmotnosti molekul a jejich částí. Z toho důvodu se musí tyto molekuly nejprve ionizovat. Ionizované molekuly – molekulové ionty se během ionizace nebo po ní mohou postupně rozpadat na fragmenty. Molekulové i fragmentované ionty jsou pak od sebe separovány podle hmotností připadající na náboj odpovídající jednomu elektronu, tj. podle efektivních hmotností m/z . Po separaci se nabitě částice detekují a zaznamenává se hmotnostní spektrum jako závislost četnosti vzniklých iontů na hodnotách m/z .

Existuje řada spektrometrů pracujících na různých principech ionizace a separace. Základními součástmi těchto přístrojů jsou iontový zdroj, kde dochází k ionizaci molekul a k urychlení molekul před vstupem do analyzátoru, analyzátor

umožňující separaci směsi iontů v plynném skupenství podle jejich efektivních hmotností, a zařízení pro detekci a registraci separovaných iontů. Všechny spektrometry mají systémem pro zavádění vzorku do iontového zdroje, který je spojen s počítačem. Pomocí počítače se nastavují pracovní podmínky spektrometru, řídí se průběh celého měření, je možné zpracování získaných spekter a jejich porovnávání s databázemi. Součástí všech přístrojů je vakuová aparatura, která zajistí nízký pracovní tlak v analyzátoru. Nízký tlak brání nežádoucím srážkám mezi ionty a neutrálními molekulami v době mezi ionizací a detekcí iontů.

3.10.2 iTRAQ kvantitativní proteomická analýza

Pro proteomickou analýzu lipidových raftů respektive DRMs byly zvoleny intervaly interakce bakterií s makrofágy: 2, 5 a 10 minut. Pozitivní frakce na raftový marker Flotillin-1 jak u kontrolních tak buněk J774.2 po interakci s *Francisellou tularensis* LVS byly spojeny a ultracentrifugovány po dobu 12 hodin o rychlosti 200000g, teplotě 4°C. Po ultracentrifugaci byla peleta charakterizující rafty rozpuštěna v 0,2% roztoku rapigestu. Celkem byly připraveny 4 vzorky – kontrolní J774.2 buňky, buňky po časně interakci s *Francisellou tularensis* LVS 2, 5, 10 minut. V jednotlivých vzorcích byla určena koncentrace proteinu. Následně byly vzorky zpracovány dle obecného protokolu pro iTRAQ metodu firmy Applied Biosystems (Příloha 1, obr.10) Proteiny v jednotlivých vzorcích byly redukovány, následovala blokáce cysteinů a štěpení proteinů na peptidy trypsinem. Peptidy každého vzorku byly označeny izobarickou značkou po dobu 1 hod. Označené peptidy jednotlivých experimentálních skupin (celkem 4) byly na základě zjištěné koncentrace proteinu smíchány. Vzorek obsahující stejné množství proteinu resp. peptidů z každé experimentální skupiny byl chromatograficky rozdělen a analyzován na přístroji MALDI TOF TOF (obr.4). Rozdělení proteinu na LC provedl Ing. Marek Link, PhD. Hmotnostní analýza byla provedena Ing. Markem Linkem, PhD a Mgr. Anettou Härtlovou. Předmětem diplomové práce byla až analýza identifikovaných proteinů. Vyhodnocení proteinu bylo proti myší databázi ipi.MOUSE v. 3.40.



Obr. 4: Schéma pracovního postupu při přípravě vzorku iTRAQ metodou

3.11 Použité pomůcky a přístroje

Tab.10: Kultivace Buněk a bakterií, metoda CFU

	Pomůcky a přístroje	Firma
1	Laminární box Biostar- Biologický bezpečnostní box třídy II A	Telstar industrial s.l.
2	CO ₂ Inkubátor Model: MCO - 18AIC	SANYO
3	Minishaker MS2	IKA
4	Denzitometr CO8000 Cell Density Meter	WPA biowave
5	Termoblok - digitální bloková lázeň UBD	Grant
7	Bürkerova komůrka	Neoptá
8	Vodní lázeň TW 12	ULABO
9	Mrazicí box VX 38 E	Jouan
10	běžné mikrobiologické pomůcky: mikrobiologické kličky, Petriho misky	
11	běžné biochemické pomůcky: skleněné a plastové nádobí, mikropipety, pipetovací	

	špičky bez filtru, mikrozkuřavky, chirurgické rukavice, atd.	
--	---	--

Tab.11: Vybavení pro Fluorescenční mikroskopii

	Pomůcky a přístroje	Firma
1	Inverzní mikroskop XDS - 1C	Optika Microscopes

Tab.12: Vybavení pro stanovení bílkoviny

	Přístroje a pomůcky	Firma
1	Spektrofotometr Helios UV-VIS	Thermo spectronic
2	Minishaker MS2	IKA

Tab.13: Vybavení pro Metodu Western blot

	Přístroje a pomůcky	Firma
1	Rotátor/inkubátor hybridizér HB-1D	Techne
2	Analytické váhy AX105 Mehler	Toledo
3	PVDF Western Blot membrány	Roche
4	Blotovací papír, Original Extra thick blot paper – Mini blot size	Biorad
5	Parafilm „M“ laboratory film	Pechiney plastic packing
6	Papírové kapesníky – Tissue-box	Carl Roth GmbH+Co
7	Skla na lití gelů Outer Glass Plate 3/1 mm	Bio-Rad
8	Zdroj napětí Power Pac 200 (300)	Bio-Rad
9	Mini Protein II (III) Elektrophoresis Cell	Bio-Rad
10	Protein IEF Cell	Bio-Rad
11	Vyvolávací přístroj CURIX 60	Kodak

Tab.14: Vybavení pro metodu Sacharózového gradientu

	Přístroje a pomůcky	Firma
1	Ultracentrifuga Optima™ MAX s kapslemi	Beckman Coulter
2	Ultracentrifugační zkumavky Beckman 344057 UC TUBES 5 ml BOX 50	Bitech
3	Multifunkční chlazená centrifuga IEC CL31R	Multispeed Thermoscientific
4	Ultrazvukový sonikátor	Hielscher
5	Jímač gradientových frakcí Piston Gradient Fractionator,	Biocomp

Tab.15: Vybavení pro proteomickou analýzu

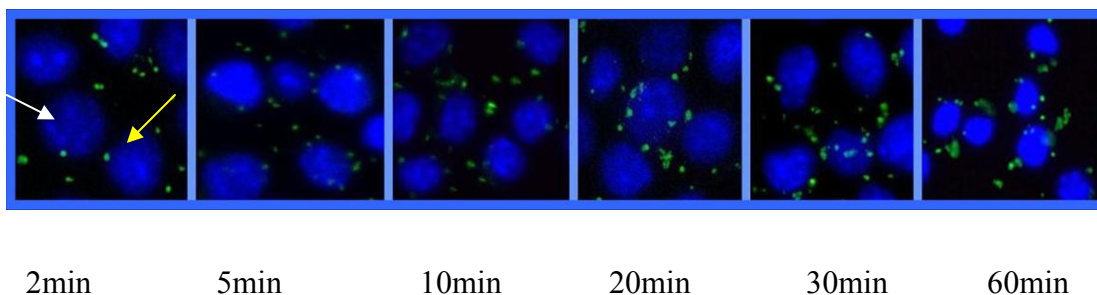
	Přístroje a pomůcky	Firma
1	Kapalinový chromatograf Ultimate 3000	Dionex
2	4800 MALDI-TOF/TOF	Applied Biosystems

4. Výsledky a diskuze

4.1 Model interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2

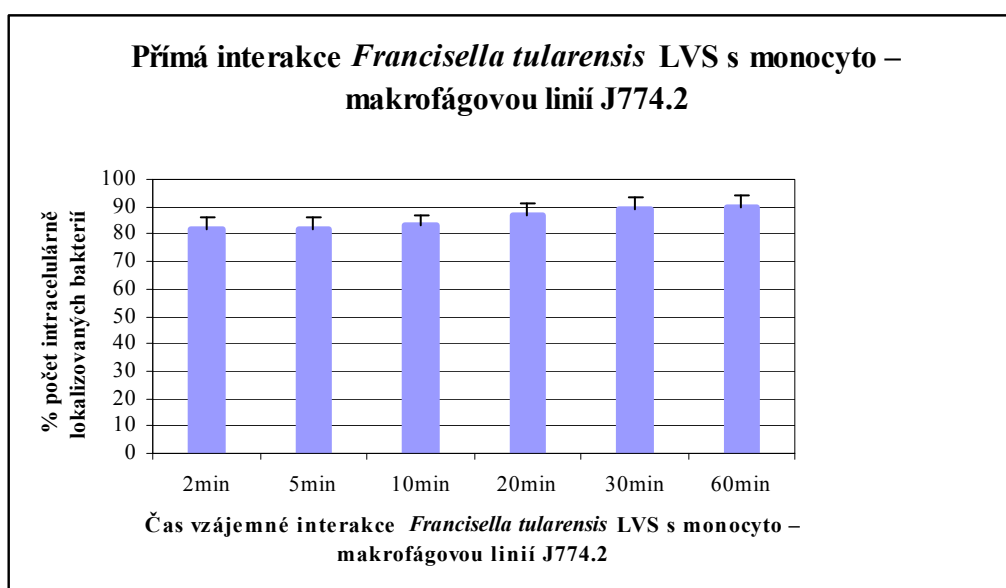
4.1.1 Přímá interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 – fluorescenční mikroskopie

Pro charakterizaci přímé interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 (MOI=500) v časných intervalech byl vstup bakterií do makrofágů synchronizován dle postupu uvedeného v oddílu materiál a metodika. Přímá interakce bakterií s makrofágy byla sledována v časech 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minut po synchronizovaném kontaktu bakterií s naadherovanými buňkami J774.2. Pro určení internalizovaných bakterií uvnitř hostitelských buněk byla zvolena metoda fluorescenční mikroskopie. Intracelulárně lokalizované bakterie byly odlišeny od extracelulárních pomocí navázaného fluoroforu Alexa 488 (zelená barva) viz materiál a metodika. Intracelulárně lokalizované bakterie byly kvantifikovány. Celkem bylo spočítáno 200 buněk J774.2 v každém časovém intervalu. Experiment byl proveden celkem třikrát. Průměrné hodnoty počtu internalizovaných bakterií byly graficky znázorněny (graf 1). Synchronizovaným vstupem *Francisella tularensis* LVS do buněk J774.2 při MOI=500 bylo docíleno, že 80% hostitelských buněk bylo v přímé interakci s bakteriemi po 2, 5, 10ti minutách vzájemné interakce a po 20, 30, 60ti minutách vzájemné interakce bylo kolonizováno bakteriemi dokonce 90% hostitelských buněk.



Obr.5: Přímá interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2

Popis obr. 5: Intracelulární bakterie *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po prvním vzájemném kontaktu. Zeleně jsou zobrazeny intracelulární bakterie (žlutá šipka), modře jsou zobrazeny jádra J774.2 buněk (bílá šipka).



Graf 1: Přímá interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2

Popis graf 1: Intracelulární bakterie *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po prvním vzájemném kontaktu. Z grafu vyplývá, že 80% hostitelských buněk internalizovalo bakterie po 2, 5, 10ti minutách vzájemné interakce a 90% hostitelských buněk internalizovalo bakterie po 20, 30, 60ti minutách vzájemné interakce.

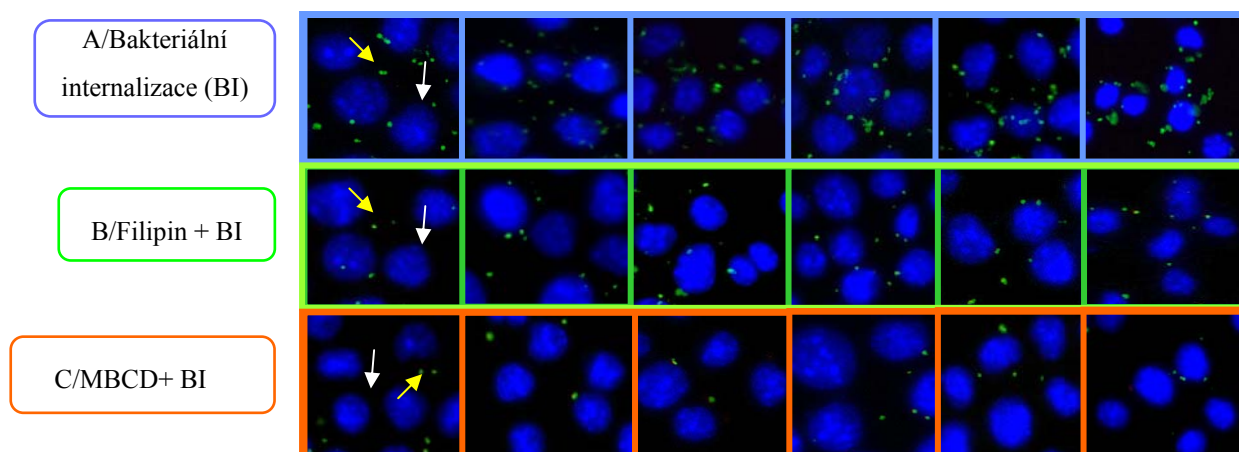
4.1.2 Přímá interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 – metoda CFU

Pro charakterizaci přímé interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2 (MOI = 500) v časných intervalech byl vstup bakterií do makrofágů synchronizován dle postupu uvedeného v oddílu materiál a metodika. Přímá interakce bakterií s makrofágy byla sledována v časech 2, 5, 10, 20, 30 a 60 minut po synchronizovaném kontaktu bakterií s naadherovanými buňkami J774.2. Živé internalizované bakterie byly určeny prostřednictvím metody CFU. Experiment byl proveden dvakrát vždy v triplicátu. Výsledný počet internalizovaných bakterií v každém časovém intervalu byl vztažen na počet hostitelských buněk. Bylo zjištěno, že na 1 hostitelskou buňku buněčné linie J774.2 odpovídají 2 živé bakterie *Francisella tularensis* LVS.

4.2 Vstup *Francisella tularensis* LVS přes lipidové rafty

4.2.1 Vstup *Francisella tularensis* LVS přes lipidové rafty – metoda fluorescenční mikroskopie

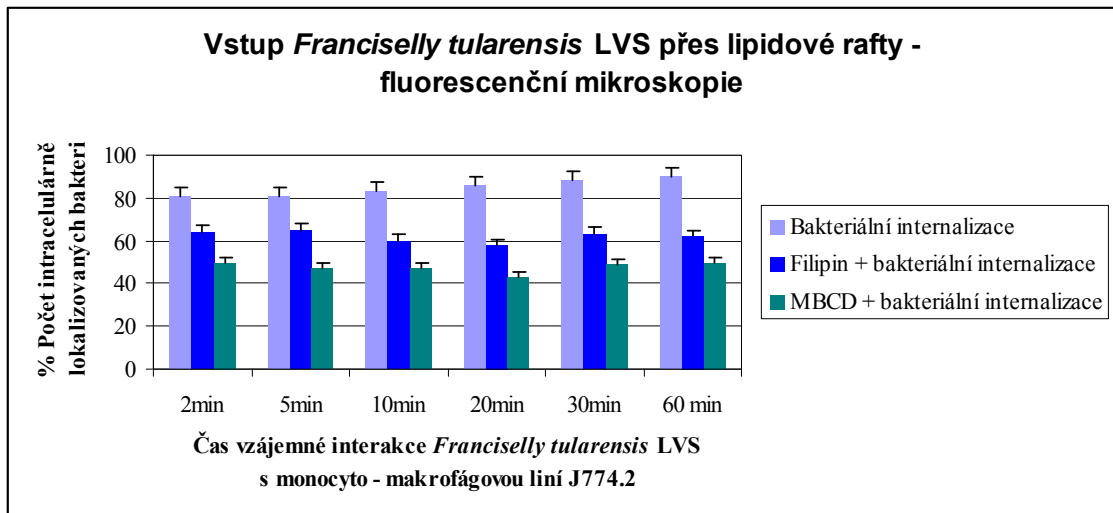
Vstup *Francisella tularensis* LVS přes lipidové rafty byl testován pomocí látek selektivně ovlivňující membránový cholesterol metyl- β -cyclodextrin a filipin. MBCD selektivně vyvazuje membránový cholesterol a filipin se pouze na cholesterol váže. Ovlivněním membránového cholesterolu dochází k rozpadu lipidových raftů, jehož důsledkem je pokles pohlcení bakterií makrofágy, pokud bakterie při svém vstupu do hostitele využívají alternativní endocytickou cestu přes lipidové rafty. Ke kvantifikaci počtu internalizovaných bakterií byla provedena fluorescenční mikroskopická studie. Celkem bylo spočítáno 200 buněk J774.2 v každém časovém intervalu u kontrolní skupiny a skupin ovlivněných MBCD a filipinem (Obr. 6). Experiment byl proveden celkem třikrát. Průměrné hodnoty počtu internalizovaných bakterií byly graficky znázorněny (Graf 2). Mikroskopickými studiemi bylo prokázáno, že ovlivněním J774.2 buněk jak filipinem tak MBCD došlo k signifikantnímu poklesu počtu intracelulárně lokalizovaných bakterií (Graf 2). Statistická významnost byla určena studentským t – testem ($p < 0.05$).



Obr.6: Vstup *Francisella tularensis* LVS přes lipidové rafty

Popis obr. 6: A/Intracelulární bakterie *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po prvním vzájemném kontaktu. B/ Vliv filipinu na internalizaci *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po prvním vzájemném kontaktu.

C/ Vliv metyl – β – cyclodextrinu na internalizaci *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po prvním vzájemném kontaktu. Zeleně jsou zobrazeny intracelulární bakterie (žlutá šipka), modře jsou zobrazeny jádra J774.2 buněk (bílá šipka).



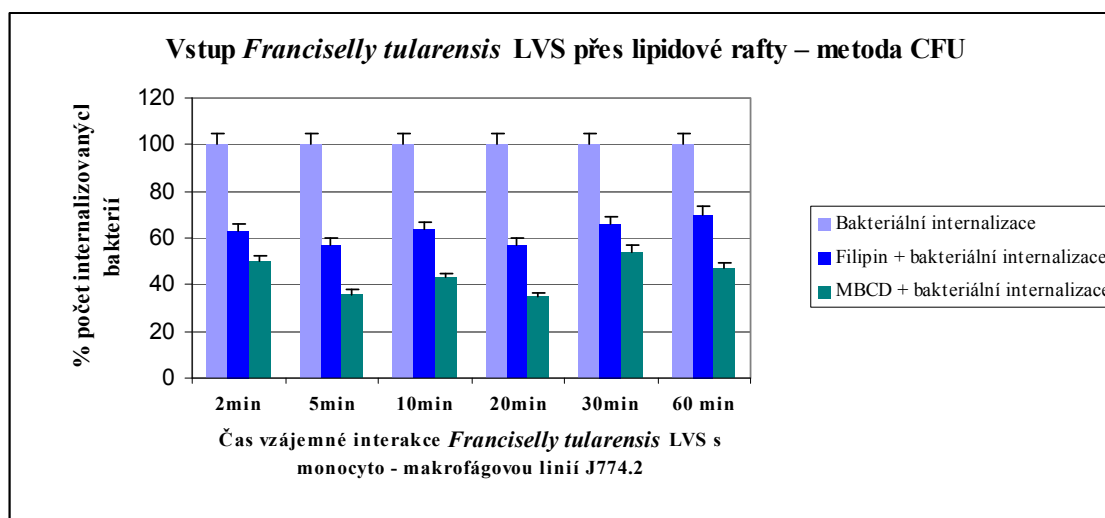
Graf 2: Vstup *Franciselly tularensis* LVS přes lipidové rafty – metoda fluorescenční mikroskopie

Popis graf 2: Intracelulárně lokalizované bakterie *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po ovlivnění hostitelských buněk filipinem, MBCD nebo bez ovlivnění. Z grafu je patrný pokles internalizace bakterií: po ovlivnění filipinem (modrý sloupec) i MBCD (zelený sloupec). Po ovlivnění filipinem pouze 60% makrofágů v každém časovém intervalu bylo schopno pohltnout bakterie. Po ovlivnění J774.2 buněk MBCD dokonce pouze 50% hostitelských buněk internalizovalo bakterie po 2, 5, 10, 20, 30, 60ti minutách vzájemné interakce.

4.2.2 Vstup *Franciselly tularensis* LVS přes lipidové rafty – metoda CFU

Vstup *Franciselly tularensis* LVS přes lipidové rafty byl testován pomocí látek selektivně ovlivňující membránový cholesterol MBCD a filipin. Živé internalizované bakterie po ovlivnění membránového cholesterolu hostitelských buněk byly určeny prostřednictvím metody CFU. Bylo zjištěno, že na 1 hostitelskou buňku buněčné linie J774.2 odpovídají 2 živé bakterie *Francisella tularensis* LVS (v grafu 3 znázorněno jako 100% J774.2 buněk v přímé interakci s bakterií) Po ovlivnění hostitelských makrofágů filipinem, MBCD došlo k signifikantnímu poklesu živých internalizovaných bakterií. Experiment byl proveden dvakrát vždy v triplikátu. Průměrné hodnoty počtu internalizovaných bakterií byly graficky

znázorněny (Graf 3). Statistická významnost byla určena studentským t – testem ($p < 0.05$).

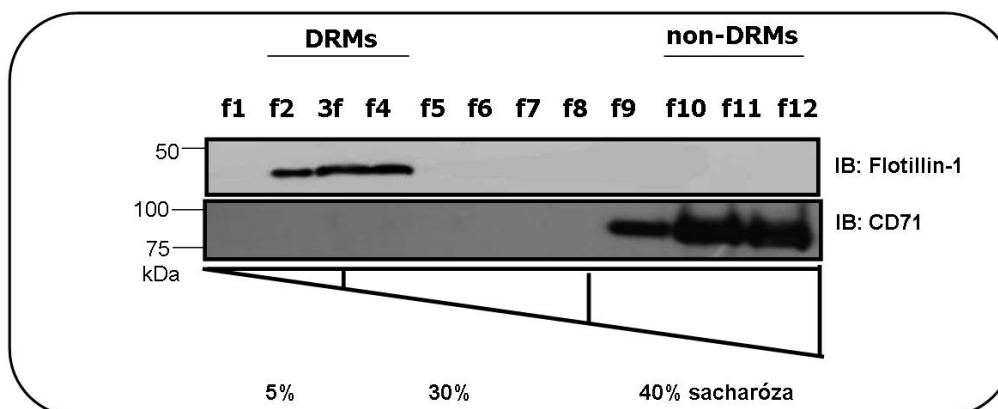


Graf 3: Vstup *Francisella tularensis* LVS přes lipidové rafty – metoda CFU

Popis graf 3: Živé intracelulárně lokalizované bakterie *Francisella tularensis* LVS po interakci s J774.2 buňkami v časové dynamice 2, 5, 10, 20, 30, 60 minut po ovlivnění hostitelských buněk filipinem, metyl- β -cyclodextrinem nebo bez ovlivnění. Z grafu je patrný pokles internalizace bakterií: po ovlivnění filipinem i MBCD. Po ovlivnění buněk filipinem klesl vstup buněk na 60% z původních 100%. Po ovlivnění J774.2 buněk MBCD byl bakteriální vstup snížen na 50% po 2, 30, 60ti minutách a po 5, 10, 20ti minutách vzájemné interakce dokonce až na 40%.

4.3 Izolace detergent – rezistentních membrán (DRMs) buněk J774.2

DRMs byly izolovány neionogenním 0,5% Tritonem-100 při 4°C a následně separovány pomocí ultracentrifugace na sacharózovém gradientu. Po ultracentrifugaci byl sacharózový gradient rozdělen na 12 frakcí. DRMs byly určeny na základě western blot analýzy známého raftového markeru flotillin – 1. Správné rozdělení raftové frakce na sacharózovém gradientu byla potvrzena western blot analýzou neraftového markeru – transferinový receptor viz obr. 7. Výsledek western blot analýzy je v souladu s teorií lipidových raftů.



Obr.7: Western blot analýza sacharózového gradientu

Popis obr. 7: Frakce pozitivní na raftový marker flotillin – 1 (f2-f4) byly analyzovány jako DRMs pomocí proteomiky.

4.4 iTRAQ kvantitativní proteomická analýza DRMs izolovaných z buněk J774.2 po interakci s *Francisella tularensis* LVS

DRMs byly izolovány z buněk J774.2 po interakci s *Francisella tularensis* LVS 2, 5, 10minut. Po extrakci raftových proteinů byly vzorky zpracovány dle obecného protokolu pro iTRAQ analýzu od firmy Applied Biosystems (viz Příloha, materiál a metodika) a měřeny na MALDI TOF TOF. Analytické parametry separace peptidů a hmotnostně – spektrometrická analýza nejsou předmětem diplomové práce a byly provedeny personálem Ústavu molekulární patologie.

Celkem bylo identifikováno 150 proteinů v raftové oblasti. Většina identifikovaných proteinů patří do skupiny signálních molekul a cytoskeletárních proteinů. Proteiny důležité pro tvorbu tzv. signální platformy, kde dochází k přenosu signálu jsou uvedeny na obr. 8. Kvantitativní iTRAQ proteomickou analýzou jsme byli schopni určit rozdíly v přítomnosti proteinů v raftové oblasti po kontaktu s *Francisella tularensis* LVS. Na obr. 9 je zobrazeno jednoduché schéma zachycující abundanci raftových proteinů v časové dynamice. Podle raftového modelu plazmatické membrány dochází po stimulaci daným ligandem, v našem případě celé bakterie, k tvorbě signální platformy, která je tvořena z nestálých vysoce

dynamických a organizovaných membránových domén. Tyto domény jsou charakteristické svým specifickým lipidovým a proteinovým složením. Pomocí iTRAQ kvantitativní proteomické analýzy se nám podařilo zanalyzovat raftové proteiny z DRMs oblasti v časové dynamice. Z naší iTRAQ kvantitativní proteomické analýzy vyplývá, že po internalizaci *Francisella tularensis* LVS dochází ke změně přítomnosti následujících raftových proteinů:

1/proteiny, jejichž přítomnost v DRMs oblasti stoupá v čase (2-10minut) po interakci s *Francisellou tularensis* LVS

1. **Receptor CD64** – vysoce afinitní Fc – receptor, receptor zprostředkující fagocytózu opsonizovaných bakterií, antigenní prezentaci, bylo prokázáno, že receptor je součástí lipidových raftů.⁶³
2. **Lyn kináza** – tyrozin –protein kináza, vazbou ligandu na povrchový receptor dochází k agregaci membránových mikrodomén a vytvoření signální platformy, dále jsou raftové proteiny fosforylovány aktivovanou tyrozinovou kinázou, bylo prokázáno, že kináza je součástí lipidových raftů.⁶⁴
3. **Fgr kináza** - tyrozin –protein kináza, vazbou ligandu na povrchový receptor dochází k agregaci membránových mikrodomén a vytvoření signální platformy, dále jsou raftové proteiny fosforylovány aktivovanou tyrozinovou kinázou, bylo prokázáno, že kináza je součástí lipidových raftů.⁶⁵
4. **Adaptivní molekula NTAL (LAT2)** – (non – T cell activation punker) adaptorový protein, který byl objeven v roce 2002 laboratoří Prof. RNDr. Václava Hořejšího, Csc.,⁶⁶ stimulace vysokoafinitního receptoru (FceRI) vede k tyrosinové fosforylaci adaptorového proteinu NTAL a přenosu signálu do nitra buňky, bylo prokázáno, že adaptor je součástí lipidových raftů.⁶⁷
5. **Gnai2 – guanin nukleotid vázající protein (G – protein)**, protein je součástí přenosu signálu do nitra buňky při zánětlivé reakci.⁶⁸
6. **Gng2 - guanin nukleotid vázající protein gama 2 (G – protein)**, protein je součástí přenosu signálu do nitra buňky, aktivací G – proteinu dochází k regulaci buněčného pohybu prostřednictvím aktivace malých G – protein.⁶⁹
7. **Mylc2b - Myosin II regulující protein**, protein regulující funkci motorových proteinů během buněčného pohybu či cytokineze.⁷⁰
8. **Cytoskeletární proteiny – tubulin beta 5, tubulin gamma 1**, tvoří mikrotubuly, jako cytoskeletální struktura napomáhá buňkám v transportu váčků, bylo prokázáno, že tubulin 1 je součástí lipidových raftů.⁷¹

2/proteiny, jejichž přítomnost v DRMs oblasti stoupá v prvních dvou

intervalech (2, 5minut) po interakci s *Francisellou tularensis* LVS

1. **receptor CD44** – povrchový receptor, jehož ligandem je hyaluronová kyselina, molekula důležitá v adhezi leukocytů, bylo ⁷² a podílí se na bakteriální internalizaci, je součástí lipidových raftů.⁷³
2. **raftový strukturální protein Flotillin -1** – integrální protein, který je součástí lipidových raftů a caveoly, v raftové oblasti se vyskytuje nezávisle na caveolinu, tvoří tzv. flotillinový komplex, hraje důležitou roli jak v procesu endocytózy, tak v membránovém transportu či signalizaci.⁷⁴
3. **raftový strukturální protein Flotillin – 2** - integrální protein, který je součástí lipidových raftů, hraje důležitou roli jak v procesu endocytózy, tak v membránovém transportu či signalizaci.⁷⁵
4. **malý GTP protein Rac1** – protein modulující funkci cytoskeletu, prostřednictvím Rac 1 proteinu dochází k utváření membránových lamelipodií, bylo prokázáno, že Rac 1 je součástí lipidových raftů.⁷⁶
5. **malý GTP protein RhoA** – protein modulující funkci cytoskeletu, prostřednictvím Rho A proteinu dochází k ovlivnění organizace aktinu během buněčné adheze.⁷⁷

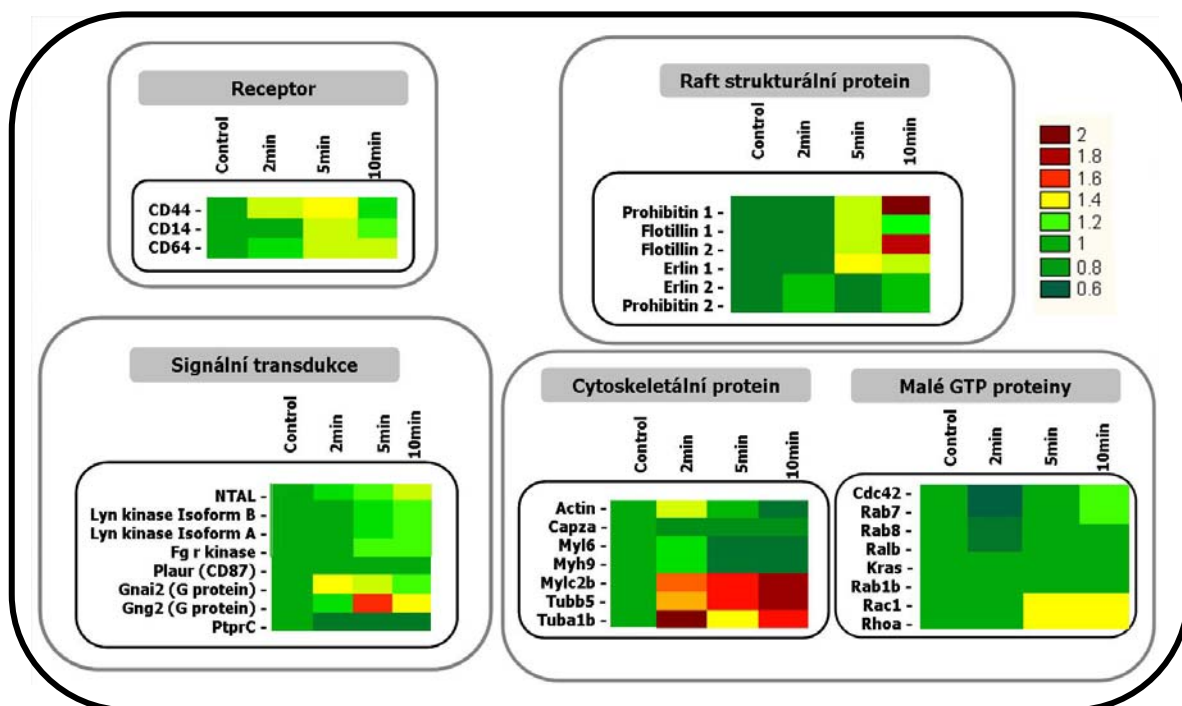
3/proteiny, jejichž přítomnost v DRMs oblasti stoupá pouze v intervalu 5ti minut po interakci s *Francisellou tularensis* LVS

1. **receptor CD14** – receptor pro LPS, součást přirozené imunity při rozpoznávání nebezpečných bakteriálních patogenů, je součástí lipidových raftů.⁷⁸
2. **fosfatáza PtpnC** – CD45R, protein tyrozin fosfatáza, reguluje aktivitu tyrozinových kináz, bylo zjištěno, že po aktivaci TCR T buněk virem HIV je molekula CD45 lokalizována oblast mimo lipidových raftů, u makrofágů byl prokázán opak.⁷⁹

4/proteiny, jejichž přítomnost v DRMs oblasti klesá v průběhu interakce s *Francisellou tularensis* LVS

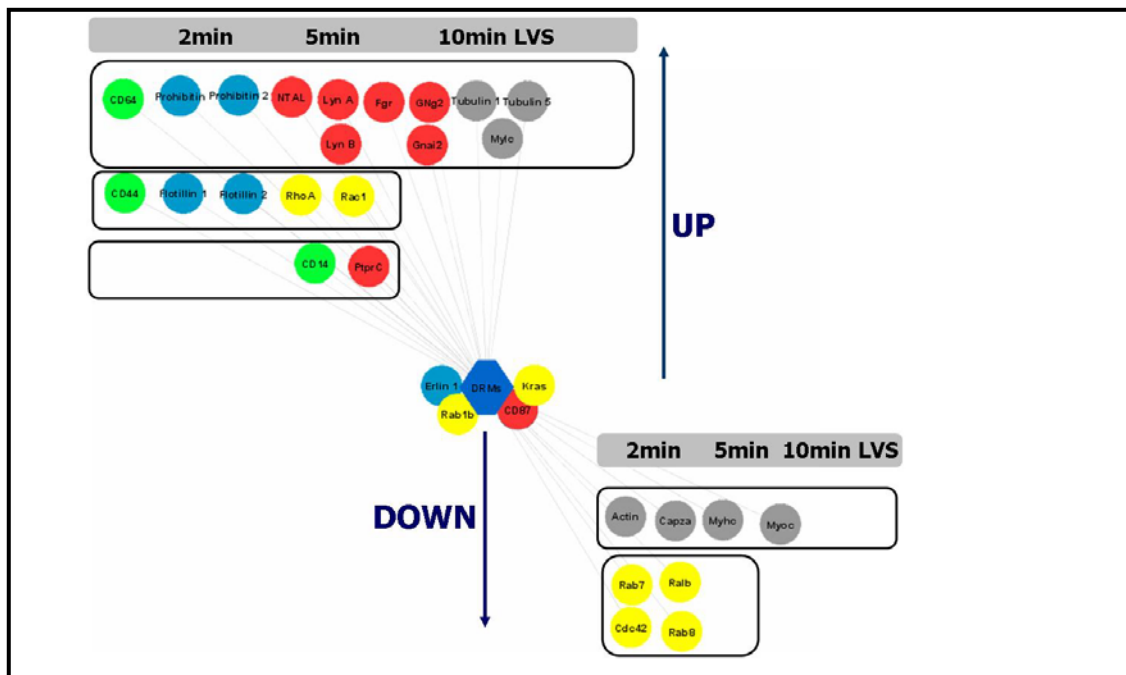
1. **cytoskeletární proteiny: Actin** – součást cytoskeletu, jako cytoskeletální struktura napomáhá buňkám v nejrůznějších pochodech jako pohyb, transport váčků a signalizace, **CAPZA (F – actin capping protein)** - negativně reguluje růst aktinového vlákna, **Myl6 (myosin light chain)**, **Myhc (myosin heavy chain)** - součást cytoskeletu, jako cytoskeletální struktura napomáhá buňkám v pohybu, organizace lipidových raftů v membráně je spojeno s přeuspořádáním cytoskeletu.⁸⁰

2. **malý G – protein – Cdc42** - protein modulující funkci cytoskeletu, prostřednictvím Cdc42 proteinu dochází k utváření membránových filopodií.⁷⁶
3. **malý G – protein – Ras relace Rab7 protein-** protein modulující funkci cytoskeletu, spojen s pozdními endozomy, je nezbytný pro transport proteinů z pozdních endozomů do lysosomů.⁸¹
4. **malý G – protein – Ras related Rab8 protein-** protein modulující funkci cytoskeletu, reguluje transport tranferinového receptoru (neraftový marker).⁸²
5. **malý G – protein – Ras related Rab protein** - protein modulující funkci cytoskeletu, u nádorových buněk negativně reguluje apoptózu.⁸³



Obr. 8: Kvantitativní změna přítomnosti vybraných proteinů identifikovaných v raftové oblasti

Popis obr. 8: Vybrané proteiny se vztahem k bakteriální patogenezi byly rozděleny podle svých molekulárních funkcí – receptor, raftový strukturální protein, proteiny zahrnuté v signalizaci a cytoskeletární proteiny. Změna přítomnosti proteinu během bakteriální interakce byla zobrazena graficky dle stupnice uvedené na obrázku.



Obr.9: Kvantitativní změna přítomnosti vybraných proteinů identifikovaných v raftové oblasti

Popis obr.9: Vybrané proteiny se vztahem k bakteriální patogenezí byly rozděleny podle svých molekulárních funkcí – receptor, raftový strukturální protein, proteiny zahrnuté v signalizaci a cytoskeletární proteiny. Proteiny, jejichž přítomnost se v raftové oblasti zvýšila tvoří tzv. signální platformu charakterizující interakci *Francisella tularensis* LVS s makrofágy J774.2 buněčné linie.

5. Diskuze

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat roli membránových raftů hostitele během interakce intracelulárního patogena *Francisella tularensis* LVS s makrofágy na modelu myší monocyto - makrofágové linie J774.2. Pochopení mechanismů interakce je důležité vzhledem k vysoké patogenitě bakterie a nebezpečí jejího potenciačního zneužití jako biologické zbraně. O molekulárním mechanismu patogenního působení bakterie není zatím mnoho dostupných informací.

Francisella tularensis LVS je intracelulární patogen, který je schopen infikovat jak fagocytující tak nefagocytující buňky.²⁶ Makrofágy patří k buňkám první obranné linie proti vstupujícím patogenům. Hlavní role makrofágů v obraně proti patogenním bakteriím je rozpoznání nebezpečného patogena, jeho pohlcení a zneškodnění ve fagolysozomu. Dále fungují jako antigen – prezentující buňky.⁸⁴

Velká část bakterií však v průběhu času vymyslela, jak obejít nástroje imunitního systému. Jsou známy celkem tři hlavní strategie, které bakterie využívají ve svém boji s makrofágy: některé bakterie jako např. *Listeria monocytogenes* nebo *Shigella* spp. unikají z fagozomu do cytoplazmy po degradaci fagozomální membrány, další bakterie jako např. *Coxiella burnetii* jsou schopny se adaptovat na kyselé prostředí fagolysozomu a poslední skupinu tvoří bakterie jako např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*, které moduluji biogenezi fagozomu, čímž zabrání jeho fúzi s lysozomem a tvorbě fagolysozomu.²⁶

Francisella tularensis LVS vstupuje do makrofágů zvláštním způsobem fagocytózy, tzv. looping fagocytózou. Přibližně po 2 hodinách infekce bakterie uniká z fagozomu do cytozolu, kde je schopna se množit.⁸⁵ Důvodem, proč bakterie uniká do cytosolu je pravděpodobně získání dostatečného množství živin. Doposud není známo, jakým mechanismem bakterie opouští fagozóm. Na rozdíl od *Listeria monocytogenes* nebo *Shigella* spp. nevyužívá *Francisella tularensis* LVS sekretované proteiny pro porušení fagozomální membrány. Nicméně bylo zjištěno, že většina bakterií, které ovlivňují funkce imunitního systému, využívají alternativní endocytické dráhy a vstupují do hostitelské buňky přes specializovanou část membrány tzv. lipidové nebo membránové rafty.⁴⁸

Specializované membránové domény či lipidové rafty jsou organizované struktury nacházející se uvnitř plazmatické membrány vyznačující se ojedinělým lipidovým a proteinovým složením. 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.⁸⁶

Nejčastějším způsobem dokazující roli lipidových raftů v internalizaci bakteriálního patogena je ovlivnění hladiny membránového cholesterolu. Membránový cholesterol tvoří důležitou složku lipidových raftů. Vyvázáním membránového cholesterolu dochází k porušení stability raftů a přerušení přenosu daného signálu nutného pro bakteriální internalizaci. K ovlivnění membránového cholesterolu se nejčastěji využívá filipin (blokuje cholesterol) nebo MBCD s nystatinem (látky vyvazující cholesterol)⁸⁷.

Na základě dostupných informací o molekulární patogenezi *F. tularensis* LVS jsme předpokládali, že bakterie pravděpodobně vstupuje do buňky přes lipidové rafty. Současně v roce 2008 vyšla publikace týkající se vstupu *F. tularensis* LVS přes specializované membránové domény bohaté na cholesterol či lipidové rafty. Podobně jako v naší práci byl k evidenci vstupu bakterie přes lipidové rafty zvolen funkční test s využitím látek filipinu a MBCD. Na rozdíl od publikované práce je předmětem našeho zkoumání interakce makrofágů s neopsonizovaným bakteriálním kmenem. Je známo, že bakterie jsou špatně internalizovány buněčnými liniemi makrofágů. Z těchto důvodů jsou bakterie opsonizovány.⁸⁸ My jsme přesto zůstali u interakce s neopsonizovaným patogenem.

Jako první krok jsme zavedli vlastní model interakce, který jsme otestovali pomocí metod fluorescenční mikroskopie a metody CFU. Z mikroskopických studií vyplývá, že cca 80% buněk v každém časovém intervalu je v přímé interakci s bakterií. Po zavedení synchronizované fagocytózy jsme se přesvědčili, zda i neopsonizovaný patogen vstupuje do makrofágů přes raftovou oblast. Po ovlivnění

buněk J774.2 filipinem a MBCD byla určena životnost buněk J774.2. Životnost buněk se významně nelišila od viability buněk bez ovlivnění. Po ovlivnění buněk J774.2 došlo k signifikantnímu poklesu internalizace bakterií do makrofágů. Pokles internalizace bakterií odpovídá působení použitých látek. Zatímco u filipinu, který pouze blokuje cholesterol, došlo k poklesu intracelulárně lokalizovaných bakterií z cca 80% na cca 60%, u MBCD až na cca 50%.

Hlavním důvodem, proč jsou lipidové rafty předmětem zájmu vědců je, že obsahují signální molekuly, které hrají důležitou roli v nejrůznějších biologických procesech.⁸⁹ Studium lipových raftů v interakci *Francisella tularensis* LVS s makrofágy na modelu myši monocyto - makrofágové linie J774.2. jsme se snažili přispět k odhalení molekulárního mechanismu vzájemné interakce. Jako nástroj pro studium interakce hostitele s patogenem byl zvolen proteomický přístup. Proteomika je obor, který umožňuje identifikaci a kvantifikaci veškerých proteinů produkovaných určitou buňkou, tkání nebo organismem, definici vzájemných interakcí těchto proteinů nezbytných pro určitou biologickou funkci, a stanovení přesné trojrozměrné struktury proteinů klíčové pro identifikaci nízkomolekulárních ligand.⁹⁰

Pro studium proteinů asociovaných s rafty se využívá metoda na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností – nerozpustnost raftů v neionogenním detergentu při 4°C. Touto metodou získáme část plazmatické membrány, označovanou jako detergent – rezistentní membrány (DRMs). Je důležité si uvědomit, že takto získané membránové fragmenty nejsou totožné s lipidovými rafty uvnitř buňky *in vivo*. Použitím různého detergentu, jeho jiné koncentrace nebo jiného typu buněk získáváme DRMs různého složení. Odlišnosti v molekulárním složení izolovaných lipidových raftů se projevují jak v lipidové tak v proteinové složce. Tyto důvody vedly ke sporům, zda vůbec lipidové rafty existují.⁹¹ To, že lipidové rafty nejsou pouze arteficiálním produktem izolace použitím detergentů, dokazuje i jejich izolace bez použití detergentu pomocí uhličitanu sodného.⁹²

V našem případě byly lipidové rafty izolovány extrakcí 0,5 % neionogenním detergentem Triton X-100. Tento detergent je standardně používán při izolaci DRMs.⁹³ Správnou izolaci DRMs byla prokázána western blot analýzou známého raftového markeru (flotillin-1) a známého neraftového markeru (transferinový

receptor).⁹⁴ Výsledek western blot analýzy koreluje s teorií lipidových raftů.

Vzhledem k úspěšné izolaci DRMs jsme se pokusili určit, jak souvisí funkce lipidových raftů u makrofágů při časně interakci *F. tularensis* LVS. Interakce bakterie s hostitelem byla sledována v časových intervalech 2, 5 a 10 minut pro prvním vzájemném kontaktu. Pro kvantifikaci změny přítomnosti proteinů v raftové oblasti po interakci s *F. tularensis* LVS v čase, byla zvolena iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation) metoda. iTRAQ využívá ke kvantifikaci chemického značení. iTRAQ značky jsou připraveny tak, aby derivatizované peptidy měly stejnou molekulou hmotnost v MS módu. Každá značka je tvořena tzv. reportérovou částí, do které jsou zabudovány různé stabilní isotopy a vyrovnávající částí, která slouží k dosažení stejných molekulových hmotností derivatizovaných peptidů. Při fragmentaci v MS/MS módu se od modifikovaných peptidů odděluje reportérová část, která v závislosti na použité značce nabývá molekulových hmotností 114.1, 115.1, 116.1 nebo 117.1. Kvantifikace probíhá tedy v MS/MS módu. Tímto přístupem je možné v současnosti kvantifikovat až 8 vzorků najednou.⁹⁵

Výsledkem iTRAQ kvantitativní proteomické analýzy bylo 150 proteinů asociovaných s rafty. Většina identifikovaných proteinů patřila mezi signální molekuly, transportní proteiny a cytoskeletární proteiny. Podobně jako v již publikovaných proteomických studiích, i v naší analýze byly identifikované kontaminanty z ribozómů a nukleárních proteinů.⁹⁶

Nicméně, u proteinů asociovaných s rafty byla prokázána dynamická změna v průběhu interakce s bakterií. Proteiny s významem k interakci s bakterií byli zobrazeni na obr. 8, 9. Proteiny, jejichž přítomnost se v oblasti raftů po interakci s bakterií zvýšila, tvoří shluklé lipidové rafty tzv. signální platformu. Tato platforma vyjadřuje reakci makrofágů na přítomnost bakterie a současně vypovídá o tom, jak bakterie mění signály imunitního systému ve svůj prospěch. Předmětem dalšího zkoumání bude optimalizace proteomické analýzy a ověření výsledků proteomické analýzy funkčními testy.

6. Závěr

V průběhu mé diplomové práce se podařilo vyvinout metodu synchronizovaný model interakce *Francisella tularensis* LVS s monocyto – makrofágovou linií J774.2. Bylo prokázáno, že neopsonizovaná bakterie *Francisella tularensis* LVS vstupuje do J774.2 buněk přes lipidové rafty. Byla provedena iTRAQ kvantitativní proteomická analýza detergent – rezistentních membrán v časové dynamice 2, 5 a 10minut po prvním vzájemném kontaktu. iTRAQ kvantitativní proteomickou analýzou bylo identifikováno 150 proteinů asociovaných s rafty. Největší část proteinů tvořily proteiny spojené se signalizací, membránovým transportem a cytoskeletem. Proteiny s potenciálním vztahem k patogenezi *Francisella tularensis* LVS tvoří tzv. signální platformu. Složení této signální platformy charakterizuje reakci makrofágů na přítomnost bakterie a současně vypovídá o tom, jak bakterie mění signály imunitního systému ve svůj prospěch. Předmětem dalšího zkoumání bude optimalizace proteomické analýzy a ověření výsledků proteomické analýzy funkčními testy.

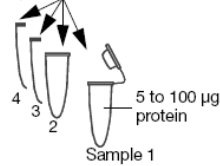
7. Přílohy

Příloha 1:

A Reduce the Proteins and Block Cysteine

- 1a. To each of up to four sample tubes, add 20 μL Dissolution Buffer and 1 μL Denaturant.

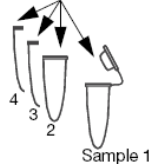
20 μL Dissolution Buffer,
1 μL Denaturant



- b. Vortex to mix.

- 2a. To each sample tube, add 2 μL Reducing Reagent.

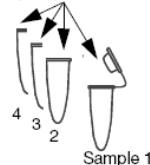
2 μL Reducing Reagent



- b. Vortex to mix, then spin.
c. Incubate the tubes at 60 °C for 1 hour.
d. Spin to bring the sample to the bottom of the tube.

- 3a. To each tube, add 1 μL Cysteine Blocking Reagent.

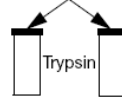
1 μL Cysteine Blocking Reagent



- b. Vortex to mix, then spin.
c. Incubate the tubes at room temperature for 10 minutes.

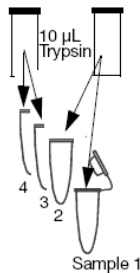
B Digest the Proteins with Trypsin

- 1a. Reconstitute a vial of trypsin with 25 μL MilliQ® Water or equivalent. (For three or four samples, reconstitute two vials.)
25 μL MilliQ® Water



- b. Vortex to mix, then spin.

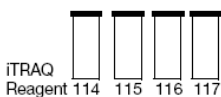
- 2a. To each sample tube, add 10 μL of the trypsin solution.



- b. Vortex to mix, then spin.
c. Incubate at 37 °C overnight (12 to 16 hours).
d. Spin to bring the sample digest to the bottom of the tube.

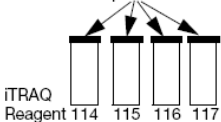
C Label the Protein Digests with iTRAQ™ Reagents

- 1a. Allow iTRAQ™ reagent(s) required to reach room temperature.



- b. Spin to bring the solution to the bottom of the tube.

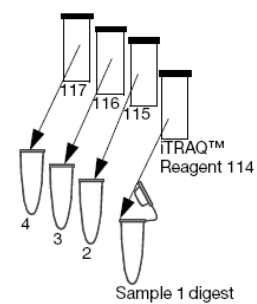
- 2a. To each iTRAQ™ reagent required, add 70 μL of ethanol.



- b. Vortex to mix, then spin.

C Label the Protein Digests with iTRAQ™ Reagents (continued)

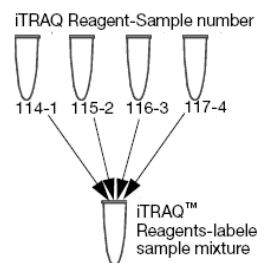
- 3a. Transfer the contents of one iTRAQ™ Reagent vial to one sample tube.



- b. Vortex to mix, then spin.
c. Incubate at room temperature for 1 hour.

D Combining the iTRAQ™ Reagent-Labeled Digests for Analysis

- 1a. Combine the contents of each iTRAQ™ Reagent-labeled sample tube in a fresh tube.†



- b. Vortex to mix, then spin.

IMPORTANT! Before LC/MS/MS analysis, clean up the sample mixture using cation exchange. If the sample mixture is complex, clean up and fractionate using high-resolution cation exchange.

†(Optional) Before combining the samples, reduce the organic concentration, then clean up an aliquot of each labeled sample digest using a ZipTip®. Analyze each aliquot by MS/MS to verify that you see peaks at the m/z of the appropriate iTRAQ™ Reagent reporter group. If not, relabel the protein digest.

Obr. 10: jednoduché schéma iTRAQ protokolu

8. Seznam literatury

1. Černý Z.: Tularémie – historie, epidemiologie, klinika, diagnostika a léčba. *Časopis lékařů českých*, 2002, 9:270-275.
2. Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball, R. W.: Tularemia. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15:631–646.
3. Oyston P. C. F.: *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, 57:921-930.
4. Saslaw S., Eigelsbach H.T., Wilson H.E.: Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch Intern Med*, 1961, 107:702-714.
5. Dennis D. T., Inglesby T. V., Henderson D. A., Bartlett J. G., Ascher M. S., Eitzen E., Fine A. D., Friedlander A. M., Hauer J., Layton M., Lillibridge S. R., McDade J. E., Osterholm M. T., O’Toole T., Parker G., Perl A. M., Russell P. K., and Tonat K.: Tularemia as biological weapon and public health management. *JAMA*, 2001, 285:2763-2773.
6. Oyston P. C. F., Sjostedt A., Titball R. W.: Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature Reviews*, 2004, 2:967-978.
7. Tärnvik A., Berglund L.: Tularaemia. *Eur. Respir. J.* 2003; 21, 361–373.
8. <http://www.szu.cz/tema/prevence/opatreni-pri-vyskytu-tularemie-v-cr-1>
9. McLendon M. K., Apicella M. A., Allen L. H.: *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol*, 2006, 60:167–85.
10. Wayne C. V.: Vaccines against *Francisella tularensis* – past, present and future. *Expert Rev. Future vaccine*, 2004, 3:89-96.
11. Medzhitov R, Janeway C Jr.: Innate immunity. *N Engl J Med*, 2000, 343:338-344
12. Dale D.C, Boxer L., Liles W. C.: The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 2008, s112, 4: 935-945.
13. Gregory S. H., Wing E. J.: Neutrophil–Kupffer cell interaction: a critical component of host defense to systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.*, 2002, 72:239–248.
14. Lanzavecchia A.: Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8:348–354.

15. Medzhitov R., Janeway C. A. Jr.: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 2000, 173:89-97.
16. Janeway C. A. Jr., Medzhitov R.: Innate Immune recognition. *Annu. Rev. Immunol*, 2002, 20:197-216.
17. Carpenter S., O'Neill L. A. J.: How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cellular Mikrobiology*, 2007, 9(8):1891-1901.
18. Strober W., Murray P.J., Kitani A., Watanabe, T.: Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6:9-20.
19. Haas A.: The Phagosome: Compartment with a License to Kill. *Traffic. Rev.*, 2007, 8:311-330.
20. Carpenter S., O'Neill L. A. J.: How important are Toll-like receptors for antimicrobial response? *Cellular Mikrobiology*, 2007, 9:1891-1901.
21. Champion J. A., Mitragotri S.: Role of target geometry in phagocytosis. *PNAS*, 2006, s. 103, 13:4930-4934.
22. Aderem A., Underhill D. M.: Mechanism of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, 17:593-623.
23. Rosenberger C., Inlay B.: Phagocyte Sabotage: Disruption of Macrophage signalling by bacterial Pathogens. *Molecular Cell Biology*, 2003, 4:385-396.
24. Bhavsar A. P., Guttman J. A., Finlay B. B.: Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogen. *Nature Publishing Group*, 2007, 18:827-834.
25. Santic M., Molmeret M., Klose K. E., Abu Kwaik Y.: *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol.*, 2006; 1:37-44.
26. Cole L. E. a kol.: Macrophage Proinflammatory Response to *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain Requires Coordination of Multiple signaling Pathways. *Journal of Immunol.*, 2008, 180:6885-6891.
27. Clemens D. L., Horwitz M. A.: Uptake and Intracellular Fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 160-187.
28. Thakran S., Li H., Lavine Ch. L., Miller M. A., Bina J. E., Bina X. R., Re F., Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 Heterodimer. *J. Biol. Chem.*, 2008, 7:3751-3760.

29. Golovliov I., Baranov V., Krocova Z., Kovarova H., Sjöstedt A.: An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* Can Escape the Phagosome of Monocytic Cells. *Infection and Immunity*, 2003, 10:5940-5950.
30. Sjöstedt A.: Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes and Infection, Reviews*, 2005, 8:561-567.
31. Checroun C., Wehrly T. D., Fischer E. R., Hayes S. F., Celli J.: Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after. *PNAS*, 2006, 39:14578-14583.
32. 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. Immun.* 2004, s. 72, 6:3204-3217.
33. Fortier A. H. a kol.: Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: Identification of cytokines, effector cell, and effector molecules. *Inf. Immun.* 1992, s. 60, 3:817-825.
34. Simons K., Vaz W. L. C.: Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annu. Rev. Bio.*, 2004, 269-296.
35. Brown D. A.: Lipid Rafts, Detergent-Resistant Membranes, and Raft Targeting Signale. *Reviews*, 2006, 21:430-439.
36. Pike L. J.: Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, 2006, 47:1597-1598.
37. Mayor S., Rao M.: Rafts: Scale-dependent, Active Lipid Organization at the Cell Surface. *Traffic*, 2004, 5:231-240.
38. Pike L. J.: lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J.*, 2004, 387:281-292.
39. Isabel C. Morrow and Robert G. Parton, Flotillins and the PHB Domain Protein Family: Rafts, Worms and Anaesthetics, *Traffic* 2005; 6: 725–740.
40. Cohen A. W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M. P.: Role of Caveolae and Caveolins in Health and Disease. *Physiol Rev.*, 2004, 84:1341-1379.
41. Simons K., Ehehalt R.: Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.*, 2002, 110, 597-603.

42. Ilangumaran S., Hoessli D.C.: Effects of cholesterol depletion by cyclodextrin on the sphingolipids microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.*, 1998, s. 335, 433-440.
43. Babyichuk E. B., Draeger A.: Biochemical characterization of detergent-resistant membranes: a systematic approach. *Biochem. J.*, 2006, s. 397, 407–416.
44. Simons K., Ehehalt R.: Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 2002, s. 110, 597-603.
45. Lai C. E.: Lipid rafts make for slippery platforms. *The Journal of Cell Biology*, 2003, s. 162, 3: 365-370.
46. Anderson R. G. W. a kol.: A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science*, 2002, s. 296, 1821-1826.
47. Nauciel Ch.: Immune Defense against Intracellular Bacterial Infections. 1999.
48. Zaas D. W., Duncan M., Wright J. R., Abraham S. N.: The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Science direct*, 2005, s. 1-9.
49. Mayor S., Pagano R. E.: Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews/ Molecular Cell Biology*, 2007, s. 603-612.
50. Kang P. B. a kol.: The human macrophage manose receptor direct *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *JEM*, 2005, 7 : 987–999.
51. Ireton K., Cossart P.: Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology*, 1998, 10:276-283.
52. Celli J. a kol.: *Brucella* Evades Macrophage Killing via VirB-dependent Sustained Interactions with the Endoplasmatic Reticulum. *JEM*, 2003, 4: 545-556.
53. Christie P. J., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S: Biogenesis, Architecture and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2005, 59:451-485.
54. Watarai M., Makino S., Fujii Y., Okamoto K., Shirahata T.: Modulation of *Brucella*-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication. *Cellular Mikrobiology*, 2002, 4:341–355.

55. Le Cabec V., Carre'no S., Moisand A., Bord Ch., Maridonneau-Parini I.: Komplement Receptor 3 (CD11b/CD18) Mediates Type I and Type II Phagocytosis Dutiny Nonopsonic and Opsonic Phagocytosis, Respectively. *The Journal of Immunology*, 2002, 169: 2003-2009.
56. Servin A. L.: Lipid rafts as portal entry and signalling platform for microbial pathogen. *La Roche-Posay*, 2002, s. 10-11.
57. Lafont F., Abrami L., Gisou van der Goot F.: Bacterial subversion of lipid rafts. *Science direct*, 2004, 7:4–10.
58. Cossart P. a kol.:Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. *Science*, 2004, s. 242-248.
59. Santos Mañes, Gustavo del Real and Carlos Martínez-A.: Pathogens: Raft Hijackers. *Nature Reviews Immunology* 2003, 3:557 – 568.
60. <http://publications.nigms.nih.gov/insidethecell/chapter2.html>
61. http://www.utmem.edu/molecular_sciences/directories/faculty/j_bina.php
62. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_support/documents/generaldocuments/cms_041448.pdf
63. Beekman J. M., Linden J. A., Winkel J. G. J., Krusen J. H. W.: FcγRI (CD64) resides constitutively in lipid rafts. *Immunology Letters*, 2008, 2:149-155.
64. Brdicka T. a kol.: *J Exp Med*, 2002, 1617–1626.
65. Zouny R. M., Holomka D., Baier B.: A lipid raft environment enhances Lyn kinase activity by protecting the active site tyrosine from dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, s. 278, 23: 20746–20752.
66. Rodgers W., Crise B., Rose J. K.: Signals determining protein tyrosine kinase and glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein targeting to a glycolipid-enriched membrane fraction. *Mol Cell Biol.*, 1994, 14(8): 5384-5391.
67. Macdonald J., Pike L. J.: A simplified method for the preparation of detergent-free lipid rafts. *J Lipid Res.*, 2005, 46(5):1061-7.
68. Fan H., Williams D. L., Zingarelli B., Breuel K. F., Teti G., Tempel G. E., Spicher K., Boulay G., Birnbaumer L., Halushka P. V., Cook J. A.: Differential regulation of lipopolysaccharide and Gram-positive bacteria induced cytokine and chemokine production in splenocytes by Galphai

- proteins. *Biochim Biophys Acta.*, 2006, 1763(10):1051-8.
69. Ueda H., Nagae R., Kozawa M., Morishita R., Kimura S., Nagase T., Ohara O., Yoshida S., Asano T.: Heterotrimeric G protein betagamma subunits stimulate FLJ00018, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *J Biol Chem.*, 2008, 283(4):1946-53.
70. <http://www.uniprot.org/uniprot/Q3THE2>
71. Macurek L., Dráberová E., Richterová V., Sulimenko V., Sulimenko T., Dráberová L., Marková V., Dráber P.: Regulation of microtubule nucleation from membranes by complexes of membrane-bound gamma-tubulin with Fyn kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J.*, 2008, 416(3):421-30.
72. Oliferenko S., Paiha K., Harder T., Gerke V., Schwärzler C., Schwarz H., Beug H., Günthert U.; Huber L. A.: Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*, 1999, 146(4):843-54.
73. Lafont F., Goot F. G.: Bacterial invasion via lipid rafts. *Cellular Microbiology*, 2005, 7(5):613 – 620.
74. Bickel P.E., Scherer P. E., Schnitzer J.E., Oh P., Lisanti M. P., Lodish H. F.: Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem.*, 1997, 272(21):13793-802.
75. Babuke T., Tikkanen R.: Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *Eur J Cell Biol.*, 2007, 86(9):525-32.
76. Jaksits S., Bauer W., Kriehuber E., Zeyda W., Stulnig T. M., Stingl G., Fiebiger E., Maurer D.: Lipid Raft-Associated GTPase Signaling Controls Morphology and CD8_T Cell Stimulatory Capacity of Human Dendritic Cells¹, *The Journal of Immunology*, 2004, 173:1628-1639.
77. McCurdy L. H., Graham B. S.: Role of Plasma Membrane Lipid Microdomains in Respiratory Syncytial Virus Filament Formation. *J Virol.*, 2003, 77(3): 1747–1756.
78. Triantafilou M., Kensuke M., Golenbock D. T., Triantafilou K.: Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *Journal of cell science*, 2002,

115:2603-11.

79. Nguyen D. G., Booth A., Gould S. J., Hildreth J. E. K.: Evidence that HIV Budding in Primary Macrophages Occurs Through the Exosome Release Pathway. *JBC Papers in Press. Publisher*, 2003
80. Riff J. D., Callahan J. W., Herman P. M.: Cholesterol-Enriched Membrane Microdomains Are Required for Inducing Host Cell Cytoskeleton Rearrangements in Response to Attaching-Effacing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 2005, 11:7113-7125.
81. Bucci C., Thomsen P., Nicoziani P., McCarthy J., van Deurs B.: A key to lysosome biogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 2000, 11:467-80.
82. Hattula a kol.: Characterization of the Rab8-specific membrane traffic route linked to protrusion formation. *J Cell Sci*, 2006, 119: 4866-4877.
83. Chien Y. a kol.: RalB GTPase-Mediated Activation of the I κ B Family Kinase TBK1 Couples Innate Immune Signaling to Tumor Cell Survival. *Cell*, 2006, 1:157-170.
84. Gordon S.: The macrophage: Past, present and future, *Eur. J. Immunol.*, 2007, 37:S9-17.
85. Sanic M. a kol.: A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cellular Mikrobiology*, 2007, 9(10): 2391 – 2403.
86. Duncan M. J., Shin J.-S., Abraham S. N. : Microbial entry through caveolae: variations on a theme. *Cellular Mikrobiology*, 2002, 12:783–791.
87. Haynes Ch. M. P., Philips M. C., Rothblat G. H.: Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*, 1997, 38:2264-2272
88. Tamilselvam B., Daefler S.: *Francisella* Targets Cholesterol-Rich Host Cell Membrane Domains for Entry into Macrophages. *Journal of Immunology*, 2008, 180: 8262–8271.
89. Brown A. D., London E.: Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 1998, 14:111–36.
90. <http://www.czproteo.cz/proteomics.cs.php#ch1>
91. Schuck S., Honsho M., Ekroos K., Schevchenko A., Simons K.: Resistance of

- cell membranes to different detergents. *Cell Biology*, 2003, 10:5795-5800.
92. Matoušek P., Hodný Z., Švandová I., 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.
93. 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.
94. Gaus K. a kol.: Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membrane. *Journal of Lipid Research*, 2005, 126 – 1538.
95. Ross P.L., Huang Y.N., Marchese J.N., Williamson B., Parker K., Hattan S., Khainovski N., Pillai S., Dey S., Daniels S., Purkayastha S., Juhasz P., Martin S., Bartlet-Jones M., He F., Jacobson A., Pappin D.J.: Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 2004, 1154-1169.
96. Magee A. I., Parmryd I.: Detergent-resistant membranes and the protein composition of lipid rafts, *Genome Biology*, 2003, 4:234.