

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**Proteomická analýza vzorků infikované tkáně získaných
pomocí laserové mikrodisekce**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Veronika Jedličková
Vedoucí práce: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.
Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of Biological and Biochemical Sciences

**Proteomic analysis of infected tissue samples acquired
by laser microdissection**

THESIS

Author: Veronika Jedličková
Supervisor: Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.
Doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D

2009

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Všechny použité literární zdroje a informace, které jsem pro sepsání práce použila, jsou uvedeny v seznamu 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 knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 30.4.2009

Veronika Jedličková

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika JEDLIČKOVÁ**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název tématu: **Proteomická analýza vzorků infikované tkáně získaných pomocí laserové mikrodisekce**
Proteomická analýza vzorků infikované tkáně získaných pomocí laserové mikrodisekce

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

1) Teoretická část:

- a) Infekce *Francisella tularensis* - popis epidemiologie, patogeneze a infekčních modelů
- b) Laserová mikrodisekce a její využití
- c) Metody proteomického výzkumu - separační techniky, hmotnostní spektrometrie
- d) Shrnutí používaných postupů pro přípravu proteomických vzorků z histologických řezů a z řezů pomocí laserové mikrodisekce

2) Praktická část:

- a) Infekce myší bakterií *Francisella tularensis*
- b) Histologické řezy pomocí kryotomu
- c) Zpracování řezů pomocí imunobarvení
- d) Použití sestavy pro laserovou mikrodisekci v klasickém uspořádání a v uspořádání s fluorescenčním mikroskopem
- e) Stanovení přítomnosti proteinů pomocí western blotu
- f) Testování přípravy proteomických vzorků kompatibilní s LCMS
- g) Měření a identifikace proteinů na LCMS
- h) Zhodnocení výsledků

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

podle pokynu vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.

FVZ UO Hradec Králové

Konzultant diplomové práce:

doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

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

ANOTACE

Laserová mikrodisekce (LMD) je metoda, s jejíž pomocí se připravují vzorky pro různá bioanalytická stanovení. Příprava spočívá v izolaci požadované oblasti buněk z tkáňových či buněčných preparátů. LMD se používá hlavně pro účely genomické analýzy. V posledních letech se objevují studie, které tuto metodu využívají pro přípravu vzorků určených k proteomické analýze. Nejčastěji jsou v proteomice využívána spojení LMD s elektroforetickými metodami, po nichž následuje analýza proteinů hmotnostní spektrometrií. V menší míře se vyskytují práce, jejichž postupy jsou založené na kombinaci LMD přímo s hmotnostní spektrometrií.

V této práci byla provedena proteomická analýza infikovaných tkání kůže myši s cílem identifikovat bakteriální proteiny. Tkáně byly získány z myši linie Balb/c infikovaných bakteriálním kmenem *Francisella tularensis* LVS/GFP. Použití tohoto bakteriálního kmene bylo ověřeno v *in vitro* pokusech na buněčné makrofágové linii J774. Pro důkaz bakteriální infekce v odebraných tkáních bylo využito mikroskopického hodnocení imunochemicky barvených histologických preparátů. Kontrolou, potvrzující přítomnost *Francisella tularensis* v zpracovávaných tkáních byla detekce bakteriálních proteinů IgIC, IgIB, nebo FTT1103 pomocí Western blotu. U vzorků získaných z LMD za použití fluorescenční mikroskopie a vzorků celých tkáňových řezů byla provedena hmotnostní analýza proteinů *Francisella tularensis* na LC-ESI-QTOF. Z celkového počtu dvaceti vzorků (16 LMD vzorků a 4 vzorky celých tkáňových řezů) bylo v programu Phenyx identifikováno 52 peptidových sekvencí a k nim přiřazeno 34 proteinů.

Klíčová slova: laserová mikrodisekce, tandemová hmotnostní spektrometrie, *Francisella tularensis*, proteomická analýza, fluorescenční mikroskopie

SUMMARY

Laser microdissection (LMD) is a method that is used for preparation of variety of bioanalytical assays. Required section is isolated from tissues or cells by this method. Currently, LMD is mostly used for genomic analyses. New studies that apply LMD for preparation of proteomic samples has emerged. Usually LMD samples are separated by electrophoretic methods followed by mass spectrometry. Less often LMD is combined directly with mass spectrometry.

Proteomic analysis of infected skin tissues of mice aiming to identify bacterial proteins was performed. Tissues were dissected from Balb/c mice infected by *Francisella tularensis* LVS/GFP. In vitro tests to confirm the application of GFP bacterial strain in order to visualise the bacteria in situ was performed. Also, immunohistochemical staining confirmed the bacteria at the site of developed granulomas, as well as presence specific bacterial proteins IgIC, IgIB or FTT1103 by Western blotting. The samples from LMD of fluorescent microscopy and the whole cryosection were analysed by LC-ESI-QTOF. There were 52 peptide sequences identifying 34 proteins out of twenty samples (16 LMD and 4 cryosections) found.

Key words: laser microdissection, tandem mass spectrometry, *Francisella tularensis*, proteomic analysis, fluorescent microscopy

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Martinovi Hubálkovi, Ph.D. za neocenitelnou pomoc a za možnost vypracování diplomové práce na Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany v Hradci Králové.

Mé poděkování patří také všem pracovníkům a zaměstnancům Ústavu molekulární patologie za jejich spolupráci, rady a připomínky a za vytvoření příjemných podmínek pro provedení praktické části diplomové práce.

POUŽITÉ ZKRATKY

1D	jednorozměrná elektroforéza
2D	dvourozměrná elektroforéza
ACN	acetonitril
AcpA	kyselá fosfatáza
BalB/C	označení typu myši
BCA	bicinchoninová kyselina
C57BL/6	označení typu myši
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2 (chemokinový C-C ligand)
CD	cluster determinant (diferenciační antigen)
ClpB	kaseinolytická proteáza B
CR3	komplementový receptor 3
CR4	komplementový receptor 4
CXCL8	chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (chemokinový C-X-C ligand)
DC	dendritická buňka
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EEA-1	early endosomal antigen (ranný endosomální antigen)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	elektrosprej
FPI	<i>Francisella</i> pathogenicity island
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	jodacetamid
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1 (mezibuněčná adhezivní molekula)
IČ	infračervené záření
IFN	interferon
Igl	intracellular growth locus (lokus pro intracelulární růst)

IgM, G, A	imunoglobulin M, G, A též protilátky
IL	interleukin
IT	iontová past
Kat G	kataláza/peroxidáza
LAMP	s lyzozomem asociovaný membránový protein
LC	kapalinová chromatografie
LCM	laser capture microdissection (laserová záchytná mikrodisekce)
LMD	laserová mikrodisekce
LMPC	laser microdissection and pressure catapulting (LMD s pulzním laserovým paprskem pro katapultaci)
LPS	lipopolysacharid
LVS	live vaccine strain (živý vakcinační kmen)
MALDI	desorpce/ionizace laserem za účasti matrice
MCP-1	methyl-accepting chemotaxines protein (membránový kofaktorový protein)
MF	mobilní fáze
Mgl	macrophage growth locus (lokus pro růst v makrofázích)
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilitní komplex)
MIP-2	major intrinsic protein (chemotaktický faktor pro monocyty)
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
m/z	efektivní hmotnost
NK	natural killer
NLR	NOD-like receptor
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOD	nukleotide-binding oligomerization domain
PCR	polymerázová řetězová reakce
pdp	pathogenicity determinant protein (patogenicitu určující protein)
PI3K	fosfatidylinositol-3-fosfokináza

PPMD	piezo power for microdissection (mikrodisekce piezo-mikroskalpelem)
PMN	polymorfonukleární leukocyt, neutrofil
PVDF	polyvinylidenfluorid
Q	kvadrupól
RES	retikuloendoteliální systém
RFLP	restrikční polymorfismu délkových fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
RPC	Reversed-phase chromatography (chromatografie na obrácené fázi)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného
SELDI	laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem
SF	stacionární fáze
SH skupiny	thiolové skupiny
Sod	superoxiddismutáza
SPE	extrakce na pevné fázi
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TLR	Toll-like receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TOF	time-of-flight (průletový analyzátor)
UV	ultrafialové záření
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1 (cévní adhezivní molekula)

Pozn. Ostatní zkratky pro chemikálie a roztoky jsou uvedeny v kapitole 3.1.1 a 3.2.

OBSAH

ANOTACE.....	7
SUMMARY.....	8
POUŽITÉ ZKRATKY	10
1. ÚVOD.....	16
2. TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1. Bakterie <i>Francisella tularensis</i> a onemocnění tularémie.....	17
2.1.1. Obecná charakteristika bakterie <i>Francisella tularensis</i>	17
2.1.2. Taxonomie	17
2.1.3. Epidemiologie.....	18
2.1.4. Bakteriální struktura a faktory virulence	19
2.1.5. Patogeneze	21
2.1.5.1 Průběh infekce buňky.....	21
2.1.5.2 Odpověď hostitele.....	22
2.1.6. Tularémie	24
2.1.6.1 Klinické formy.....	24
2.1.6.2 Diagnostika	25
2.1.6.3 Léčba	26
2.1.6.4 Vakcinace	27
2.1.7. Infekční modely.....	27
2.2. Příprava histologických preparátů.....	28
2.2.1. Fixace tkání.....	28
2.2.2. Mikrotom a příprava preparátů tkáňových řezů	29
2.2.3. Barvení.....	30
2.2.4. Imunohistochemické barvení.....	30
2.2.4.1 Komplex biotin-streptavidin-peroxidáza a chromogen DAB.....	31
2.3. Laserová mikrodisekce (LMD) a její využití.....	31
2.3.1. Vývoj a obecná charakteristika.....	31
2.3.2. Princip laserové mikrodisekce.....	32
2.3.3. Technologie.....	32
2.3.3.1 Lasery	33
2.3.3.2 Fluorescence	33

2.3.4.	Záchytné systémy	34
2.3.4.1	Membránové (fúzní) systémy.....	34
2.3.4.2	Paprskové systémy.....	34
2.3.4.3	Mechanické systémy.....	35
2.3.5.	Aplikace.....	35
2.3.5.1	Genomická analýza.....	35
2.3.5.2	Proteomická analýza.....	35
2.3.5.3	Studium a kultivace živých buněk	36
2.3.6.	Využití v praxi.....	36
2.4.	Proteomická analýza	36
2.5.	Příprava vzorku pro proteomickou analýzu.....	38
2.5.1.	Homogenizace	38
2.5.2.	Stanovení bílkoviny	38
2.5.3.	Redukce a alkylace	38
2.5.4.	Štěpení proteinů.....	39
2.5.5.	Odsolení.....	39
2.6.	Western blot.....	40
2.6.1.	Komplex biotin-streptavidin-peroxidáza a luminol	40
2.7.	Kapalinová chromatografie v proteomické analýze.....	41
2.8.	Hmotnostní spektrometrie v proteomické analýze	41
2.8.1.	Princip hmotnostní spektrometrie.....	41
2.8.2.	Konstrukce hmotnostního spektrometru.....	42
2.8.2.1	Ionizační zdroj.....	42
2.8.2.2	Analyzátor.....	42
2.8.2.3	Detektor	43
2.8.3.	Tandemová spektrometrie (MS/MS) v proteomické analýze	44
2.9.	Zpracování dat z hmotnostní spektrometrie.....	44
2.9.1.	Databáze.....	44
2.9.2.	Zpracování dat tandemové hmotnostní spektrometrie	45
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1.	Přístroje a pomůcky.....	46
3.1.1.	Pomůcky	46
3.1.2.	Přístroje a softwarové programové vybavení	46

3.2.	<i>Chemikálie a roztoky</i>	48
3.3.	<i>Modelová infekce buněk makrofágové linie J774</i>	51
3.3.1.	Použitý materiál.....	51
3.3.2.	Použité roztoky.....	51
3.3.3.	Postup.....	51
3.4.	<i>Infekce myši Balb/c</i>	53
3.4.1.	Použitý materiál.....	53
3.4.2.	Použité roztoky.....	53
3.4.3.	Postup.....	53
3.5.	<i>Příprava tkáňových preparátů a vzorků celých řezů</i>	54
3.5.1.	Použitý materiál.....	54
3.5.2.	Použité roztoky.....	54
3.5.3.	Postup.....	54
3.6.	<i>Imunochemické barvení</i>	55
3.6.1.	Použitý materiál.....	55
3.6.2.	Použité roztoky.....	55
3.6.3.	Postup.....	55
3.7.	<i>Laserová mikrodisekce vzorků</i>	56
3.7.1.	Použitý materiál.....	56
3.7.2.	Použité roztoky.....	56
3.7.3.	Postup.....	57
3.8.	<i>Sonikace</i>	57
3.8.1.	Použitý materiál.....	57
3.8.2.	Postup.....	58
3.9.	<i>Stanovení bílkoviny</i>	58
3.9.1.	Použitý materiál.....	58
3.9.2.	Použité roztoky.....	58
3.9.3.	Postup.....	58
3.10.	<i>Redukce, alkylace a štěpení</i>	59
3.10.1.	Použitý materiál.....	59
3.10.2.	Použité roztoky.....	59
3.10.3.	Postup.....	60
3.11.	<i>Odsolení vzorku</i>	61

3.11.1. Použitý materiál.....	61
3.11.2. Použité roztoky.....	61
3.11.3. Postup.....	61
3.12. <i>Western blot</i>	62
3.12.1. Použitý materiál.....	62
3.12.2. Použité roztoky.....	62
3.12.3. Postup.....	65
3.12.3.1 <i>Příprava gelu a elektroforéza</i>	65
3.12.3.2 <i>Blotování a barvení gelu</i>	65
3.12.3.3 <i>Imunodetekce a barvení blotovací membrány</i>	66
3.13. <i>Hmotnostní spektrometrie a zpracování dat</i>	67
3.13.1. Použitý materiál.....	67
3.13.2. Použité roztoky.....	67
3.13.3. Postup.....	68
3.14. <i>VÝSLEDKY</i>	70
3.15. <i>Diskuze</i>	71
3.16. <i>Závěr</i>	77
4. LITERATURA.....	78
5. PŘÍLOHA	92

1. ÚVOD

Laserová mikrodisekce (LMD) je metoda umožňující snadno a rychle vybrat a izolovat cílenou skupinu buněk z komplexních tkáňových či buněčných preparátů. Tato metoda nachází uplatnění v mnoha oborech. V současné době se začíná projevovat její přínos při přípravě vzorku pro proteomickou analýzu. Z mnoha studií je zřejmé, že v kombinaci s vysoce citlivou hmotnostní spektrometrií lze získat neocenitelné informace o přesně definované oblasti buněk.

Velmi rozšířenou aplikací je spojení LMD s elektroforetickými metodami následované analýzou hmotnostní spektrometrií. Činidla používaná během elektroforetického zpracování vzorku však snižují citlivost stanovení na hmotnostním spektrometru.

Snahou této diplomové práce bylo posoudit, zda spojení laserové mikrodisekce a tandemové hmotnostní spektrometrie při absenci elektroforetických metod je vhodné pro proteomickou analýzu infikovaných tkání s důrazem na identifikaci bakteriálních proteinů. K tomuto účelu byly použity, jako infekční model, myši linie Balb/c a oslabený bakteriální kmen *Francisella tularensis* LVS/GFP. Genom *Francisella tularensis* LVS/GFP obsahuje gen, který kóduje protein GFP (green fluorescent protein) umožňující sledování bakterie pomocí fluorescenční mikroskopie. Proteomická analýza byla provedena u laserem disektovaných infikovaných tkání pomocí LC-ESI-QTOF hmotnostního analyzátoru s cílem identifikovat bakteriální proteiny *Francisellatularensis*.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Bakterie *Francisella tularensis* a onemocnění tularémie

2.1.1. Obecná charakteristika bakterie *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je zástupce aerobních Gram-negativních bakterií. Vyskytuje se ve formě malých, nepohyblivých tyčinek až kokobacilů o velikosti 0,2-0,7 x 0,2 μm. Má pouzdro, netvoří spory a neprodukuje toxiny. Kultivace je pomalá a náročná. Pro svůj růst potřebuje přítomnost železa a SH skupin, dodávaných ve formě cysteinu nebo cystinu.^{1, 2}

Francisella tularensis je fakultativně intracelulární bakterie a je považována za původce onemocnění tularémie u zvířat a lidí. Tato nemoc může mít různý průběh v závislosti na formě onemocnění a na bakteriálním poddruhu.

Díky své vysoké virulenci, nízké infekční dávce, schopnosti šířit se vzdušnou cestou formou aerosolu a způsobit závažná onemocnění vedoucí až ke smrti, se řadí do skupiny agens považovaných za potencionální biologickou zbraň.³

2.1.2. Taxonomie

Původně tato bakterie nesla název *Bacterium tularensis*.⁴ Na základě serologické analýzy bylo její označení změněno na *Pasteurella tularensis*.⁵ Jméno *Francisella* bylo následně zvoleno na počest Edwarda Francise, který mezi prvními tularémii studoval.⁶

Na základě analýzy sekvence genu pro 16S rRNA je kmen *Francesellaceae* řazen do γ-podtřídy *Proteobacteria*.^{7, 8} Současná taxonomie pod tento kmen řadí jediný rod *Francisella*. Dle DNA podobnosti a složení mastných kyselin v buněčné stěně spadají pod tento rod dva druhy, *Francisella tularensis* a *Francisella philomiragia*.^{1, 6}

Francisella tularensis zahrnuje čtyři poddruhy určené dle biochemických a genetických testů. Poddruh *tularensis* (nazývaný též typ A) se vyskytuje v Severní Americe. Rozděluje se podle geografického rozšíření do dvou geneticky odlišných tříd – typ A₁ (Kalifornie, Massachusetts a středozápad USA) a typ A₂ (Kalifornie a oblast Skalistých hor).^{9, 10} O zařazení rodu *Francisella* do skupiny agens považovaných za potencionální biologickou zbraň bylo rozhodnuto právě kvůli vysoké virulenci typu A pro mnoho druhů zvířat a pro lidi. *F. tularensis* ssp. *holarctica* (typ B) je méně virulentní a je rozšířen v Severní Americe, Evropě i Asii. Pod ssp. *holarctica* se řadí tři biovary - biovar I_{Ery}^S (erythromycin citlivý), I_{Ery}^R (erythromycin rezistentní) a *Japonica* izolovaný v Japonsku.^{6, 8} Ve středoasijských republikách bývalého SSSR je zaznamenán výskyt velice málo virulentního poddruhu *mediasiatca*. Nízkou virulenci, ale stále patogenní vlastnosti pro jedince s oslabenou imunitou, má poddruh *novicida* identifikovaný v Severní Americe a nedávno v Austrálii.¹¹

Porovnání sekvence genu pro 16S rRNA s dalšími bakteriemi ukazuje příbuznost dalších organismů, které mohou být zařazeny do rodu *Francisella*. Příkladem je *Wolbachia persica* a další endosymbionti nalezení v klíšťatech a v prvocích.^{1, 6, 8}

2.1.3. Epidemiologie

Výskyt *Francisella tularensis* a s ním související onemocnění je soustředěn na severní polokouli. Od roku 1911, kdy byla v Kalifornii poprvé tato bakterie určena jako původce tularémie, byly pravidelně popisovány případy v USA, Kanadě, v minulosti v Mexiku, dále ve Švédsku, Finsku, Rusku, Kazachstánu, Uzbekistánu, Turkmenistánu, České republice, na Slovensku a v Japonsku. Oblasti Ruska, Skandinávie a USA, hlavně státy Arkansas, Missouri, Jižní Dakota, Oklahoma a Montana, byly označeny jako místa s nejvyšším počtem zaznamenaného onemocnění.^{6, 12, 13} Naposledy se ohniska tularémie objevila na území Turecka (1988), Španělska (1997) a Kosova (1999).^{14, 15, 16} Izolace kmene podobného *F. tularensis* ssp. *novicida* v Severním teritoriu

Austrálie však ukazuje, že rozšíření tohoto druhu je mnohem větší než se předpokládalo.¹¹

F. tularensis může přežívat v různých ekosystémech, což dokazuje její přítomnost u přibližně 250 druhů živočichů. Byla nalezena u savců, ptáků, ryb, obojživelníků a bezobratlých. Tularémie je přenášena na člověka infikovanými zvířaty, z nichž největší význam mají hlodavci (myši, krysy, veverky, bobři, ondatry aj.) a zajícovití (zajíci, králíci). Přenos bakterií je zprostředkován vektory, mezi které se řadí krevsající hmyz – klíšťata, komáři, moskyti a některé druhy savých much. Příčinou onemocnění může být bakteriální aerosol nebo kontaminovaná voda, u níž došlo ke znečištění močí a fekálním materiálem infikovaných zvířat.^{6, 8, 12, 13} Předpokládanou možností znečištění vodních zdrojů může být i přežívání *F. tularensis* v prvocích, což se podařilo prokázat v laboratorních podmínkách u *Acanthamoeba castellanii*.^{17, 18} Cyklus této bakterie v životním prostředí však není natolik popsán, abychom mohli určit přesný mechanismus přežívání v přírodě.

2.1.4. Bakteriální struktura a faktory virulence

V současné době je bakteriální struktura a faktory virulence předmětem intenzivního výzkumu, hlavně z důvodu potřeby účinné vakcíny. Mechanismy virulence nejsou dostatečně popsány a identifikovaných faktorů virulence je pouze malý počet.

Mezi známé povrchové faktory virulence patří lipopolysacharid (LPS též endotoxin), pouzdro a pili.

LPS má neobvyklou strukturu lipidu A, což je pravděpodobně důsledek nízké toxicity v porovnání s LPS jiných Gram-negativních bakterií.^{3, 19, 20, 21, 22} Není schopný nespecifické aktivace B-lymfocytů *in vitro* a vliv na produkci prozánětlivých cytokinů (IL-1 a TNF- α) je tisíckrát menší než u *Escherichia coli*.^{21, 23} Na makrofázích krys je navíc prokázáno, že LPS ssp. *tularensis* nevyvolává tvorbu oxidu dusnatého potřebného pro potlačení bakteriálního růstu.²¹⁻²⁷

Pouzdro tvoří polysacharidový obal, který chrání bakterii před účinkem sérového komplementu. Je u něj prokázána přítomnost imunogenních struktur, nicméně detailní analýza zatím nebyla provedena.^{3, 28}

Francisella tularensis obsahuje geny pro pili typu IV.^{29, 30} Tento typ pilů je spojován se sekrečním systémem typu II, který dosud není jasně popsán.³¹ Přestože je známa role tohoto typu pilů při adhezi na hostitelskou buňku, tvorbě biofilmu, přenosu DNA a pohybu u jiných bakterií, nejsou stále přesně určeny fyziologické a funkční vlastnosti u *F. tularensis*.³³⁻³⁵ Sekreční systémy typu III, IV a V nejsou v genomu této bakterie kódovány. O typu I se uvažuje vzhledem k nalezeným genům *tolC* a *ftlC*.^{36, 37} Nově popsáný sekreční systém typu VI je také důležitým předmětem výzkumu u *Francisella tularensis*.⁹⁸

Mezi faktory virulence je řazena i řada genů kódujících významné proteiny.

MglAB operon je důležitý pro intracelulární proliferaci bakterií. Kóduje protein MglA a MglB. MglA reguluje kyselou fosfatázu (AcpA), která inhibuje respirační vzplanutí makrofágů, a transkripci genů zejména v oblasti DNA nazývané FPI (*Francisella* pathogenicity island).^{13, 38-40}

V místě FPI se nachází operon *iglABCD*, který nese geny pro proteiny IglA, IglB, IglD a IglC (23 kDa).^{12, 13, 42, 41} IglC je nezbytný pro růst bakterií uvnitř makrofágů, pro únik z fagozomu a vyvolání apoptózy (programovaná buněčná smrt). Na FPI se dále nachází operon *pdp* (pathogenicity determinant protein) a geny pro *pdpA*, *pdpB*, *pdpC* a *pdpD* proteiny, také s podstatným významem pro intracelulární růst. Experimenty ukázaly, že proteiny IglA, IglC a *pdpB* hrají roli v mechanismu získávání železa.^{13, 20}

Důležitým faktorem virulence se ukazuje MinD protein, který zabezpečuje integritu bakteriální buňky, chrání bakterii před oxidačním zabitím a vyvolává apoptózu.^{13, 40}

Identifikovány jsou také další kandidáti např. geny kódující proteiny o neznámé funkci FTT0918 a FTT0919, ClpB proteáza, superoxid dismutáza (Sod), kataláza/peroxidáza (Kat G), ABC transporter, homolog alanin racemázy,

homolog glutamin fosforibozylpyrofosfát amidotransferázy a několik dalších proteinů a genů.^{39, 43-48, 97}

2.1.5. Patogeneze

2.1.5.1 Průběh infekce buňky

Francisella tularensis je intracelulární bakterie. Je schopná infikovat makrofágy a další podobné buňky retikuloendoteliálního systému (RES). Jsou zaznamenány infekce Kupfferových buněk v játrech, alveolárních makrofágů v plicích. Bakterie napadá i dendritické buňky (DC), hepatocyty a epitelální buňky.⁴⁹⁻⁵²

Vstup do hostitelské buňky je zprostředkován fagocytózou, která je závislá na signální cestě přes fosfatidylinositol-3-fosfokinázu (PI3K). Vstup bakterie do buňky je rovněž umožněn prostřednictvím cytochalasinu B a přeskupením aktinových filament. Fagocytóza je podporována opsonizací bakterie C3 složkami komplementu. Interakce mezi komplementem a komplementovými receptory CR3 a CR4 umožňuje snadnější adhezi a pohlcení fagocytujícím makrofágem. Dalšími účastníky se receptory jsou mannózové a „scavenger“ receptory.⁵³⁻⁵⁶

Je prokázáno, že bakterie se po pohlcení nachází ve fagozomu, který nejprve získává znaky časného endosomu EEA-1 (early endosomal antigen) a později znaky pozdního endosomu CD63 (diferenciační antigen), LAMP-1 a LAMP-2 (s lysozomem asociované membránové glykoproteiny). Lysozomální znak kathepsin D, který je spojován se splynutím endozomu a lysozomu, není přítomen. Navíc se ukazuje, že prostředí vakuoly nemá dostatečně kyselé pH. V následující fázi, po 3 - 4 hodinách od začátku infekce, se množství znaků LAMP-1 a CD63 sníží, což indikuje rozpad fagozomální membrány. Fagozom je rozrušen a bakterie uniká do cytoplazmy, kde se začíná množit.⁵⁶⁻⁶⁰ Ke svému růstu využívá nutriční zásoby hostitelské buňky, zejména nezbytné ionty železa a látky s cysteinovou funkční skupinou. Studie na myších makrofázích dokazují, že se lze setkat i s opětovným vstupem bakterie do tzv. autofagozomů. Tyto

vakuoly, pozitivní na kadaverin, splynou se sekundárními lysozomy, čímž se docílí okyselení jejich prostředí a hostitelská buňka je schopna kontrolovat bakteriální infekci.^{56, 60, 61}

Po 24 hodinách, v době vrcholu intracelulární proliferace bakterií, se objevují známky cytopatického efektu a patogenem vyvolané apoptózy. V pozdních fázích infekce lze pozorovat i známky nekrózy. Mezi projevy apoptózy se řadí přítomnost annexinu V na povrchu umírajících buněk a fragmentace jaderné DNA.^{62, 63}

Apoptóza vyvolaná *F. tularensis* může probíhat dvěma mechanismy.^{64, 65} První mechanismus zahrnuje cestu přes uvolnění mitochondriálního cytochromu C a aktivaci kaspáz 9 a 3. Druhý je založen na sekreci IFN- β infikovanými buňkami a na aktivaci kaspázy 1 a snížení multiproteinového komplexu (v anglické literatuře označovaný pojmem „inflammasome“).⁶⁶ Výsledkem apoptózy je smrt buňky a uvolnění bakterií, které následně opět infikují další makrofágy.

Přestože se v poslední době objevilo mnoho studií, stále není cyklus této bakterie dostatečně detailně popsán.

2.1.5.2 Odpověď hostitele

Při infekci hostitele dochází k reakci imunitního systému na přítomnost bakterií *Francisella tularensis*. Tato odpověď umožňuje hostiteli komplexní ochranu vůči patogenu. Patogen však dokáže některé mechanismy ovlivňovat a překonávat, což mu umožňuje přežít v intracelulárním prostředí a uniknout obranným procesům hostitele.

Sérum obsahuje složky komplementu, které zajišťují mimojiné opsonizaci bakterií. Opsonizované bakterie jsou lépe pohlcovány fagocytujícími buňkami, jako jsou neutrofilové (polymorfonukleární PMN), dendritické buňky (DC) či buňky monocyto-makrofágové linie.^{28, 53, 54, 67} Ze studií se ukazuje, že neutrofilové se zapojují v první fázi infekce. Nejsou však schopny franciselu usmrtit, protože infekce u nich blokuje proces respiračního vzplanutí, tj. produkci reaktivních kyslíkatých látek.⁶⁸

Důležitou roli při kontrole infekce hrají též cytokiny a chemokiny, zejména prozánětlivé cytokiny IFN- γ (interferon gama) a TNF- α (tumor nekrotizující faktor) a IL-12 (interleukin) sekretovaný makrofágy, dendritickými buňkami a NK buňkami (natural killer).^{69, 70} *In vitro* byla prokázána také produkce MCP-1 (membránový kofaktorový protein), IL-1, MIP-2 (chemotaktický faktor pro monocyty), CCL2 (chemokinový C-C ligand) u makrofágů a endoteliálních buněk, IL-8 u monocytů a CXCL8 (chemokinový C-X-C ligand) u endoteliálních buněk.⁷¹⁻⁷⁵ Dalšími sloučeninami, které jsou zásadní pro obranu hostitele, jsou reaktivní kyslíkaté a dusíkaté radikály. Významnou roli při usmrcování *Francisella tularensis* hraje oxid dusnatý a peroxynitritový radikál, které jsou produkovány IFN- γ aktivovanými makrofágy.⁷⁶⁻⁷⁸ Pro rozpoznávání bakterií je nutná přítomnost receptorů na povrchu a uvnitř hostitelských buněk. Komplementové, „scavenger“, mannózové a Toll-like receptory (TLR) umožňují přilnutí a pohlcení *Francisella tularensis*.^{26, 53, 55, 67} Jiné intracelulární NOD/NLR receptorové molekuly se účastní mechanismu apoptózy zahrnující cestu přes kaspázu 1, zmíněnou výše.^{65, 66} Bakterie též indukují expresi povrchových molekul VCAM-1 (cévní adhezivní molekula), ICAM-1 (mezibuněčná adhezivní molekula) a E-selektinů u studovaných endotelových buněk.⁷² Změna povrchových struktur je zaznamenána i u dendritických buněk, které jsou zodpovědné za předkládání antigenů. Tyto buňky, stimulované T-lymfocyty, prezentují ve zvýšeném množství receptorové molekuly CD40, CD86 a MHC II (hlavní histokompatibilní komplex) a produkují řadu cytokinů, mezi nimi i TGF- β (transformující růstový faktor beta) spojovaný s potlačováním zánětlivých procesů.^{67, 79, 80}

Ukazuje se, že hlavní úlohu imunitního systému v reakci na přítomnost *Francisella tularensis* nesou lymfocyty, převážně CD4⁺, CD8⁺ a γ/δ T buňky.⁸¹⁻⁸⁵ Zajišťují specifickou buněčnou paměť a jsou zásadní pro kontrolu primární infekce a pro vakcinací vyvolanou ochranu. B lymfocyty se pak hlavně zasazují o protilátkovou odpověď produkcí IgM, IgG a IgA specifických protilátek.^{99, 100} NK buňky mají také důležitou pozici při primární infekci. Jejich hlavní úloha spočívá v sekreci IFN- γ , jejich schopnost vyvolat lýzu u infikovaných buněk se

zdá být méně významná v porovnání s infekcemi vyvolanými jinými bakteriemi.^{69, 70}

2.1.6. Tularémie

2.1.6.1 *Klinické formy*

Inkubační doba onemocnění tularémie je 3-5 dní. V počátcích se vyskytují nespecifické příznaky jako horečka, zimnice, malátnost, bolesti v krku a hlavy. Další projevy choroby závisí na poddruhu *F. tularensis* a na vstupní cestě patogenu do organismu – přes kůži a mukózní membrány nebo vdechnutím.^{12, 13, 86}

Obecně, onemocnění způsobené *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* je závažnějšího průběhu než u ostatních poddruhů.

Do skupiny s nejčastějším výskytem se řadí formy tularémie, jejichž vstupní branou je kůže a mukózní membrány. Nejběžnější ulceroglandulární forma tularémie je spojená s přenosem vektory a s kontaktem s infikovaným zvířetem. Kožní leze v místě vstupu bakterie přechází ze stádia papule přes pustulu až do fáze otevřeného vředu, který se léčí jizvou. Po několika dnech je onemocnění doprovázeno tvorbou granulomů v místě infekce a zvětšením regionálních mízních uzlin, které v závažných případech mohou následně i prasknout.

Glandulární tularémie se od předchozí odlišuje pouze nepřítomností viditelného místa vstupu infekce. Okuloglandulární tularémie se projevuje podobně jako již výše zmíněné formy. Je způsobená zanesením bakterií do oka kontaminovaným prstem nebo aerosolem. Příznakem je zánět spojivkového vaku spojený s otokem víčka, fotofobie a někdy i zvětšení preaurikulárních mízních uzlin v oblasti ucha. Orofaryngeální tularémie je vázána na případy pozření kontaminovaných potravin a vody. Má podobný průběh jako předešlé případy s tím, že primární leze se vyskytují na sliznicích úst nebo jiných oblastí trávicího traktu a postižený trpí stomatitidou (zánět sliznice dutiny úst) a faryngitidou (zánět hltanu).

Infekce zapříčiněná vdechnutím bakterií rozptýlených v aerosolu vyvolává méně častou, ale nejzávažnější respirační tularémii. Zpravidla ji provází znaky pneumonie jako bolest na hrudi, suchý kašel, dechová nedostatečnost a již zmíněné nespecifické příznaky. Opět je možné zaznamenat zvětšení příslušných mízních uzlin. V komplikovaných případech se mohou vyskytnout život ohrožující septické stavy, zánět mozkových blan, zánětlivé stavy srdce, orgánové selhání (zejména jater a ledvin), které mohou končit smrtí.

Případy, kdy se tularémie prezentuje jako systémové onemocnění a není jasně určena brána vstupu infekce, se označují pojmem tyfoidální.^{12, 13, 86}

2.1.6.2 Diagnostika

Přítomnost infekce *F.tularensis* se dá dokázat ve sputu, faryngeálních sekretech, krvi, séru, aspirátu z mízních uzlin, ve zvířecích sekretech, ve stěrech z otevřených vředů, v tkáňových vzorcích (slezina, játra, plíce, ledviny, srdce, mozkové pleny, střeva) a také ve vodě a vzorcích bahna.

Diagnostika se provádí mikrobiologickými, imunochemickými a molekulárně-genetickými metodami.^{87, 88}

Tradiční mikrobiologická diagnostika zahrnuje kultivační průkaz bakterií a biochemické testy. Pro růst bakteriálních kolonií, pozorovatelných po 48-72 hodinách, se používají pevná média, nejčastěji čokoládový a srdcový agar obohacený o cystein, případně o antibiotika a jiné nezbytné složky. Biochemické testy jsou málo využívány, přesto mají své místo při identifikaci subtypů *Francisella tularensis*.^{86,87}

Principem imunochemických metod je reakce antigen-protilátka. Pro přímou detekci bakteriálních lipopolysacharidových, vnějších membránových a jiných antigenních struktur je vhodná rychlá sklíčková aglutinace, různé varianty metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a imunoblot. Do této skupiny se také řadí imunochemická a imunofluorescenční barvení, která jsou výhodnější než slabé Gramovo barvení. Pro serologické stanovení protilátek,

kteře je možné až po dvou tůdnech od počátku infekce, se používají metody zkumavkové aglutinace, mikroaglutinace a ELISA.^{86,87}

Nejmladší a rychle se rozvíjející molekulárně-genetické metody se zaměřují na detekci DNA úseků genů. PCR metodou (polymerázová řetězová reakce) se nejčastěji určují geny vnějších membránových proteinů *fopA*, *tul4* a sekvence genu pro 16S rRNA. Pro zařazování do poddruhu *Francisella tularensis* se používají citlivější varianty metody PCR – různé druhy real-time PCR, RFLP (restrikční polymorfismus délkových fragmentů) a jiné. Dále se lze v praxi setkat s PFGE (pulzní gelová elektroforéza) a Southern blotem.^{86, 87}

V budoucnu by se k těmto běžně prováděným diagnostickým postupům mohl připojit tzv. test T-buněk, založený na stimulaci T lymfocytů bakteriemi nebo jejichmi antigenními strukturami.⁸⁶⁻⁸⁸

2.1.6.3 Léčba

Dřívě byly lékem první volby baktericidně působící aminoglykosidy, hlavně streptomycin. Dnes je streptomycin zřídka používán, kvůli problémům s oto- a neurotoxicitou. Náhradou se stal gentamicin. Z důvodu parenterálního podání a neustálého monitorování hladin léků, se použití těchto antibiotik omezilo jen na závažné formy tularémie např. tularémická meningitida.^{12, 86, 89}

Tetracykliny se staly součástí léčby infekcí i přesto, že mají pouze bakteriostatický účinek a jsou spojovány s častějším návratem onemocnění (relapsem). V minulosti se podával chloramfenikol, v současné praxi převažuje doxycyklin. Výhoda tetracyklinů spočívá v orálním podávání léků a nižší toxicitě.^{12, 86}

Nové možnosti v léčbě nabídla chinolonová antibiotika, jmenovitě ciprofloxacin. Osvědčil se jako účinný prostředek proti tularémii typu B u lidí a svůj baktericidní efekt potvrdil také u typu A *in vitro*. Na základě klinických studií se ukázalo, že by mohl splňovat předpoklady pro použití při léčbě dětí a těhotných žen.^{12, 86, 90, 91}

Neúčinná se ukázala betalaktamová antibiotika, co-trimazol a clindamycin.^{89, 92} U rimfapinu byla stanovena rezistence *in vitro*.^{91, 93, 94}

Erytromycin je označen jako nevhodný, kvůli výskytu rezistence v severní Evropě (Skandinávie, Rusko).^{89, 95}

2.1.6.4 Vakcinace

Již přes 80 let je snaha vyvinout očkovací látku proti tularémii, přesto dosud neexistuje bezpečná a dostatečně účinná schválená vakcína.

Usmrcené celobuněčné, na lipopolysacharidové antigenní struktuře založené subjednotkové a lyofilizované (rozšířené v bývalém Sovětském svazu) vakcíny nesplňují požadavky na imunizační efekt a často se u nich projevují vedlejší příznaky podobné přirozené infekci *Francisella tularensis*.

V současné době se používá vakcína s označením LVS (live vaccine strain), jejímž základem je oslabený kmen získaný pasážováním z *Francisella tularensis* ssp. *holarctica*. Je používána hlavně pro očkování laboratorního personálu na rizikových pracovištích. Vakcína má dobrý imunizační efekt, poskytuje dobrou ochranu před systémovou infekcí tularémie typu A i B, ale nižšího efektu je dosaženo při vystavení imunizovaného organismu aerosolu. Problémy se stabilitou virulence a standardizací vakcíny znemožňují splnění licenčních požadavků.^{6, 12, 13, 45, 96}

Z dosavadních studií byly navrženy dva přístupy, které by mohly vést k získání účinné vakcíny. První předpokládá vytvoření oslabené varianty *F. tularensis* na základě mutace genů nezbytných pro metabolismus aromatických aminokyselin, biosyntézu purinů nebo genů regulujících genovou expresi faktorů virulence. Druhý je založen na identifikaci protektivních imunogenních složek *F. tularensis*, které by byly předkládány imunitnímu systému jako součást subjednotkové vakcíny.¹³

2.1.7. Infekční modely

Pro studium virulenčních faktorů, patogeneze, životního cyklu bakterie a obranných mechanismů hostitele se používají modely infekce. Modely infekce umožňují sledování chování bakterií a hostitele a poskytují informace, které jsou

zásadní pro vytvoření teorií vysvětlujících interakce hostitel-patogen v přirozeném prostředí.

Pro studium *Francisella tularensis* se používají hlavně méně virulentní, oslabené bakteriální kmeny, nejběžněji *Francisella tularensis* ssp. novicida, *Francisella tularensis* LVS a od ní odvozené mutantní kmeny. Příkladem mutantního kmenu může být *Francisella tularensis* LVS/GFP, který produkuje protein GFP (green fluorescent protein). Tento protein umožňuje sledování bakterií pomocí fluorescenční mikroskopie. Oblíbeným objektem pro studia je také vysoce virulentní kmen *Francisella tularensis* SCHU S4. Při manipulaci s tímto kmenem se pracuje za zvýšených bezpečnostních podmínek. *In vitro* pokusy využívají buněčných linií, zejména monocyto-makrofágové linie (např. myší makrofágová linie J774). Existují však i pokusy na endoteliálních buňkách, hepatocytech, dendritických buňkách aj. Buněčné linie jsou nejenom zvířecího původu (například z myši, krysa), ale také lidského. Metody prováděné *in vivo* jsou založené na studiu bakterií v živých organismech. Nejčastěji se lze setkat s hlodavci chovanými pro výzkumné účely, jako jsou myši Balb/c, C57BL/6 atd. Ale pokusy lze provádět i s jinými živočišnými druhy.⁵⁰

Infikované oblasti tkání se z živočichů odebírají, připravují se z nich tkáňové barvené a nebarvené preparáty, které jsou podrobovány mikroskopickému vyšetření, nebo se pomocí příslušných postupů tkáň upravují pro proteomickou analýzu.

2.2. Příprava histologických preparátů

2.2.1. Fixace tkání

Tkáň získané za účelem přípravy histologických preparátů, např. z biopsie a z patologických nálezů, je nezbytné fixovat. Fixace zachovává jejich strukturu, zabraňuje enzymatickému trávení a degradaci tkáň bakteriemi a převádí tkáňové složky do nerozpustného stavu. Takto ošetřená tkáň je chráněna proti poškození během dalšího zpracování.

Chemická fixace slouží pro stabilizaci molekul a struktur histologických a cytologických vzorků. Používají se aldehydové sloučeniny (formaldehyd, formalín, glutaraldehyd), které reagují s aminoskupinami a způsobují zesíťování a koagulaci proteinů tkáně. Dále se využívají oxidační činidla (např. roztok OsO_4 , manganistan draselný, dichroman draselný) nebo činidla denaturující proteiny, jako etanol, metanol, aceton nebo kyselina octová. Chemická fixace zpravidla předchází zalévání do parafinu. Tkáňový vzorek je poté připraven pro krájení.

Fyzikální fixace zahrnuje proces zamražení (kryofixace). Kryofixace je považována za optimální volbu pro genomické a proteomické aplikace. Tkáně jsou zality kryoprotekčním médiem (glycerin) a poté rychle zmrazeny při velmi nízkých teplotách (až -80°C). Výhodou je, že takto upravená tkáň může být ihned krájena.¹⁰¹⁻¹⁰³

2.2.2. Mikrotom a příprava preparátů tkáňových řezů

Fixované tkáně se krájí na tenké řezy o šířce 3-25 μm pomocí přístrojů nazývaných mikrotomy. Podle konstrukce rozeznáváme několik typů mikrotomů. Sáňkový mikrotom je opatřen sáňkami s mikrometrickým nožem, ten se pohybuje proti pevně upevněnému bločku tkáně, směrem dopředu a dozadu. Rotační mikrotom má nůž upevněný v pevné svorce a proti němu se pohybuje svorka s bločkem tkáně, směrem nahoru a dolů. Zmrazovací mikrotom používá mikrotomový nůž upevněný v rameni otáčivé páky, který se pohybuje proti bločku přimraženému ke stolečku. Dalšími typy zmrazovacího mikrotomu je kryokaf, kdy se chladí stolek, kryokat, u kterého se chladí nůž a bloček a posledním je kryostat (kryotom), kde je chlazeno i prostředí. Pro ultratenké řezy šířky 0,08-0,1 μm se používá ultramikrotom se skleněným nebo diamantovým nožem.^{101, 104}

Tkáňové řezy z mikrotomu jsou přeneseny a upevněny na odmaštěná, popř. jinak vhodně upravená podložní skla, nebo membrány pro laserovou mikrodisekci (viz dále). Předtím než je preparát připraven k barvení, parafinované tkáňové řezy procházejí procesem odparafinování v xylenech a

etanolových roztocích a řezy zamražených tkání se fixují, v našem případě řezy na podložních sklech methanolem a řezy na membránách 70% etanolem.

2.2.3. Barvení

Barvení preparátů pro mikroskopii je nezbytnou součástí histologie. Barviva, ligandy se specifickými vazebnými a optickými vlastnostmi a radioaktivní značky se používají k lokalizaci a rozlišení buněk a struktur tkáně. Barvicí techniky se dělí na dvě základní skupiny, klasické histochemické a imunohistochemické barvení. Do první skupiny patří barvení pomocí zásaditých barviv (např. hematoxylin), kyselých barviv (např. eosin) a barviv rozpustných v tucích (např. sudanová čerň). K barvení se též využívá vícesložkových histochemických reakcí (např. Feulgenova reakce pro barvení jaderného chromatinu). Imunohistochemické barvení se zakládá na reakci antigen-protilátka. K detekci těchto imunokomplexů se používají enzymové komplexy, fluorescenční a radioaktivní značky.¹⁰¹

2.2.4. Imunohistochemické barvení

Obecně je imunohistochemické barvení popsáno několika kroky. Prvním krokem je zavodnění tkáně, které umožňuje pronikání kapalných reagentů do zmrazeného, odparafinovaného nebo fixovaného vzorku na podložním skle. Následuje tzv. restaurace antigenů (též natrávení tkáně) zlepšující expozici epitopů na fixovaných tkáních. V tomto kroku se vzorek povaří v pufru nejlépe v tlakovém hrnci nebo mikrovlné troubě. Další krok, blokování endogenních peroxidáz zpravidla pomocí roztoku peroxidu vodíku, inhibuje veškerou endogenní enzymovou aktivitu, která by mohla nespecificky vyvíjet barevnou reakci. Poté se provádí blokování nespecifických vazebných interakcí, čímž se omezí nespecifické vazby proteinů (tedy i protilátek) na tkáni. Zásadním krokem je nanesení primární protilátky, která se specificky váže na požadovaný antigen. V další fázi se na primární protilátku váže sekundární protilátka zajišťující zesílení signálu. Imunokomplex protilátek je následně označen enzymovým

komplexem. Ten přeměňuje chromogenní substrát na barevný produkt, čímž se zviditelní detekovaný antigen. V některých případech se dodatečně používá kontrastní barvení (např. barvení hematoxylinem) umožňující snadnější mikroskopické hodnocení. Posledním krokem je montování preparátu pomocí vhodného média (např. pryskyřice) a umístění krycího skla.^{101, 105, 106}

2.2.4.1 Komplex biotin-streptavidin-peroxidáza a chromogen DAB

Nepřímá trojstupňová metoda, která je jedna z nejrozšířenějších, využívá schopnosti neimunologické vazby streptavidinu a biotinu, který bývá ukotvený na sekundární protilátce. Zbývá streptavidinová vazebná místa jsou značena peroxidázovými enzymy. Tento peroxidázový komplex se inkubuje s DAB (3,3'-diaminobenzidinem) a peroxidem vodíku. Enzym přenesse vodík z DAB na peroxid a výsledná oxidovaná forma DAB vytvoří tmavě hnědou sraženinu na místě aktivity enzymu.^{101, 106, 107, 108}

2.3. Laserová mikrodisekce (LMD) a její využití

2.3.1. Vývoj a obecná charakteristika

Mikrodisekce je považována za důležitý nástroj studia buněk a tkání. Spojuje mikroskopii s metodami získávání skupin buněčných populací z tkáňových řezů nebo jiných biologických materiálů.

První manuální metody, používající skalpel a ocelovou jehlu, byly časově náročné, závisely na schopnosti pracovníka a potýkaly se s častou kontaminací vzorků.^{109, 110, 111} Použití laserové technologie, poprvé publikované v roce 1967, tyto nedostatky překonalo. Velký pokrok přinesla tzv. negativní ablace, při které se požadovaná oblast buněk nejprve překryla ochrannou vrstvou pigmentu a poté se tkáň vystavila ultrafialovému záření, které poškodilo DNA nechráněných buněk.^{110, 112} Největší pokrok byl zaznamenán v 90. letech, kdy se nezávisle na sobě objevily dva odlišné systémy. První systém - laser capture microdissection - byl založen na selektivní adhezi vybraných buněk k termoplastické membráně aktivované laserovým pulsem. Druhý – laser

microbeam microdissection, někdy též laser cutting microdissection – využíval laserového paprsku k vyřezávání požadované oblasti buněk. Tyto dva systémy položily základ pro současné LMD technologie.^{103, 109, 110, 113}

Laserová mikrodisekce se takto stala metodou umožňující snadno, spolehlivě, rychle a bez kontaminace vybrat a izolovat cílenou skupinu buněk z komplexních tkáňových a buněčných preparátů, nebo z kultivovaných živých buněk.^{114, 115}

2.3.2. Princip laserové mikrodisekce

Laserová mikrodisekce se skládá z několika základních kroků: upevnění biologického vzorku na podklad, výběr požadované oblasti pomocí mikroskopie, vyřezání vybraného úseku laserovým paprskem, odstranění vyřezané části pomocí záchytného systému.

Podle typu použitého laseru (UV nebo IČ) lze odvodit dva základní principy. První, pro IČ laser, je založen na upevnění tkání či buněk na podložní sklo. Nad tkáň se umístí termoplastická membrána (zpravidla součástí upraveného víčka), která se účinkem IČ laseru roztaví a přilne k vybrané disektované oblasti buněk. Po disekci je termoplastická fólie spolu s adherovanými buňkami odstraněna a zbytek nepoužité tkáně zůstává na podložním skle. Druhý princip, spojený s UV laserem, se nepatrně liší. Tkáň je většinou připevněna na speciální membránu. UV laserový paprsek vybranou oblast obkrouží a vyřízne. Vyříznutý úsek je poté záchytným systémem odstraněn od zbylé části vzorku. Vybrané a izolované skupiny buněk mohou být následně podrobeny přípravě pro analytická stanovení.¹¹⁴

2.3.3. Technologie

Typický přístroj pro laserovou mikrodisekci se skládá z inverzního nebo klasicky orientovaného mikroskopu. Mikroskop je napojen na počítačovou

jednotku, která zajišťuje ovládání kamery, motorizovaného stolku, mikrodisekčního záchytného systému (viz. dále), nastavení parametrů pro laserový paprsek nebo pro fluorescenci, vše za pomoci softwaru uzpůsobeného pro laserovou mikrodisekci.¹¹⁰

Důležité součásti přístroje jsou světelný zdroj (halogenová lampa), zdroj pro laser (rtuťová nebo xenonová výbojka) a někdy také zdroj pro fluorescenci (rtuťová výbojka).

2.3.3.1 Lasery

UV laser o kratší vlnové délce umožňuje větší soustředění paprsku (až 1 μ m) oproti IČ laseru (7,5 μ m). Z těchto důvodů poskytuje UV systém přesnější vyřezávání a je vhodnější pro mikrodisekci jednotlivých buněk a subcelulárních struktur. Z pohledu možného poškození buněčných makromolekul má UV laser horší vlastnosti. Ze studií vyplývá, že UV-A záření (320-400 nm) nepoškozuje nukleové kyseliny ani jiné buněčné biomolekuly, pokud jejich absorpční maxima neleží v této oblasti. Z důvodu nižší energie je tento fotochemický degradační účinek u IČ záření menší. S ohledem na některé studie se však nesmí zanedbat možný tepelný efekt IČ záření.¹¹⁰

2.3.3.2 Fluorescence

Přístroj laserové mikrodisekce umožňuje s doplňkovým vybavením fluorescenční mikroskopii. Takto lze lokalizovat složky označené fluorescenčními látkami (fluorochromy, např. fluorescein, rhodamin, DAPI atd). Excitační filtr mezi zdrojem záření a preparátem propouští pouze vlnové délky vyvolávající fluorescenci. Po absorpci záření s vhodnou vlnovou délkou se elektrony fluorochromu dostávají do excitovaného stavu. Při návratu elektronů do základních energetických stavů dochází k emisi záření o vlnové délce jiné než použité pro excitaci. Bariérový filtr mezi objektivem a okulárovými čočkami propouští pouze viditelné emitované světlo, které lze pozorovat.¹⁰¹

2.3.4. Záchytné systémy

Součástí technického vybavení jsou záchytné systémy. Slouží k zachytávání a přenosu vyřezaných buněk a tkáňových úseků. Rozeznávají se tři základní typy.¹¹⁴

2.3.4.1 Membránové (fúzní) systémy

Membránové systémy zahrnují několik technologií, které využívají termoplastické membrány a speciální fólie.

Jedna z nejčastějších se nazývá LCM (laser capture microdissection). Mikrodisekované části tkáně adherují, v důsledku působení IČ laseru, na termoplastickou membránu. Membrána je součástí speciálně upraveného víčka. Víčko se i s přilnutým vzorkem odstraní a vzorek se uzavře do zkumavky.^{110, 114, 116, 143}

Jiný systém využívá techniku „Pick-Up Sticks“. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou UV laserem obkrouženy a vyřezaný kousek fólie s buňkami je vtlačen do víčka mikrozkušavky elektrostatickou silou.^{110, 114, 144}

Pod označením LMM (laser microbeam microdissection) se lze setkat s technikou, kde se tkáňový materiál připevní na membránu, vzorek se překryje podložním sklem, UV laser obkrouží požadovanou oblast a poté se vyřezané okrsky tkáně vyzvednou zkumavkami s víčky s adhesivní vrstvou.^{102, 110, 114, 145}

LMM technologii jsme použili i v této diplomové práci. (Obr.1, 2)

2.3.4.2 Paprskové systémy

Do skupiny se řadí technologie označovaná jako LMPC (laser microdissection and pressure catapulting). Jako v předchozích případech se vzorek montuje na sklo, které se překrývá polyetylenovou fólií. Po mikrodisekci UV laserem se vyřezané části tkáně katapultují pomocí pulsu laserového paprsku a jsou zachycovány víčkem nanozkušavek.^{102, 110, 114, 117, 147}

Podobně funguje i laserový mikropaprskový systém využívající gravitační sílu místo laserového pulsu. Vyřezaný objekt padá bezkontaktní cestou za

účinku gravitace do víčka zkumavky a ihned je připraven pro další zpracování.^{102, 110, 114, 146}

2.3.4.3 Mechanické systémy

Další možností zachytávání buněk je tzv „Piezo power for microdissection“ (PPMD) technologie. Tento systém zahrnuje ultrazvukový piezo-mikroskalpel. Mikroskalpel kmitavými pohyby seškrabává potřebný úsek tkáně do kapky média. Kapka s izolovanými buňkami je nasáta pipetou a vnesena do mikrozukavky.^{114, 148}

2.3.5. Aplikace

V současnosti se LMD aplikuje ve třech oblastech: v genomické analýze, proteomické analýze a při studiu živých tkáňových buněk.

2.3.5.1 Genomická analýza

S rozvojem LMD metod se spojuje výrazný posun při studiu molekulárně-patologických procesů. Příkladem může být sledování genových mutací při diagnostice onemocnění nebo pozorování genové exprese a genetických změn v jednotlivých fázích rakovinových buněk. LMD technika je úspěšně používána ve spolupráci s modifikovanými metodami izolace nukleových kyselin (DNA a RNA), s PCR metodami, s komparativní genomickou hybridizací, spektrální karyotypizací nebo s microarray metodami.^{110, 112, 118, 119, 120}

2.3.5.2 Proteomická analýza

V proteomické analýze zvyšuje LMD pravděpodobnost identifikace nových proteinů. Pomáhá při porovnávání výskytu proteinů *in vitro* a *in vivo*¹⁰², při sledování přirozené aktivity buněk, při studiu patologických procesů, při pozorování účinků léčiv atd.¹¹⁸ LMD kombinovaná s proteomickými

metodami, jako jsou 2D-PAGE¹²², Western blot, MS metody (např. MALDI, SELDI, LC-MS, tandemová MS¹²³), tvoří vysoce citlivý nástroj pro identifikaci, kvantifikaci, mapování proteinů a pro porovnávání proteinové a genové sekvence.^{102, 118, 121, 124}

2.3.5.3 Studium a kultivace živých buněk

LMD se používá i při cílené izolaci jednotlivých živých buněk z tkání nebo z kultivovaných buněčných směsí.¹¹⁰ Ze studií je prokázáno, že životaschopnost, metabolická aktivita a dělení buněk není žádným způsobem ovlivněna. Proto je vhodným pomocníkem při opětovné kultivaci a získávání nových buněčných linií. Zajímavou aplikací je spojení softwaru pro automatické skenování a automatického LMD systému. Toto spojení umožňuje rychlou identifikaci (např. na základě barvení nebo značení protilátkami) a izolaci požadovaných buněk z velkého množství biologického materiálu.^{110, 117}

2.3.6. Využití v praxi

Pomocí LMD lze zpracovat velké množství druhů biologického materiálu. Může se pracovat se zamraženými, formalinem fixovanými nebo parafinovanými vzorky. Je možné vyřezávat z cytologických preparátů a nátěrů.¹¹⁴ Ani stáří barveného či nebarveného preparátu nemá velký vliv na LMD.

V praxi se LMD uplatňuje hlavně ve výzkumu rakoviny^{111, 122, 123, 125}, dále v molekulární patologii^{113, 126}, buněčné biologii¹¹⁷, forenzní medicíně, imunologii¹¹⁷, neurologii¹²⁷, mikrobiologii, virologii, genetice¹¹⁷, prenatální diagnostice¹¹⁷ a dalších oborech.

2.4. Proteomická analýza

Proteomika je obor, který se zabývá systematickou analýzou bílkovin v daném biologickém systému z hlediska jejich identity, množství a funkcí.

K analýze bílkovin přistupuje z několika směrů.¹²⁸ *Analytická proteomika* spojuje metody separace bílkovin ze směsi, identifikaci a charakterizaci bílkovin pomocí hmotnostní spektrometrie a bioinformatiku. *Strukturní proteomika* studuje strukturu proteinů metodami krystalografie, NMR, MS atd. *Funkční proteomika* se snaží určit funkci proteinů a jeho chování v životních procesech. *Diferenční (srovnávací) proteomika* sleduje změny složení bílkovin při různých stavech organismu. *High-coverage proteomika* získává údaje o aminokyselinové sekvenci a posttranslačních modifikacích za účelem popsat primární strukturu. *High-throughput proteomika* je zaměřena na získávání velkého množství údajů o bílkovinách, což je důležité pro screeningové účely. *Bottom-up proteomika* používá postupu enzymového štěpení izolované bílkoviny a následnou identifikaci a popis peptidových fragmentů hmotnostní spektrometrií. *Shotgun proteomika* identifikuje proteiny pomocí jejich peptidů, které jsou získávány naštěpením proteinů v neseparované směsi. Používá kombinace kapalinové chromatografie (nejčastěji HPLC) s tandemovou hmotnostní spektrometrií. *Top-down proteomika* se většinou snaží identifikovat celé proteiny pomocí přímé fragmentace na hmotnostním spektrometru.¹²⁸

Důležitými kroky proteomické analýzy jsou příprava vzorku a separace s následnou detekcí. Používají se chromatografické metody (afinitní chromatografie, kapalinová chromatografie na reverzních fázích, ion-výměnná chromatografie, gelová permeační chromatografie), elektromigrační techniky (např. 1D-elektroforéza, 2D-elektroforéza, izoelektrická fokusace, Westernblot) a hmotnostní spektrometrie.

Metody separace a detekce mohou být použity před štěpením bílkoviny nebo po štěpení. V prvním případě se lze setkat hlavně s elektromigračními technikami (1D-elektroforéza, 2D-elektroforéza kombinující izoelektrickou fokusaci a dělení dle molekulové hmotnosti, Western blot). V druhém případě převažuje hmotnostní spektrometrie kombinovaná s kapalinovou chromatografií.¹²⁸⁻¹³³

2.5. Příprava vzorku pro proteomickou analýzu

2.5.1. Homogenizace

Pro rozbití buněčných struktur a uvolňování proteinů z tkáňových a celobuněčných vzorků se používá procesu homogenizace. Nejčastěji se lze setkat s fyzikálními metodami využívající tlaku (frenchpress) a ultrazvuku (sonikace jehlou nebo v lázni), chemickými metodami založenými na lýze buněk osmotickou a enzymatickou cestou a mechanickou homogenizací. Proteiny uvolněné z rozbitých buněčných struktur se extrahují do roztoku pufru obsahující detergent. Detergenty (např. SDS, CHAPS, Rapigest) snižují povrchové napětí buněčných struktur, zvyšují rozpustnost proteinů a usnadňují přechod proteinů do kapalné fáze.

2.5.2. Stanovení bílkoviny

Postupy pro zpracování vzorku (např. nanášené množství, koncentrace činidel atd.) se odvíjí od přítomnosti množství bílkoviny ve vzorku. Pro určení koncentrace proteinů se používá spektrofotometrického stanovení na principu Biuretovy reakce. Při tomto ději dochází k interakci měďnatých iontů (Cu^{+2}) s peptidovou vazbou ($-\text{CO}-\text{NH}-$), přičemž měďnaté ionty jsou redukovány na měďné (Cu^{+}). Ke zvýšení citlivosti se přidává chelatační činidlo bicinchoninová kyselina (BCA), která vytváří komplex s měďným iontem v poměru 2 BCA : 1 Cu^{+} . Reakce probíhá v alkalickém prostředí za vzniku modrofialového komplexu, který je detekován při vlnové délce 562nm. Intenzita zabarvení odpovídá úměrně koncentraci bílkoviny ve vzorku.¹³⁴

2.5.3. Redukce a alkylace

Tyto dva procesy běžně předcházejí enzymatickému štěpení. Redukce zajišťuje narušení prostorové struktury proteinů rozbitím disulfidických můstků, které jsou tvořeny thiolovými skupinami cysteinu. Alkylací těchto skupin se

zabrání jejich oxidaci, opětovné vytvoření disulfidických vazeb. Mezi redukční činidla patří TCEP, DTT, merkaptoethanol, thiourea aj. K nejznámějším alkylačním činidlům se řadí jodacetamid (IAA), kyselina jodoctová a akrylamid.

2.5.4. Štěpení proteinů

Analýza celých proteinů hmotnostní spektrometrií je náročná z několika důvodů. Problémem je trojrozměrná struktura bílkovin a vysoká molekulární hmotnost, které komplikují průchod a dělení v separačním systému a identifikaci přesné sekvence z dat z fragmentace v hmotnostním analyzátoru.

Tyto problémy řeší štěpení proteinů na snadněji identifikovatelné peptidy. Štěpení je proto považováno za jeden z nejdůležitějších kroků přípravy vzorku. Fragmentace proteinů je prováděna chemicky pomocí bromkyanu nebo častěji enzymaticky. Nejužívanějším proteolytickým enzymem je trypsin, aktivní při pH 8,5. Aminokyselinovou strukturu proteinů štěpí specificky v místech C-terminálního konce argininu a lysinu, za předpokladu, že sousední aminokyselinou není prolin. Rozšířenými enzymy jsou také chymotrypsin, pepsin a endoproteinázy Lys C a Asp-N.¹³⁵

2.5.5. Odsolení

Odsolení je proces odstraňování nežádoucích složek ze vzorku a získávání analytu v čistší a koncentrovanější formě. Nejčastěji se při přípravě pro proteomickou analýzu provádí pomocí SPE-kolonek, tj. extrakce na pevné fázi. Podstatou je zachycení molekul látek (např. peptidů) na tuhém sorbentu kolonky (např. C18-sorbent), přes kterou vzorek protéká. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu. Promytím kolonky vhodným rozpouštědlem se odstraní nežádoucí příměsi. Poté se elučním rozpouštědlem vymyje extrakt o vysoké čistotě a vyšší koncentraci bílkoviny než v původním vzorku.¹³⁶

2.6. Western blot

Western blot je metoda sloužící k průkazu přítomnosti požadovaných proteinů ve vzorku. Spojuje principy separace elektroforézou a imunodetekce prostřednictvím specifických protilátek značených enzymovým komplexem nebo radionuklidy.

Princip této metody je velice podobný postupu při imunobarvení (viz. výše). Prvním krokem je separace směsi proteinů pomocí elektroforézy (v případě této diplomové práce 1D-elektroforézy) na polyakrylamidovém gelu. Následuje přenos rozdělených proteinů z gelu na membránu (nitrocelulózu nebo PVDF) vlivem elektrického proudu. Po přenesení proteinů se membrána ponoří do roztoku, který blokuje místa pro vznik nespecifických vazeb. Na blokovanou membránu se nanese primární protilátka, která se specificky váže na detekovaný protein. Poté se aplikuje sekundární protilátka namířená proti protilátce primární. Tento imunokomplex je v dalším kroku označen enzymovým komplexem (popř. pouze radionuklidem), který přeměňuje chromogenní substrát na barevný produkt. Výsledkem je barevný proužek v místě detekovaného proteinu. V případě, že se používá enzymový komplex přeměňující chemiluminiscenční látku, se detekce provádí pomocí filmu (např. film pro rentgenologické účely).^{137, 138}

2.6.1. Komplex biotin-streptavidin-peroxidáza a luminol

Tento peroxidázový komplex, princip uveden v bodě 2.2.4, katalyzuje za přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci luminolu. Výsledná oxidovaná forma emituje záření v místě aktivity enzymu. Emitované záření je detekováno pomocí fotocitlivého filmu. Film je emitovaným zářením osvětlen a poté je za použití roztoků vývojky a ustalovače vyvolán.¹³⁸

2.7. Kapalinová chromatografie v proteomické analýze

Kapalinová chromatografie (LC) je separační metoda založená na rovnovážném rozdělování analytu mezi stacionární (SF) a mobilní fázi (MF). Mobilní fáze unáší složky vzorku, které se s různou afinitou zadržují na stacionární fázi. Látky s vyšší afinitou k SF se zpožďují a eluují později než látky s nižší afinitou.

V proteomické analýze se používá systém na obrácených fázích (RPC - Reversed-phase chromatography), kde SF je nepolární, tvořená uhlovodíky a alkyly vázanými na silikagel (např. C-18 skupiny), a MF je polárnější, obsahující např. acetonitril a vodu.¹³⁶

Kapalinová chromatografie je většinou kombinovaná s hmotnostní spektrometrií. Uplatňuje se u bottom-up proteomického přístupu (viz výše) ve složení LC-MS pro peptidové mapování nebo LC-MS/MS pro sekvenaci peptidů.^{130, 132}

2.8. Hmotnostní spektrometrie v proteomické analýze

2.8.1. Princip hmotnostní spektrometrie

Jednou z nejrozšířenějších separačních a detekčních metod v proteomické analýze je hmotnostní spektrometrie.

Podstatou této metody je převedení molekuly vzorku na kladné nebo záporné ionty procesem ionizace. Nabité částice se poté separují podle efektivní hmotnosti m/z , tj. molekulové hmotnosti m připadající na náboj iontu z . Separované ionty putují do detektoru, kde se zaznamená jejich zesílený signál a získaná data se převedou do formy hmotnostního spektra, jako závislost relativní intenzity iontového proudu na efektivní hmotnosti m/z . Během nebo po procesu ionizace může docházet k rozpadu ionizovaných molekul na menší fragmenty, které získávají náboj nebo zůstávají nenabitě.

Hmotnostní spektrometrie je velice citlivá metoda umožňující detekovat látky v řádech $10^{-12} - 10^{-16}$ g. Dokáže popsat primární strukturu proteinů včetně posttranslačních a chemických modifikací a stanovit poměr izotopů zastoupených prvků.^{136, 139, 140}

2.8.2. Konstrukce hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří hlavních funkčních jednotek - ionizační zdroj, analyzátor a detektor – a vedlejších jednotek zahrnující vstup analytu do přístroje, vakuový systém a řídicí počítačovou jednotku.

2.8.2.1 Ionizační zdroj

Nejběžnějšími zdroji v proteomice jsou měkké ionizační techniky MALDI (desorpce/ionizace laserem za účasti matrice) a ESI (elektrosprej) ionizace.

U MALDI se nanáší směs vzorku s matricí na terčík destičky. Vysušením dochází ke krystalizaci matrice, jejíž krystaly mezi sebe uzavřou molekuly peptidů a proteinů. Destička je poté vystavena působení laserového paprsku. Matrice absorbuje fotony laserového paprsku a dochází k její excitaci. Následně je energie přenesena z matrice na proteiny a peptidy, čímž dochází k jejich ionizaci a vyvrstvení z terčíku do plynné fáze. Jako matrice se používá např. kyselina 2,5-dihydroxybenzoová, 3,5-dimethoxy-4-hydroxykořicová kyselina a α -kyano-4-hydroxykořicová.

Při ESI ionizaci dochází na konci sprejovací kapiláry ke vzniku nabitých kapek. V důsledku odpařování rozpouštědla se kapky zmenšují a jejich povrchová hustota náboje vzrůstá. Výsledkem je rozpad kapek až na malé, vysoce nabité kapičky, z nichž se uvolňují ionty do plynné fáze. Ionty analytů poté vstupují do analyzátoru.^{139, 140}

V proteomice se lze také setkat s označením SELDI (laserová desorpce/ionizace usnadněná povrchem), což je ionizační metoda podobná MALDI technice.¹⁴¹

2.8.2.2 Analyzátor

K nejčastějším hmotnostním analyzátorům se řadí kvadrupólový analyzátor (Q), iontová past (IT) a průletový analyzátor TOF.

Kvadrupól využívá separace pomocí čtyř kovových tyčových elektrod, na které se vkládá kombinace stejnosměrného a střídavého napětí. Napětí se volí tak, aby mezi elektrodami procházely pouze ionty s hodnotou m/z v určitém omezeném intervalu. K detektoru se dostávají pouze ionty se stabilní dráhou a žádané efektivní hmotnosti m/z .

Iontová past pracuje podobně jako kvadrupól, má však jen tři elektrody s hyperbolickým průřezem, z nichž jedna je prstencová a dvě kruhové. V prostoru mezi elektrodami se shromažďují ionty, jejichž pohyb je usměřňován atomy helia. Obdobně jako u kvadrupólu se zvolí kombinace napětí a vybrané ionty poté putují k detektoru.

Průletový analyzátor TOF je velmi často spojován s MALDI. S ESI ionizací se užívá hlavně v tandemové MS/MS. TOF analýza je založena na principu dělení dle rozdílných rychlostí iontů s různou efektivní hmotností. Ionty jsou urychleny elektrickým napětím, procházejí letovou trubicí a dopadají na detektor. Postupně dopadají ionty od nejlehčích (s vyšší rychlostí) po nejtěžší (s nižší rychlostí).^{136, 139, 140}

2.8.2.3 Detektor

K zachycení signálu iontového proudu slouží tři typy detektorů - „Faraday cup“ (doslova Faradayova miska), elektronové násobiče a detektor s konverzní elektrodou (dynodou) a fotonásobičem.

„Faraday cup“ a elektronové násobiče využívají podobného principu, tj. převedení proudu dopadajících iontů na proud elektrický. Ionty z hmotnostního analyzátoru vyrazí elektron, který dopadá na místo s méně negativním potenciálem a vyráží další elektrony. Signál se dalšími nárazy elektronů zvětšuje. Zesílený proud elektronů se vede na zesilovač a signál je poté vyhodnocen.

Detektory s konverzní dynodou a fotonásobičem se zakládají na podobném principu s tím rozdílem, že náraz iontu na konverzní elektrodu uvolní elektron, který poté dopadá na fosforescenční stínítko a vyráží foton. Foton je zachycen fotonásobičem a signál z fotonásobiče je následně vyhodnocen. Na

tomto principu pracuje detektor v anglické literatuře nazývaný „multichannel plate“ (multikanálová destička).^{136, 139}

2.8.3. Tandemová spektrometrie (MS/MS) v proteomické analýze

V proteomické analýze se často setkáme s tzv. tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS). Je založena na zapojení několika hmotnostních analyzátorů za sebou, umožňujících analýzu, fragmentaci a následnou analýzu fragmentů stanovených iontů. Nejčastěji se používají MALDI-TOF-TOF a ESI-Q-TOF. Mezi další zapojení patří QqQ nebo kombinace s QIT.

Pro LC-ESI-Q-TOF platí princip, že po separaci kapalinovou chromatografií je vzorek nesen do ESI zdroje, kde jsou generovány peptidové ionty. V první části za sebou zapojených hmotnostních analyzátorů je vybrán peptidový iont. Ten putuje do kolizní cely, kde je podroben fragmentaci. Nově vzniklé ionty jsou poté opět analyzovány dle efektivní hmotnosti m/z . Tímto zapojením lze získat přesné informace o sekvenci peptidů a zároveň odhalit případné posttranslační modifikace.^{139, 142}

2.9. Zpracování dat z hmotnostní spektrometrie

2.9.1. Databáze

Proteinové databáze obsahují uspořádaná data o proteinech. Primární databáze poskytují informace o jejich peptidové sekvenci. Sekundární databáze zahrnuje výsledky analýzy primárních databází a doplňuje je informacemi o strukturálních vzorech, motivech, mutacích atd. Existují také databáze, které uchovávají záznamy trojrozměrných struktur makromolekul.

K primárním databázím patří např. Swissprot, TrEMBL. Z důvodu sjednocení nových dat se vytvořily databáze složené jako UniProt. Ze sekundárních databází je znám např. Prosite, InterPro aj.^{131, 140}

2.9.2. Zpracování dat tandemové hmotnostní spektrometrie

Vyhodnocování z tandem MS/MS je založeno na porovnávání naměřených m/z peptidových fragmentů a jejich mateřského iontu s teoreticky vypočítanými hodnotami uloženými v použité databázi. Peptidy jsou při fragmentaci štěpeny v přesně definovaných místech, což umožňuje automaticky vypočítat pravděpodobnost shody s teoretickými údaji. K porovnávání naměřených a teoretických m/z fragmentů z databází se používají programy např. Sequest, Mascot a Phenix. Programy dokáží dle přesně stanovených pravidel přiřadit nalezeným peptidům jejich sekvenci a pomocí osekvenovaných peptidových fragmentů (s jistou pravděpodobností) identifikovat protein, ve kterém se peptid nachází.^{131, 140}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Přístroje a pomůcky

3.1.1. Pomůcky

- Automatické mikropipety Proline, Biohit, Finsko
- Filtrační papíry, Whatman, USA
- Kolonky pro odsolení
 - PepClean™ C-18 Spin Columns, Pierce, USA
 - UltraMicroSpin™ Columns, Harvard Apparatus, USA
- Kultivační destičky TPP (test plate 96U), Švýcarsko
- Membrány pro laserovou mikrodisekci, MMi Molecular Machines and Industries, Švýcarsko
- Membrána pro western blot, Bio Trace™ PVDF (polyvinylidenfluorid), PALL Corporation, USA
- Parafilm, SPI Structure Probe, INC.
- pH indikátorové papírky, Merk, Německo
- Podložní a krycí sklíčka, Menzel-Glaser, Německo
- RTG film CL-X Posure™, Pierce, USA
- Sada pro elektroforézu, Bio-Rad, USA
- Zkumavky s adhezivním víčkem, MMi Molecular Machines and Industries, Švýcarsko
- Zkumavky a špičky, Eppendorf, Německo
- Běžný materiál: Injekční jehly, laboratorní nádobí, zkumavky

3.1.2. Přístroje a softwarové programové vybavení

- Automat pro vyvolávání RTG snímků, Curix 60/CP1000, typ 9462, Agfa, Belgie
- Centrifugační odparka Jouan RC1009, Trigon-plus, Francie

- Centrifuga BR4i Jouan, Trigon-plus, Francie
- Denzitometr CO8000 Cell Density meter, WPA, Velká Británie
- Inkubátor mini rot. HIM 20, Grant BOEKEL, Velká Británie
- Inkubátor C027, Biotech New Brunswick Scientific, USA
- Kryotom SLEE MEV, Medesa s.r.o., Slovensko
- Mikrovlná trouba LCE-2010M, 230V ~ 50Hz, 1200W
- Mikroskop Amplival, Carl Zeiss, Německo
- Mikroskop pro inverzní mikroskopii, Meopta, Česká republika
- Mikroskopický přístroj pro LMD Olympus IX71- Modul IMT2, Olympus, Německo
 - Mikrodisekce laser IMT2 IX71S1F-2
 - Mikroskop inverzní IMT2
 - Zdroj fluorescence U-RFL-T 2 PWS, 100W, Hg-výbojka
 - Zdroj VIS světla AH2 RxT, 100W, Halogenová lampa
 - Zdroj pro laser model U-LH100HGAP0, 19V, 100W, Hg-výbojka
- Přístroj pro blotování, Blot-Trans-Blot SD, Semi Dry Transfer Cell, Bio-Rad, USA
- Skříň bezpečnostní Biohazard s@fellow 1.2, Bioair instruments,
- Softwarový program – MassLynx 1.5., Waters, USA
- Softwarový program – MMi Cell Tools, MMi Molecular Machines and Industries, Švýcarsko
- Softwarový program – Phenyx 2.5.11, GeneBio, Švýcarsko
- Sonikátor ultrazvukový UP 50H, dr.Hielscher Ultrasonics, Německo
- Speed Vac Concentrator 5301, Eppendorf, Německo
- Hmotnostní spektrometr a související komponenty:
 - Spektrometr Q-TOF Ultima™ API, Waters, Velká Británie
 - Systém pro kapalinovou chromatografii - CapLC system, Waters, USA
 - Pumpa - Micromass CapLC XE Pump, Waters, USA
 - Předkolona - Atlantis dC18, 5µm NanoEase™ Trap Column, Waters, USA

- Kolona – Atlantis dC18, 75µm x 150mm, 3µm NanoEase™
Column, Waters, USA
- Techne-Hybridiser HB-1D, Techne, Velká Británie
- Termostat, TECTRA a.s. UBD, Česká republika
- Thermomixer 5355 Comfort, Eppendorf, Německo
- Třepačka Minishaker MS2, IKA-WORKS, inc., Fischer Scientific, USA
- UV-VIS spektrofotometr Helios, ThermoSpectronic, ChromSpec, Velká Británie
- váhy AX105 Delt-Range, METTLER TOLEDO, Švýcarsko
- Zdroj Power PAC 200, Bio- Rad, USA

3.2. Chemikálie a roztoky

- Acetonitril (ACN), pro isokratickou eluci, Merk, Německo
- Akrylamid, 99,9%, Bio-Rad, USA
- Azid sodný (NaN₃), Trucizna, Polsko
- 1,4-bis(akryloyl)piperazin (PDA), 99,0%, Fluka, Švýcarsko
- BM Chemiluminescence blotting Substrate (POD) Kit, Roche, Německo
- Bromfenolová modř, LKB-Producter AB, Švédsko
- Citrát sodný dihydrát (C₆H₅Na₃O₇·2 H₂O), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Coomassie blue modř (C₄₇H₄₈N₃O₇S₂Na), Serva, USA
- DAB (C₁₂H₁₄N₄·4HCl·2H₂O), Fluka, Švýcarsko
- DakoCytomation LSAB + Systém-HRP Kit pro imunobarvení,
DakoCytomation, Dánsko
- Deionizovaná a destilovaná voda, Těchotín, Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), Merk, Německo
- Dodecylsulfát sodný (SDS), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Dusičnan stříbrný (AgNO₃), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Ethanol, 96%, RNDr. Jan Kulich s.r.o., Česká republika
- Glycerol, 99,5%, USB Corporation, USA
- Glycin (C₂H₅NO₂), 99%, Sigma-Aldrich, USA

- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), Merk, Německo
- Hydrogenuhlíčitán amonný, Fluka, Švýcarsko
- Chlorid draselný (KCl), 99,5%,
- Chlorid sodný (NaCl), 99,5%, Fluka, Švýcarsko
- Jodacetamid (IAA), Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina chlorovodíková (HCl), Lachema, Česká republika
- Kyselina mravenčí (FA), 98-100%, Sigma-Aldrich, USA
- Kyselina octová ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$), 99,8%, Fluka, Švýcarsko
- Kyselina trifluorooctová (TFA), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Médium Mc Leod pro kultivaci bakterii
 - Thayer-Martin agar base k.č. 10728, Merck, Německo
 - Bacto agar k.č. 0140-01-0, Difco, USA
 - Hovězí hemoglobin k.č. 212392, Becton Dickinson, USA
 - IsoVitalaxTM k.č. 11876, Becton Dickinson, USA
 - Tetracyklin
- Médium pro kultivaci buněk linie J774
 - D-MEM, MACS Miltenyi Biotec, Německo
- Merkaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), Serva, USA
- Methanol (CH_4O), 99,0%, Fluka, Švýcarsko
- Micro BCATM Protein Assay Kit, Pierce, USA
- Montovací médium DPX pro histologii, Fluka, Švýcarsko
- 30% peroxid vodíku (H_2O_2), Conlac spol. s r.o., Česká republika
- Persíran amonný (APS), Bio-Rad, USA
- Precision Plus Protein Standard 1,5mg/ml (standard pro Western blot), Bio-Rad, USA
- Primární protilátka pro imunochemické barvení – vysokotiterní králičí sérum, Ústav molekulární patologie Hradec Králové, Česká republika
- Primární protilátka (myší) pro Western blot
 - anti-FTT1103 (CAT 1.1 08/06 Brno)
 - anti-IgIC (CGG 1.1 06/05 Brno)

- anti-IgIB (2.2 04/07 Brno)
- RapiGest ST, Waters, USA
- Rekonstituční pufr pro trypsin, Promega, USA
- Sekundární butanol (2-butanol), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Sekundární protilátka pro Western blot, Dako Polyclonal goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP, Dako Cytomation, Dánsko
- Síran měďnatý pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), Lachema, Česká republika
- Síran železnatý heptahydrát ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), 99%, Sigma-Aldrich, USA
- Sušené mléko (blotting grade blocker non-fat dry milk), Bio-Rad, USA
- TCEP HCl (tris (2-karboxyethyl)fosfin hydrochlorid), Pierce, USA
- TEMED (N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylendiamin), Bio-Rad, USA
- Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Sigma-Aldrich, USA
- Trypsin, sp. act. > 5,000 u/mg, Promega, USA
- TWEEN 20, Sigma-Aldrich, USA
- Ustalovač – Rapid fixer G 354, Agfa, Belgie
- Vývojka – Developer G 153 A a G 153 B, Agfa, Belgie
- Xylen, Lach.ner, Česká republika

3.3. Modelová infekce buněk makrofágové linie J774

3.3.1. Použitý materiál

- myší makrofágová buněčná linie J774.2, American Type Culture Collection, USA
- bakterie *Francisella tularensis* LVS/GFP, Umea, Švédsko
- kultivační destičky TPP

3.3.2. Použité roztoky

- Fosfátový pufr (PBS) 10x koncentrovaný
(80g NaCl + 2g KCl + 32,1g Na₂HPO₄*12H₂O + 2g KH₂PO₄ do 1 l deionizované vody, úprava pH na 7,2-7,4 pomocí HCl nebo NaOH, před použitím 10x naředit)
- Médium McLeod pro kultivaci bakterií
(Roztok 1 + roztok 2 + 20ml IsoVitalax + 44mg tetracyklin)
 - Roztok 1: 72g Thayer-Martin agar base + Bacto agar 1g do 1l deionizované vody, povařit, sterilizovat
 - Roztok 2: 20g hemoglobin do 1l deionizované vody, nechat nabobtnat, sterilizovat
- Médium D-MEM pro kultivaci buněk linie J774
- Montovací médium pro histologii
- Vodný roztok 70% ethanolu

3.3.3. Postup

Na McLeodovu půdu jsme naočkovali *F. tularensis* LVS/GFP a inkubovali jsme 37°C 24 hodin. Po inkubaci jsme napěstované bakterie stáhli kličkou z plotny. Bakterie jsme promyli v roztoku PBS a připravili jsme suspenzi bakterií v PBS s obsahem přibližně 10⁹ bakterií/ml a optickou hustotou okolo hodnoty 1 (pokus 1 - CFU 1,06 OD, pokus 2 - CFU 0,94 OD). Ze suspenze o

koncentraci 10^9 bakterií/ml jsme připravili roztoky 1ml D-MEM média s požadovaným množstvím bakterií. Tyto roztoky jsme poté nanášeli do jamek kultivačních destiček (Tab. 1).

Pro provedení infekce jsme použili kultivační destičky s dvěma typy jamek – neupravené standardní jamky (pokus 1) a jamky se sklem pro adhezi buněk (pokus 2). Do kultivačních destiček jsme nasadili buňky linie J774 v množství dle Tab. 1. Buňky jsme inkubovali v DMEM médiu přes noc při 37°C . Po ukončení inkubace jsme jamky s buňkami J774 promyli PBS puřrem. Poté jsme do jamek s buňkami J774 přidali roztoky s příslušným množstvím bakterií (viz. Tab. 1) a inkubovali jsme při 37°C . Dobu infekce jsme zvolili 2 hodiny pro pokus 1 a 6 hodin pro pokus 2. V následujícím kroku jsme jamky kultivačních destiček třikrát promyli PBS puřrem. V prvním pokusu jsme vše stočili při 1250rpm a resuspendovali jsme obsah jamek v 200 μl PBS puřru. Potom jsme nanesli jednu kapku suspenze na podložní sklíčko, nechali zaschnout a fixovali v 70% ethanolu. V druhem pokusu jsme sklíčko s adherovanými buňkami fixovali 70% ethanolem a pomocí montovacího media připevnili k podložnímu sklu. Takto připravené preparáty jsme pozorovali pod fluorescenčním mikroskopem.

Tabulka 1. Schéma dávkovaného množství bakterií k příslušnému množství buněk linie J774.

Pokus 1		Pokus 2			
10^6 buněk J774 v jamce		10^4 buněk J774 v jamce		10^5 buněk J774 v jamce	
Počet bakterií	MOI	Počet bakterií	MOI	Počet bakterií	MOI
5×10^7	50	2×10^6	200	2×10^7	200
1×10^8	100				
2×10^8	200	5×10^6	500	5×10^7	500

3.4. Infekce myši Balb/c

3.4.1. Použitý materiál

- Myši Balb/c, Velaz s.r.o. Praha, Česká republika
- bakterie *Francisella tularensis* LVS/GFP, Umea, Švédsko

3.4.2. Použité roztoky

- Suspenze A obsahující $9,8 \times 10^3$ bakterií ve fyziologickém roztoku (9% vodný roztok NaCl) pro subkutání infekci
- Suspenze B obsahující $9,8 \times 10^4$ bakterií ve fyziologickém roztoku (9% vodný roztok NaCl) pro intradermální infekci

3.4.3. Postup

Suspenzí A nebo B jsme pomocí injekční jehly infikovali myši Balb/c. Subkutání infekci jsme provedli vpichem do oblasti třísel, intradermální infekci vpichem do vybraných míst kůže. Po 14 dnech jsme myši, které přežili, usmrtili a provedli pitvu. U intradermálně infikovaných myší jsme odebrali kůži v oblasti vpichu a slezinu, u subkutáně infikovaných myší slezinu a oblast třísel, kde byla provedena infekce. Odebrané orgány a tkáně jsme označili (Tab. 2) a vše jsme zamrazili pro uskladnění při -80°C .

Tabulka 2. Označení odebraných tkání

Infekce intradermální				Infekce subkutání					
Myš č.		1	2	Myš č.		4	5	6	7
Označení odebrané tkáně	Kůže (K)	1KA	2KA	Označení odebrané tkáně	Místo vpichu – třísla (T)	-	T5	T6	-
		1KB	2KB						
		1KC	2KC						
	Slezina (S)	1S	2S		Slezina (S)	4S	5S	6S	7S

3.5. Příprava tkáňových preparátů a vzorků celých řezů

3.5.1. Použitý materiál

- Zmražené kusy tkání získané při pitvě infikovaných myší
- Membrány pro LMD (laserovou mikrodisekci)
- Podložní skla

3.5.2. Použité roztoky

- roztok methanolu
- roztok 70% ethanolu ve vodě
- roztok 1: vodný roztok 30% ACN, 50mM NH_4HCO_3 , 0,1% RapiGest
- roztok 2: vodný roztok 50% ACN, 50mM NH_4HCO_3
- roztok 3: vodný roztok 15% ACN, 50mM NH_4HCO_3 , 0,1% RapiGest

3.5.3. Postup

Kryotomem jsme nakrájeli při -20°C zamraženou tkáň na $8\mu\text{m}$ široké řezy. Tkáňové řezy jsme použili na přípravu tkáňových preparátů a na přípravu celořezových vzorků.

Pro přípravu tkáňových preparátů jsme použili podložní skla nebo LMD membrány. Tkáňové vzorky na podložním skle jsme fixovali 5-20 minut v roztoku methanolu. Vzorky na membráně jsme fixovali 30 minut v 70% roztoku ethanolu a poté jsme všechny preparáty nechali oschnout. Takto ošetřené preparáty byli připravené pro imunochemické barvení a LMD.

Celořezové vzorky určené přímo pro sonikaci jsme připravili přenesením dvou až tří řezů do eppendorfek s roztokem 1 nebo 2 (Tab.3). Roztok 2 jsme z příslušných vzorků odpařili a přidali jsme $60\mu\text{l}$ roztoku 3.

Tabulka 3. Příprava vzorků celých řezů tkání

Roztok	1	2
--------	---	---

Objem ve zkumavce	100 μ l	400 μ l
Vzorek	1 – 5	22 – 25

3.6. Imunochemické barvení

3.6.1. Použitý materiál

- Nebarvené tkáňové preparáty na podložních sklech
- Krycí sklíčka

3.6.2. Použité roztoky

- PBS pufr pH 7,2
(0,4g KCl + 16g NaCl + 0,4g KH_2PO_4 + 5,8g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
rozpusťit v 2 litrech destilované vody, pH upravit 1N NaOH nebo
0,1N HCl)
- Tlumící roztok (1,8ml H_2O_2 + 100ml metanolu)
- Neimunní sérum – roztok 5% mléka (1g mléka + 20ml PBS pufru)
- Roztok primární protilátky v 5% roztoku mléka (ředění 1:1000)
- DakoCytomation LSAB + Systém-HRP Kit
 - Roztok 1: Biotinylated Link Universal
(anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat immunoglobulins)
 - Roztok 2: Streptavidin-HRP
(Streptavidin conjugated to horseradish peroxidase)
- Roztok DAB
(na špičku nože DAB + 100 μ l dimethylformaldehyd, nechat
rozpusťit, + 20ml PBS, těsně před použitím přidat 10 μ l 30% H_2O_2)
- 1% vodný roztok CuSO_4
- montovací médium
- roztok pro odvodnění - xylen

3.6.3. Postup

Tkáňové preparáty jsme opláchli destilovanou vodou, ponořili jsme je do PBS lázně a lázeň vložili do mikrovlnné trouby na 2 x 5 minut při 750W. Lázeň i

s preparáty jsme nechali 20 minut chladnout. Poté jsme preparáty opláchli destilovanou vodou a nanесли na ně tlumící roztok, který jsme nechali působit 20 minut (při 20°C). Následně jsme je na 5 minut (při 20°C) ponořili do destilované vody. V dalším kroku jsme po dobu 30 minut (při 20°C) nechali na preparát působit neimunní sérum. Poté jsme preparát slili, na tkáňové řezy jsme nanесли roztok primární protilátky a nechali 1 hodinu inkubovat (při 20°C). Po inkubaci jsme preparáty opláchli PBS puřem a aplikovali jsme roztok 1. Po 20 minutové inkubaci s roztokem 1 jsme vše slili, opláchli jsme preparát a nanесли jsme roztok 2. Inkubovali jsme 20 minut (při 20°C), opět jsme provedli oplach v PBS puřru a poté jsme preparát pokryli roztokem DAB. Nechali jsme ho působit 15-20 minut (při 20°C), roztok jsme následně slili, preparát jsme ponořili na 1 minutu do destilované vody, na 5 minut (při 20°C) do 1% roztoku CuSO_4 a nechali jsme ho 10 minut promývat pod tekoucí vodou. Pomocí roztoku xylenu jsme preparát odvodnili. V následujícím kroku jsme ho pokryli montovacím médiem a přitiskli krycí sklíčko. Po zaschnutí jsme preparáty mikroskopicky zhodnotili.

3.7. Laserová mikrodisekce vzorků

3.7.1. Použitý materiál

- Membrány pro LMD se zafixovanými tkáňovými řezy
- Zkumavky pro LMD
- Podložní sklíčka

3.7.2. Použité roztoky

- Roztok 1: vodný roztok 30% ACN, 50mM NH_4HCO_3 , 0,15% RapiGest
- Roztok 2: vodný roztok 30% ACN, 50mM NH_4HCO_3 , 0,2% RapiGest
- Roztok 3: vodný roztok 30% ACN, 50mM NH_4HCO_3 , 0,1% RapiGest

3.7.3. Postup

Membránu se vzorkem jsme překryli podložním sklem tak, že vzorek tkáně ležel mezi těmito dvěma vrstvami. Preparát jsme umístili do mikroskopu (membránou nahoru) a pomocí fluorescenční mikroskopie (filtr BP 460-495nm a BA 510-560nm, expoziční čas 1,5 s) jsme ho zhodnotili. V počítačovém programu (mmi Cell Tools) jsme vyznačili místa předpokládané infekce a prostřednictvím laserového paprsku (parametry - 355nm, 200-240VAC, síla 100%, ohnisko 1-20%, rychlost 15-20%) jsme je vyřízli. Na vyřezané oblasti jsme přiložili víčko s adhezivní vrstvou a vyzvedli jsme disektované kousky tkáně, které jsme následně uzavřeli do zkumavky. Disektované úseky tkáně jsme vnesli do extrakčního roztoku 1, 2 nebo 3 (Tab. 4) a pokračovali jsme ve zpracování vzorku sonikací.

Tabulka 4. Použití extrakčních roztoků pro jednotlivé vzorky

Roztok	Vzorek	Objem (µl)
1	6	150
	7	200
	CB	120
2	8	120
	9	80
	10	70
	11, 12	75
3	13 - 21	100
	26	80

3.8. Sonikace

3.8.1. Použitý materiál

- Vzorky z laserové mikrodisekce
- Vzorky celých řezů

3.8.2. Postup

Vzorky z LMD a celořezové vzorky jsme stočili na centrifuze, povařili jsme je 15 minut při 95°C a sonikovali. Sonikaci (amplituda 100%, cykl us 0,75s) jsme prováděli 5x za sebou (vzorky s označením 1-5 a 26,27 pouze 3x) po 1 minutových intervalech, při čemž jsme vzorek chladili ledovou tříští. Vzorky jsme poté stočili na centrifuze, opět jsme je povařili 15 minut při 95°C a zase stočili. Po sonikaci byly vzorky připraveny pro stanovení bílkoviny, Western blot a pro redukci, alkylaci a štěpení.

3.9. Stanovení bílkoviny

3.9.1. Použitý materiál

- Sonikované vzorky

3.9.2. Použité roztoky

- Micro BCA™ protein Assay Kit
 - Roztok A: Micro BCA reagent (MA)
 - Roztok B: Micro BCA reagent (MB)
 - Roztok C: Micro BCA reagent (MC)
 - Standardní roztok BSA (hovězí sérový albumin) 2 mg/ml
- Pracovní roztok: 25 dílů roztoku A + 24 dílů roztoku B + 1 díl roztoku C
(7,5ml A + 7,2ml B + 0,3ml C)

3.9.3. Postup

Podle tabulky 6 jsme připravili řadu standardních roztoků. Poté jsme napipetovali 0,4ml standardních roztoků B-I a příslušné objemy vzorků (Tab. 5) v dubletech do eppendorfek. Vzorky jsme doplnili do 0,4ml vodou. Do eppendorfek se standardními roztoky a vzorky jsme následně přidali po 0,4ml pracovního roztoku, obsah jsme promíchali a vše jsme inkubovali 1 hodinu při 60°C. Po inkubaci jsme eppendorfky zchladili pod tekoucí vodou na pokojovou teplotu. U roztoků jsme do deseti minut změřili absorbanci při vlnové délce 562nm a nakonec jsme vypočítali koncentrace bílkoviny ve vzorcích.

Tabulka 5. Dávkování vzorků pro stanovení bílkoviny

Vzorek	Objem (μl)
1 – 5	2
13 – 21	4
22 – 25	2
CB	10

Pozn. U vzorků 6-12, 26 a 27 nebylo stanovení provedeno

Tabulka 6. Příprava řady standardních roztoků pro kalibraci

Zkumavka	Objem vody (ml)	Objem BSA (ml)	BSA koncentrace (μg/ml)
A	2,25	0,25 ml standardního BSA	200
B	4,0	1 ml roztoku A	40
C	2,0	2 ml roztoku B	20
D	2,0	2 ml roztoku C	10
E	2,0	2 ml roztoku D	5
F	2,0	2 ml roztoku E	2,5
G	2,4	1,6 ml roztoku F	1
H	2,0	2 ml roztoku G	0,5
I	4,0	0	Blank

3.10. Redukce, alkylace a štěpení

3.10.1. Použitý materiál

- Sonikované vzorky

3.10.2. Použité roztoky

- Vodný roztok 100mM TCEP
- Vodný roztok 300mM IAA
- Vodný roztok 50mM NH₄HCO₃

- Roztok trypsinu rozpuštěný v rekonstitučním pufru 0,2μg/μl

3.10.3. Postup

V případě potřeby jsme vzorek doplnili 50mM NH₄HCO₃ na vhodný objem (Tab. 7). Poté jsme přidali příslušný objem 100mM roztoku TCEP (Tab. 7) a inkubovali jsme 45 minut při 55°C za stálého míchání při 600rpm. Následně jsme přidali daný objem 300mM roztoku IAA (Tab. 7) a inkubovali jsme v temnu 45 minut při 30°C a míchání 600rpm. Po inkubaci jsme vzorek naředili 50mM NH₄HCO₃ na odpovídající objem (Tab. 7) a zkontrolovali pH (8,5) pomocí indikátorového papírku. V dalším kroku jsme k vzorku přidali roztok trypsinu dle (Tab. 7) a inkubovali jsme přes noc při 37°C a za kontinuálního míchání při 300rpm. Druhý den jsme vzorek odpařili do sucha. Takto upravený vzorek byl připraven pro odsolení.

Tabulka 7. Tabulka objemů přidávaných roztoků a hodnot koncentrace látek v průběhu přípravy vzorku.

Vzorek		100mM TCEP		300mM IAA		Trypsin 0,2μg/μl		Objem (μl) po přidání NH ₄ HCO ₃	
Číslo	Cca Objem (μl)	Objem (μl)	Koncentrace ve vzorku (mM)	Objem (μl)	Koncentrace ve vzorku (mM)	Objem (μl)	Koncentrace ve vzorku (ng/μl)	Před redukcí	Před štepením
6	150	10	6,3	12	20,9	10	4	-	500
7	200	10	4,8	12	16,2	10	4	-	500
8	120	10	7,7	12	25,3	10	4	-	500
9	80	10	11,1	12	35,4	10	4	-	500
10	70	10	12,5	12	39	10	4	-	500
11	25	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	50	250
12	75	10	11,7	12	37,1	10	4	-	500
13	50	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	-	250
14	50	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	-	250

15	50	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	-	250
16	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
17	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
18	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
19	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
20	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
21	90	5	5	6	17,7	5	2	-	500
22	28	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	50	250
23	38	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	50	250
24	30	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	50	250
25	23	2,5	4,2	3	16,2	2,5	2	50	250

3.11. Odsolení vzorku

3.11.1. Použitý materiál

- Vzorky po štěpení trypsinem
- Kolonky
 - a) Pepclean™ C-18 Spin Columns
 - b) Ultra MicroSpin™ Columns

3.11.2. Použité roztoky

- ACN
- Roztok 1: 5% ACN, 0,1%TFA, 94,9% destilovaná voda
- Roztok 2: 80% ACN, 0,1% TFA, 19,9% destilovaná voda

3.11.3. Postup

Odpařené vzorky po štěpení trypsinem jsme odsolovali na dvou typech kolonek (Tab. 8). Postup byl stejný, lišili se pouze objemy použitých roztoků (Tab. 9). Kolonku jsme navlhčili acetonitrilem, ekvilibrovali jsme ji roztokem 1 a poté jsme dvakrát za sebou nanесли vzorek, který jsme rozpustili v 80μl roztoku 1. Kolonku jsme několikrát promyli roztokem 1 a v dalším kroku jsme

z ní vymyli zachycené složky vzorku roztokem 2. Získaný extrakt jsme odpařili do sucha. Suchý vzorek jsme následně zpracovali dle postupu pro hmotnostní analýzu.

Tabulka 8. Odsolení vzorků na kolonkách

Typ kolonky pro odsolení	Kolonka a)	Kolonka b)
Vzorky	6 – 10, 12	11, 13 – 25

Tabulka 9. Postupy a) a b) pro různé kolonky

Krok	Postup pro kolonku a)	Postup pro kolonku b)
Navlhčení kolonky	1 x 200 μ l ACN	1 x 100 μ l ACN
Ekvilibrace kolonky	3 x 200 μ l roztoku 1	2 x 100 μ l roztoku 1
Nanesení vzorku	2 x za sebou 80 μ l vzorku	2 x za sebou 80 μ l vzorku
Odsolení	4 x 200 μ l roztoku 1	2 x 75 μ l roztoku 1
Eluce	2 x 20 μ l roztoku 2	2 x 20 μ l roztoku 2

3.12. Western blot

3.12.1. Použitý materiál

- Sonikované vzorky

3.12.2. Použité roztoky

- Roztok 0,5M TRIS-HCl pH 6,8
(6,05g TRIS base do 100ml destilované vody, pH upravit pomocí HCl)
- Roztok 1,5M TRIS-HCl pH 8,8
(72,66g TRIS base + 23,64 TRIS-HCl do 500 ml destilované vody, pH upravit pomocí HCl)
- 3 x koncentrovaný vzorkovací pufr SDS
(1,875ml 0,5M TRIS-HCl pH 6,8 + 1,5ml 2-merkptoethanol + 3ml glycerol + 0,69g SDS + 0,3ml 0,1% bromfenolová modř doplnit do 10ml destilovanou vodou)
- Horní pufr pro elektroforézu

- (15g TRIS base + 72g glycin + 2,5g SDS doplnit do 2,5l destilovanou vodou, pH okolo 8,5)
- Dolní pufr pro elektroforézu
(15g TRIS base + 72g glycin + 2,5g SDS + 0,5g azid sodný doplnit do 2,5l destilovanou vodou, pH okolo 8,5)
 - Transferový pufr
(15,15g TRIS base + 72g glycin + 1000ml methanol doplnit do 5l destilovanou vodou, pH okolo 8,4)
 - 10 x koncentrovaný roztok TBS
(48,4g TRIS base + 160g NaCl + 76ml 1M HCl doplnit do 2l destilovanou vodou, pH 7,6)
 - Roztok sekundárního butanolu
(50ml sekundární butanol + 10ml destilovaná voda)

 - Roztoky pro přípravu gelu:
 - Roztok akrylamidu s PDA
(4,5g akrylamid + 0,12g PDA doplnit do 15ml destilovanou vodou)
 - 10% roztok APS (50mg APS do 0,5ml destilované vody)
 - 10% roztok SDS (0,5g SDS do 5ml destilované vody)
 - Roztok pro 12% dělicí gel
(6ml roztok akrylamidu s PDA + 3,8ml 1,5M TRIS-HCl pH 8,8 + 5ml destilovaná voda, odvzdušnit, + 150µl 10% roztok SDS + 50µl 10% roztok APS + 6µl TEMED)
 - Roztok pro zaostřovací gel
(1,3ml roztok akrylamidu s PDA + 2,5ml 0,5M TRIS-HCl pH 6,8 + 6,1ml destilovaná voda, odvzdušnit, + 100µl 10% roztok SDS + 50µl 10% roztok APS + 10µl TEMED)
 - Proteinový standard – Precision Plus Protein Standard 1,5mg/ml
 - Roztok 0,05% TBST

(200ml 10x koncentrovaný TBS + 1ml TWEEN + 1800ml
destilovaná voda)

- 5% roztok mléka
(5,5g sušeného mléka + 110ml 0,05% roztoku TBST)
- Primární protilátka (ředění 1:1000) v 5% roztoku mléka
 - Roztok anti-FTT1103 (2 μ l protilátky + 2ml 5% roztoku mléka)
 - Roztok anti-Ig1C (2,5 μ l protilátky + 2,5ml 5% roztoku mléka)
 - Roztok anti-Ig1B (2 μ l protilátky + 2ml 5% roztoku mléka)
- Sekundární protilátka (ředění 1:1000) v 5% roztoku mléka
 - Dako Polyclonal goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP
(5 μ l protilátky + 5ml 5% roztoku mléka)
- Chemiluminiscenční roztok
(ředění A:B – 100:1, 2ml roztok A + 20 μ l roztok B)
(BM Chemiluminescence blotting Substrate (POD) Kit)
 - Roztok A (Lumiscence Substrate solution)
 - Roztok B (Starting solution)
- Roztoky pro rychlé barvení Coomassie Blue
 - Barvicí roztok (25% methanol, 10% kyselina octová, 0,1% CBBR
250 Coomassie Blue, 64,9% destilovaná voda)
 - Odbarvovací roztok (45% methanol, 10% kyselina octová, 45%
destilovaná voda)
- Vývojka a ustalovač
- Roztok pro barvení stříbřením
(4g citrát sodný v 10ml dest. vodě + 1,6g síranu železnatého v 8ml
dest. vodě + 0,4g dusičnan stříbrný v 2ml dest. vodě, vše doplnit
do 200ml destilovanou vodou)

3.12.3. Postup

3.12.3.1 Příprava gelu a elektroforéza

Mezi 2 skla, očištěná ethanolem a upevněná ve stojánek, jsme nalili roztok pro dělicí gel, převrstvili jsme ho roztokem sekundárního butanolu a nechali 1 hodinu polymerovat. Ze zatuhlého dělicího gelu jsme odsáli sekundární butanol a na jeho místo jsme nalili roztok pro zaostřovací gel. Do jeho horní vrstvy jsme zasunuli hřebínek pro tvorbu jamek a nechali jsme gel 45 minut tuhnout. Poté jsme hřebínek vyjmuli a stojánek s gelem jsme přemístili do držáku, který jsme položili do vany pro elektroforézu. Do elektroforetické vany jsme z vnější strany držáku nalili dolní pufr a z vnitřní strany horní pufr tak, aby překrýval jamky gelu. Na takto připravený gel jsme nanесли proteinový standard a upravené sonikované vzorky (Tab. 10). Sonikované vzorky jsme předtím upravili odpařením na přijatelný objem a poté jsme je rozpustili ve vzorkovacím SDS pufru (2díly vzorku a 1díl vzorkovacího pufru) a povařili 5 minut při 95°C. Doplnili jsme hladiny jednotlivých pufrů, aby zakrývaly elektrody, a aparaturu jsme zapojili ke zdroji. Elektroforéza probíhala 57 minut (200V, 47mA). Po ukončení elektroforetického dělení jsme gel vyjmuli ze skel, promyli ho v transférovém pufru a přenesli ho do blotovacího přístroje.

3.12.3.2 Blotování a barvení gelu

PVDF blotovací membránu jsme aktivovali v methanolu a nechali jsme ji 20 minut promývat v transférovém pufru. Poté jsme ji vyjmuli a přenesli do blotovacího přístroje. Do blotovacího přístroje jsme položili jednotlivé vrstvy materiálu v tomto pořadí – v transférovém pufru navlhčené filtrační papíry, aktivovaná PVDF blotovací membrána, gel, navlhčené filtrační papíry. Přístroj jsme připojili k elektrickému zdroji a nechali jsme proces přenosu na membránu probíhat 20 minut (0,17A, 11V). Po blotování jsme membránu promyli vodou a usušili.

Gel jsme omyli vodou, ponořili jsme ho na 15 minut do barvicího roztoku pro rychlé barvení Coomassie Blue a následně jsme ho umístili na 30 minut do

odbarvovacího roztoku. Pro účely skladování jsme obarvený gel zataвили do fólie s vodou.

3.12.3.3 *Imunodetekce a barvení blotovací membrány*

Membránu jsme rozdělili podle proteinového standardu v místech nad 25kDa. Poté jsme ji ponořili postupně na 1 minutu do methanolu, na 10 minut do TBS pufru a na 1 hodinu blokování do 5% roztoku mléka. Na příslušné části membrány jsme po blokování nanесли odpovídající roztok primární protilátky v roztoku 5% mléka a inkubovali jsme přes noc při 4°C. Druhý den jsme roztok primární protilátky slili a membránu jsme umístili do Falkonových zkumavek vrstvou s proteiny směrem dovnitř. Na rotačním inkubátoru jsme membrány ve zkumavkách promývali 6krát za sebou 10ml roztokem 0,05% TBST v intervalech po 5 minutách. Po ukončení promývání jsme membrány inkubovali 1 hodinu s 5 ml roztoku sekundární protilátky. Následně jsme opět promývali 6krát za sebou 10ml roztokem 0,05% TBST v intervalech po 9 minutách a 1krát 5 minut v roztoku TBS. Po ukončení promývání jsme na každou půlku membrány dali na 1 minutu chemiluminiscenční roztok, membránu jsme poté osušili a položili do desek pro vyvolávání RTG filmů. V temné komoře jsme nechali osvítit RTG film (doba dle potřeby) a pomocí automatu, který obsahuje lázeň s vývojkou a ustalovačem, jsme vyvolali osvícené RTG filmy. U získaných snímků jsme hodnotili přítomnost pruhů v oblasti 23kDa pro IgG, 57,8kDa pro IgB a 38,7kDa pro protein FTT1103.

Membrány jsme po detekci opět aktivovali v roztoku methanolu, promyli jsme ji vodou a nakonec obarvili pomocí roztoku pro barvení stříbřením po dobu 1 minuty. Obarvené membrány jsme nechali odbarvit v destilované vodě a usušili jsme ji.

Tabulka 10. Schéma nanesených vzorků na 15 jamkový 12% gel určený pro Western blot

Jamka	Western blot VJ081017		Western blot VJ090320	
	vzorek	Množství naneseného proteinu (µg)	vzorek	Množství naneseného proteinu (µg)
1	-	-	-	-
2	1	14,4	22	5
3	2	15	24	6,3
4	5	15	25	6
5	3	14,4	23	7,2
6	4	15	24	3
7	1	3,1	25	3
8	2	3	23	3
9	5	3	15	7,7
10	3	3	14	8,8
11	4	3	13	11,7
12	26	10µl son. vzor.	11	50 µl son. vzor.
13	27	20µl son. vzor.	Protein. standard	12µg
14	Protein. standard	12µg	-	-
15	-	-	-	-

Pozn. U vzorků, kde nebyla stanovena koncentrace, je uveden nanášený objem původního vzorku.

3.13. Hmotnostní spektrometrie a zpracování dat

3.13.1. Použitý materiál

- Odsolené odpařené vzorky

3.13.2. Použité roztoky

- Zásobní roztok A
(2% ACN, 0,1% kyselina mravenčí, 97,9% deionizovaná voda)
- Zásobní roztok B
(80% ACN, 0,1% kyselina mravenčí, 19,9% deionizovaná voda)

3.13.3. Postup

Odsolené a odpařené vzorky jsme rozpustili v roztoku A dle tabulky 11. Rozpuštěné vzorky jsme dále analyzovali na tandemovém hmotnostním spektrometru, který byl propojen se systémem pro kapalinovou chromatografii. Vzorky byly přístrojem dávkovány do mobilní fáze (její složení závisí na poměru roztoků A a B) systému kapalinové chromatografie. Na předkoloně byly vzorky odsoleny a zakoncentrovány a následně separovány na koloně metodou gradientové eluce (Tab. 12). Separované vzorky byly prostřednictvím spojení přes nanosprej aplikovány do systému hmotnostních analyzátorů, kde byla sbírána data v závislosti na probíhající analýze. Naskenovaná data z průběhu analýzy byla zpracována v programu MassLynx 4.0, který umožnil zpětné odečtení dat, jejich vyhlazení a centrování. Výsledný pkl formát dat byl porovnán proti databázi 8 genomů *Francisella tularensis* za použití programu Phenix 2.5.11. Pro vyhodnocování jsme zvolili parametry uvedené v tabulce 13.

Tabulka 11. Dávkování roztoku A k odpařeným vzorkům a dávkované množství vzorku na hmotnostní analýzu

Vzorek	Objem roztoku A (μl)	Dávkované množství	
		Objem (μl)	Proteiny (μg)
6	15	6,4	-
7	10	6 z (4vz+5 roztok A)	-
8	25	6,4	-
9	25	6,4	-
10	25	6,4	-
11	12	4	-

12	25	6,4	-
13	12	4	4,8
14	12	4	3,7
15	12	4	3,2
16	25	5	2,5
17	25	5	3,9
18	25	5	3,4
19	25	5	4,5
20	25	5	3,6
21	25	5	5,0
22	12	4	1,9
23	12	4	9,1
24	12	4	4,2
25	12	4	2,3

Tabulka 12. Parametry metody gradientové eluce

Čas (min)	Výsledné % ACN v mobilní fázi	Průtok μl/min
0,10	5	5
5,00	5	5
8,00	10	5
120,00	35	5
125,00	90	5
138,00	90	5
140,00	5	5

Tabulka 13. Parametry pro vyhodnocování dat v programu Phenix

Kritérium	1. kolo	2. kolo
Náboj	2+,3+,4+	
Tolerovaná chyba	100ppm	150ppm
Enzym	Trypsin (KR)	Trypsin (KR)
Štěpící mód	Normální	Maximálně z jedné strany nespecificky štěpený
Maximální počet chybných štěpení	1	3

Minimální délka peptidu	6	6
Minimální z-skóre peptidu	5	5/4
p-hodnota peptidu	0,00001	0,0001
Minimální AC skóre	5	5
Modifikace Cys-CAM (+57 Da)	Fixovaný	Fixovaný
Modifikace Oxidace M (+16 Da) variabilní	meší než 4	menší než 2
Modifikace DEAMID (+1 Da) variabilní	-	menší než 4
Modifikace PYRR (-17 Da) variabilní	-	menší než 1
Turbo skóre	20% pokrytí 0,4Da (a,b,y)	-

- Pozn. Cys-CAM karbamidomethylace cysteinu
Oxidace M oxidace methioninu
DEAMID deamidace kyseliny glutamové a asparagové
PYRR vznik pyroglutamové kyseliny
AC-skóre součet nejlepších skóre pro validované peptidové sekvence
p-hodnota hodnota pravděpodobnosti peptidu

3.14. VÝSLEDKY

V této práci jsme provedli u vzorků infikovaných tkání získaných laserovou mikrodisekcí proteomickou analýzu s využitím hmotnostní spektrometrie.

Pomocí infekce buněk makrofágové linie J774 bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP, které jsme pozorovali fluorescenčním mikroskopem, jsme

ověřili možnost použití tohoto bakteriálního kmene pro vizualizaci bakterií v místě infekce *in vivo* . (Obr. 3).

Myši z linie Balb/c jsme infikovali intradermálně (5 jedinců) a subkutánně (5 jedinců). Po 14 dnech jsme z myší, které přežili, odebrali tkáň, jejichž označení je uvedeno v tabulce 2. Přítomnost bakteriální infekce v odebrané tkáni jsme potvrdili imunochemickým barvením tkáňových preparátů (Obr. 4, 6) a detekcí bakteriálních proteinů IgIB, IgIC a FTT1103 Western blotem (Obr.11, 12).

Pro proteomickou analýzu jsme zvolili tkáň kůže. Prostřednictvím fluorescenční mikroskopie jsme zhodnotili jednotlivé tkáňové řezy na membránových preparátech (Obr. 7) a poté jsme laserovou mikrodisekcí izolovali fluoreskující oblasti tkání (Obr. 8, 9, 10), u nichž jsme předpokládali přítomnost infekce. Vyřezané množství tkáně pro jednotlivé vzorky je uvedeno v tabulce 14. Po sonikaci jsme u vybraných laserem disektovaných vzorků a vzorků celých řezů stanovili spektrofotometricky koncentraci bílkoviny (Tab. 14), na jejímž základě jsme volili dávkování pro Western blot a hmotnostní analýzu.

Po tryptickém štěpení a odsolení vzorků jsme provedli hmotnostní analýzu na tandemovém hmotnostním spektrometru se systémem kapalinové chromatografie LC-ESI-QTOF. V programech MassLynx 4.0 a Phenix 2.5.11 jsme vyhodnotili data z hmotnostní analýzy. Identifikované peptidové sekvence a k nim přiřazené proteiny pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulkách 15-18. Hodnocení výsledků je podrobněji probráno v diskuzi.

3.15. Diskuze

Pro proteomickou analýzu infikovaných tkání jsme zvolili postup, který zahrnoval přípravu vzorku laserovou mikrodisekcí následovanou tryptickým štěpením a analýzu bakteriálních proteinů hmotnostní spektrometrií za použití LC-ESI-QTOF. Tento přístup jsme vybrali na základě některých studií^{115, 123, 149-152} a vzhledem k neuspokojivým výsledkům hmotnostní analýzy z předchozí

práce (nepublikovaná data), kdy byla proteomická analýza provedena s využitím SDS-PAGE. Dalším důvodem byla také snaha o kompatibilitu použitých činidel s hmotnostní spektrometrií, protože činidla běžně užívaná elektroforetickými metodami (např. SDS) znemožňují analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Důležitým krokem práce byla příprava tkáňových vzorků a jejich preparátů. Zvolením bakterie *Francisella tularensis* LVS/GFP detekovatelné fluorescenční mikroskopií jsme vyloučili případný negativní účinek barvení histologických preparátů na pozdější hmotnostní analýzu. Použití *Francisella tularensis* LVS/GFP jsme ověřovali dvěma pokusy *in vitro* na buňkách makrofágové linie J774. Jelikož první pokus neměl dostatečně vypovídající hodnotu, museli jsme pokus opakovat, přičemž dobu infekce a koncentraci bakterií (poměr bakterie : buňky J774) pro infekci jsme zvýšili. Na základě zřetelně rozpoznatelných infikovaných buněk J774 s pohlcenými fluoreskujícími bakteriemi (Obr. 3) jsme se rozhodli použít bakteriální kmen *Francisella tularensis* LVS/GFP pro infekci myší linie Balb/c.

Z infikovaných myší jsme odebrali sleziny, tkáň kůže a třísla z oblasti vpichu. K fixaci tkání jsme zvolili proces zamražení a roztok 70% ethanolu (pro preparáty) s cílem zamezit vlivu fixačních činidel na proteomickou analýzu. Pro účely analýzy jsme vybrali tkáň kůže z intradermální infekce. Tuto tkáň jsme zvolili z několika důvodů. Narozdíl od sleziny se dá již pouhým okem posoudit, zda jsou přítomny viditelné známky infekce (otevřený vřed). Kůže poskytuje také možnost vyřezávat větší oblasti buněk z tkáňových řezů než slezina, protože infekce se odehrává v úzké horní vrstvě tkáně. U sleziny jsou infikované oblasti (granulomy) menší a jsou rozesety v celé ploše tkáňového řezu. Dokladem jsou obrázky 4,6 imunochemického barvení preparátů, které jsme použili k ověření infekce v tkáni a k srovnání preparátů, jež byly hodnoceny fluorescenční mikroskopií pro účely LMD.

Použití fluorescence s LMD se ukázalo jako efektivní pro výběr infikovaných oblastí. Oblasti s předpokládanou infekcí vykazovali vyšší intenzitu fluorescence než infekcí nezasazená místa (Obr. 5, 7, 8, 9). Nevýhodou však

bylo, že s prodlužující dobou osvitů tkání se intenzita fluorescenčního záření snižovala. Skenováním tkáňových preparátů pomocí kamerového systému mikroskopu jsme tento problém částečně překonali.

Při laserové mikrodisekci jsme požadovanou tkáň vyřezávali tak, aby byla vystavena minimálnímu účinku UV laseru a nedocházelo k jejímu poškození. Přesto se v některých oblastech horních vrstev kůže nepodařilo okamžitě cílený úsek vyříznout a museli jsme ho vystavit procesu řezání několikrát, což mohlo vést k částečné degradaci tkáně v okolí řezu. Celkové plochy vyřezané laserovou mikrodisekci se pohybovali od 5mm² (zvoleno dle literatury)¹¹⁵ do 20mm², v závislosti na míře infekce tkání a počtu řezů na jednotlivých LMD membránách. Údaje pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce 14.

Dalším zásadním krokem byla úprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii. Laserem disektované vzorky a vzorky celých řezů jsme podrobili procesu sonikace. Kvalita homogenizace vzorku nebyla v některých případech dostatečná, což ovlivnilo výtěžek extrakce proteinů. Stanovením bílkoviny u vzorků jsme se přesvědčili o množství proteinů extrahovaném z tkáně do roztoku. U vzorku s označením CB jsme stanovili, že přibližně 7,48μg bílkoviny lze získat z 5mm² vyřezané tkáně kůže, což je v porovnání se studii méně (literatura udává přibližně 30μg bílkoviny na 5,5mm²)¹¹⁵. Z tabulky 14 je patrné, že poměr množství proteinů na plochu vyřezané tkáně je v zásadě zachován, ale u žádného LMD vzorku jsme nedosáhli podobného výtěžku proteinů, který udává literatura. Důvodem nízké extrakce proteinů do roztoku může být nejenom nedostatečná homogenizace vzorku, ale také struktura a složení tkáně kůže.

Znalosti o koncentraci bílkoviny jsme využili při dávkování vzorků u metody Western blot, která sloužila k ověření přítomnosti bakteriálních proteinů v extrakčním roztoku. Touto metodou jsme detekovali nejprve proteiny IgIB a IgIC (Obr. 11). IgIB jsme prokázali ve všech vzorcích celých řezů a IgIC ve dvou vzorcích celých řezů. Z výsledků je patrné, že exprese IgIC byla nižší než IgIB. U LMD vzorků jsme nezaznamenali žádný pozitivní výsledek, což bylo

pravděpodobně způsobeno nízkou nanáškou. Jelikož geny pro proteiny IgIB a IgIC jsou z jednoho lokusu, což může poukazovat na vzájemnou závislost v jejich expresi, rozhodli jsme se v dalším Western blotu detekovat místo IgIB hypotetický protein FTT1103, vyskytující se na jiném lokusu (Obr. 12). Při detekci hypotetického proteinu FTT1103 jsme zaznamenali pozitivní výsledek ve všech vzorcích celých řezů a LMD vzorcích. U detekce IgIC jsme získali pozitivní výsledek jen u dvou LMD vzorků a dvou vzorků celých řezů. Hodnocením obou Western blotů jsme došli k závěru, že je vhodnější použít k účelům detekce bakteriálních proteinů *Francisella tularensis* hypotetický protein FTT1103 nebo IgIB v porovnání s IgIC.

Sonikované vzorky jsme podrobili procesům redukce, alkylace, štěpení trypsinem a odsolení. Podobné postupy jsme vyhledali ve studiích,^{115, 123, 149-152} které se zabývali proteomickou analýzou ve spojení s hmotnostní spektrometrií, a upravili jsme je pro naše potřeby. Redukční činidlo TCEP jsme přidávali v takovém množství, aby byla jeho výsledná koncentrace ve vzorku přibližně 5mM. V trojnásobném poměru k TCEP jsme přidali alkylační činidlo IAA a nakonec jsme do vzorku dávali roztok trypsinu, aby konečná koncentrace ve vzorku byla 2 nebo 4ng/μl. Po štěpení jsme vzorek odsolili a rozpustili v roztoku pro hmotnostní analýzu podle znalosti obsahu bílkoviny. Zvolené podmínky jsme však nepovažovali za zcela ideální. Bohužel z časových důvodů nebylo možné tuto část práce optimalizovat dle našich představ. Další práce by se mohly zaměřit na některé z následujících bodů s cílem omezit ztráty analyzovaného materiálu a zlepšit odezvu při hmotnostní analýze. Zvýšení výtěžku proteinů z disektovaných oblastí by jsme mohli docílit lepší homogenizací vzorku, nalezením vhodného poměru objemu extrakčního roztoku na mm² vyřezané tkáně nebo zkusit jiné extrakční roztoky (např. s močovinou). Změnou alkylačního činidla nebo přidávaného množství IAA by se mohl najít optimální stav, kdy nedochází na aminokyselinách peptidu k nežádoucím alkylačním reakcím (např. při nadbytku IAA může docházet k alkylaci NH₂ skupiny na N-terminálním konci, karboxylové skupiny na C-terminálním konci a k alkylaci některých aminokyselin peptidu)¹⁵⁴, které někdy

vedou až ke ztrátě náboje peptidu a tudíž i k znemožnění detekce na LC-ESI-QTOF.

Analýzu hmotnostní spektrometrií jsme provedli u 20 vzorků (z toho 4 vzorky celých řezů). V těchto vzorcích jsme určili 34 bakteriálních proteinů (32 u LMD vzorků, 4 u vzorků celých řezů) na základě identifikace 52 peptidových sekvencí (48 u LMD vzorků, 6 u vzorků celých řezů). Celkové výsledky hmotnostní spektrometrie jsou zaznamenány v tabulce 15 a 16. Podrobnější výsledky pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulkách 17 a 18, kde je zaznamenán název bakteriálního proteinu s jeho označením (Tab. 17) a konkrétní identifikované sekvence peptidů, k nimž byl bakteriální protein přiřazen (Tab. 18).

Pomocí LC-ESI-QTOF se nám podařilo určit proteiny unikátní, vyskytující se v jediném vzorku, a proteiny objevující se ve více vzorcích, které poukazovaly na stejné chování bakterií v tkáních. Příkladem proteinu identifikovaného ve více vzorcích je hypotetický protein FTW0967, který je znám také pod názvem „pilF“. Ze studií bylo zjištěno, že delecí genu pro pilF u *Francisella tularensis* LVS dochází ke ztrátě některých povrchových struktur, což má za následek snížení virulence bakterie při intradermální infekci myši.¹⁵³ Také přítomnost hypotetického proteinu FTW0967 v našich vzorcích poukazuje na jeho důležitost při infekci intradermální cestou.

Vzhledem k počtu identifikovaných proteinů (bakteriálních i myších) u LMD vzorků a vzorků celých řezů se použití metody LMD pro proteomickou analýzu infikovaných tkání jeví jako vhodné. Z časových důvodů však nebylo možné provést více měření, která by výhodu spojení LMD a LC-ESI-QTOF pro účely identifikace bakteriálních proteinů potvrdila. Přestože jsou výsledky z našeho hlediska uspokojující, zvolením jiného přístroje pro hmotnostní spektrometrii, například zapojení s iontovou pastí, by se dalo docílit vyšší citlivosti měření, což by vedlo v konečném důsledku k identifikaci většího počtu proteinů.

Aby bylo dosaženo podobných výsledků jako ve studiích (konkrétně výtěžek proteinů a počet identifikovaných peptidů a proteinů), je nezbytné jednotlivé kroky přípravy vzorku pro proteomickou analýzu v dalších pracích optimalizovat. V porovnání se studii se stále z pohledu celkového počtu identifikovaných proteinů dosahuje výrazně lepších výsledků jak s využitím LC-MS tak i s ještě více citlivější 2D-elektroforézou.^{115, 122,123, 149-152}

3.16. Závěr

V rámci této diplomové práce jsme provedli proteomickou analýzu infikovaných tkání kůže myši s využitím laserové mikrodisekce a tandemové hmotnostní spektrometrie. V celkovém počtu 16 LMD vzorků a 4 vzorků celých tkáňových řezů jsme identifikovali 52 sekvencí peptidů a k nim jsme přiřadili 34 bakteriálních proteinů.

Postupy přípravy vzorku pro LMD se nám podařily ve spojení s fluorescenční mikroskopií vhodně zvolit. Příprava vzorku pro hmotnostní analýzu se nám však nepodařila zcela optimalizovat, což by mělo být cílem dalších prací.

Přestože se spojení LMD s tandemovou hmotnostní spektrometrií konkrétně s LC-ESI-QTOF jeví jako vhodné pro proteomickou analýzu infikovaných tkání zaměřenou na identifikaci bakteriálních proteinů, pro potvrzení nám chybí dostatečné množství naměřených dat, která z časových důvodů nebyla provedena.

4. LITERATURA

1. SJOSTEDT, A. Family XVII. *Francisellaceae*, Genus I. *Francisella*. V knize Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. **Volume 2**. (D.J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley and G.M. Garrity, Eds.): Springer, New York, 2005, str. 200-210,
2. SPLETTSTOESSER, W.D., *et al.* Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health., 2005, **52**(6), 249-261
3. McLENDON, M.K., *et al.* *Francisella tularensis*: Taxonomy, genetics and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. Annu. Rev. Microbiol. 2006, **60**, 60-167
4. FRANCIS, E. Deer-fly fever-a disease of hitherto unknown etiology. Public Health Rep., 1919, **34**, 2061-2062
5. RITTER, D.B., GERLOFF, R.K. Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus *Pasteurella*. J. Bacteriol., 1966, **92**(6), 1838-1839
6. SJOSTEDT, A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, **1105**, 1-29
7. FORSMAN, M., *et al.* Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. Int.J.Syst. Bacteriol., 1994, **44**(1), 38-46
8. KEIN, P., *et al.* Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, **1105**, 30-66
9. FARLOW, J., *et al.* *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J. Clin. Microbiol., 2001, **39**(9), 3189-92
10. JOHANSSON, A. Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. J. Bacteriol., 2004, **186**(17), 5808-5818

11. WHIPP, M.J. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. J. Med. Microbiol., 2003, **52**(Pt9), 839-842
12. TARNVIK, A., BERGLUND, L. Tularaemia. Eur. Respir. J., 2003, **21**(2), 361-373
13. OYSTON, P.C.F., *et al.* Tularaemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*, Nat. rev. Microbiol., 2004, **2**(12), 967-978
14. KARADENIZLI, A. Outbreak of tularaemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey. Scand. J. Infect. Dis., 2005, **37**, 712-716
15. PEREZ-CASTRILLON, J.L. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. Clin. Infect. Dis., 2001, **33**(4), 573-576
16. REINTJES, R. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg. Infect. Dis., 2002, **8**(1), 69-73
17. ABD, H., *et al.* Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl. Environ. Microbiol., 2003, **69**(1), 600-606
18. LAURIANO, C.M. MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, **101**(12), 4246-4249
19. VINOGRADOV, E., *et al.* Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 2002, **269**(24), 6112-6118
20. BARKER, J.R., KLOSE, K.E. Molecular and Genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, **1105**, 138-159
21. SANDSTROM, G., *et al.* Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. FEMS Microbiol. Immunol., 1992, **5**(4), 201-210
22. ANCUTA, P., *et al.* Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. Infect. Immun., 1996, **64**(6), 2041-2046

23. DREISBACH, V.C., *et al.* Purified lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) induces protective immunity against LVS infection that requires B cells and gamma interferon. *Infect Immun.*, 2000, **68**(4), 1988-96
24. COWLEY, S.C., *et al.* Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol. Microbiol.*, 1996, **20**(4), 867-874
25. COLE, L.E., *et al.* Immunologic consequences of *Francisella tularensis* live vaccine strain infection: role of the innate immune response in infection and immunity. *J. Immunol.*, 2006, **176**(11), 6888-6899
26. HAJJAR, A.M., *et al.* Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. *Infect. Immun.*, 2006, **74**(12), 6730-6738
27. BARKER, J.H., *et al.* Basis for the failure of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to prime human polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 2006, **74**(6), 3277-3284
28. SANDSTROM, G., *et al.* A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocyte. *Infect. Immun.*, 1988, **56**(5), 1194-1202
29. GIL, H., *et al.* Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 2004, **72**, 3042-47
30. LARSSON, P., *et al.* The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.*, 2005, **37**(2), 153-59
31. HAGER, A.J., *et al.* Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol. Microbiol.*, 2006, **62**(1), 227-237
32. BURROWS, L.L. Weapons of mass retraction. *Mol. Microbiol.*, 2005, **57**(4), 878-88
33. CHEN, I., DUBNAU, D. DNA transport during transformation. *Front. Biosci.*, 2003, **8**, 544-56

34. NUDLEMAN, E., KAISER, D. Pulling together with type IV pili. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **7**(1-2), 52-62
35. ERICSSON, M., et al. Long-lasting recall response of CD4⁺ and CD8⁺ αβ T cells, but not γδ T cells, to heat shock proteins of *Francisella tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2001, **33**(2), 145-152
36. KORONAKIS, V., et al. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, **73**, 467-489
37. GIL, H., et al. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 12897-12902
38. REILLY, T.J., et al. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**(18), 10973-10983
39. MOHAPATRA, N.P., et al. AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infect. Immun.*, 2007, **75**(1), 390-396
40. BARKER, J.R., KLOSE, K.E. Molecular and Genetic basis of pathogenesis in *Francisella tularensis*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 138-159
41. DENG, K., et al. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect. Immun.*, 2006, **74**(7), 4224-4236
42. DE BRUIN, O.M., et al. The *Francisella* pathogenicity island protein IgIA localizes to the bacterial cytoplasm and is needed for intracellular growth. *BMC Microbiol.*, 2007, **7**, 1
43. TWINE, S., et al. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect. Immun.*, 2005, **73**(12), 8345-8352
44. TITBALL, R.W., PETROSINO, J.F. *Francisella tularensis* genomics and Proteomics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 98-121
45. CONLAN, J.W., OYSTON, P.C.F. Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 325-350

46. GRAY, C.G., *et al.* The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. FEMS Microbiol. Lett., 2002, **215**(1), 53-6
47. BAKSHI, C.S., *et al.* Superoxide dismutase B gene (sodB)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. J. Bacteriol., 2006, **188**(17), 6443-6448
48. McDONALD, M.K., *et al.* Temperature-sensitive lesions in the *Francisella novicida* valA gene cloned into an Escherichia coli MsbA lpxK mutant affecting deoxycholate resistance and lipopolysaccharide assembly at the restrictive temperature. J. Bacteriol., 1997, **179**(24), 7638-7643
49. RASMUSSEN, J.W., *et al.* Mac-1⁺ cells are the predominant subset in the early hepatic lesions of mice infected with *Francisella tularensis*. Infect. Immun., 2006, **74**(12), 6590-6598
50. CONLAN, J.W., CHEN, W., SHEN, H. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. Microb. Pathog., 2003, **34**(5), 239-248
51. QIN, A., MANN, B.J.. Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* tularensis strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line Hep G2. BMC Microbiol., 2006, **6**, 69
52. HALL, J.D., *et al.* *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells in vitro and in vivo following inhalation. Infect. Immun., 2007, **75**(2), 1034-1039
53. CLEMENTS, D.L., *et al.* *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect. Immun., 2005, **73**(9), 5892-902
54. SCHULERT, G., ALLEN, L.-A H. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. J. Leukoc. Biol., 2006, **80**(3), 563-571
55. PIERINI, L.M. Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors. Cell. Microbiol., 2006, **8**(8), 1361-1370

56. CLEMENS, D.L., HORWITZ, M.A. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 160-186
57. SANTIC, M., *et al.* *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol.*, 2006, **14**(1), 37-44
58. CLEMENS, D.L., *et al.* Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect. Immun.*, 2004, **72**(6), 3204-17
59. GOLOVLIOV, I., *et al.* An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect. Immun.*, 2003, **71**(10), 5940-50
60. SANTIC, M., *et al.* Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- γ . *Cell. Microbiol.*, 2005, **7**(7), 957-67
61. CHECROUN, C., *et al.* Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**(39), 14578-14583
62. LAI, X.H., *et al.* *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect. Immun.*, 2001, **69**(7), 4691-94
63. LAI, X.H., *et al.* Expression of IgIC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb. Pathog.*, 2004, **37**(5), 225-30
64. LAI, X.H., SJOSTEDT, A. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*- induced apoptosis in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003, **71**(8), 4642-46
65. MARIATHASAN, S., *et al.* Innate immunity against *Francisella tularensis* is dependent on the ASC/caspase-1 axis. *J. Exp. Med.*, 2005, **202**(8), 1043-49

66. WEISS, D.S., *et al.* *Francisella tularensis*: Activation of the inflammasome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 219-237
67. BEN NASR, A., *et al.* Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11C/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **80**(4), 774-786
68. McCAFFREY, R.L., ALLEN, L.A. *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **80**(6), 1224-1230
69. WICKSTRUM, J.R., *et al.* Coactivating signals for the hepatic lymphocyte gamma interferon response to *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.*, 2007, **75**(3), 1335-1342
70. LOPEZ, M.C., *et al.* Early activation of NK cells after lung infection with the intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS. *Cell. Immunol.*, 2004, **232**(1-2), 75-85
71. LOEGERING, D.J., *et al.* *Francisella tularensis* LVS grown in macrophages has reduced ability to stimulate the secretion of inflammatory cytokines by macrophages in vitro. *Microb. Pathog.*, 2006, **41**(6), 218-225
72. FORESTAL, C.A., *et al.* *Francisella tularensis* selectively induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J. Immunol.*, 2003, **171**(5), 2563-2570
73. TELEPNEV, M., *et al.* *Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb. Pathog.*, 2005, **38**(5-6), 239-247
74. BOLGER, C.E., *et al.* The live vaccine strain of *Francisella tularensis* replicates in human and murine macrophages but induces only the human cells to secrete proinflammatory cytokines. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, **77**(6), 893-897
75. GAVRILIN, M.A., *et al.* Internalization and phagosome escape required for *Francisella* to induce human monocyte IL-1 beta processing and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**(1), 141-146

76. LINDGREN, H., *et al.* The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages. *Microbes Infect.*, 2005, **7**(3), 467-475
77. LINDGREN, H., *et al.* Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect. Immun.*, 2007, **75**(3), 1303-1309
78. POLSINELLI, T., *et al.* Nitric oxide-independent killing of *Francisella tularensis* by IFN- γ -stimulated murine alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 1994, **153**(3), 1238-1245
79. BOSIO, C.M., DOW, S.W. *Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells. *J. Immunol.*, 2005, **175**(10), 6792-6801
80. LI, H., NOOKALA, S., BINA, X.R. Innate immune response to *Francisella tularensis* is mediated by TLR2 and caspase-1 activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **80**(4), 766-773
81. KROCA, M., TARNVIK, A., SJOSTEDT, A. The proportion of circulating gamma/delta T cells increases after the first week of onset of tularaemia and remains elevated for more than a year. *Clin. Exp. Immunol.*, 2000, **120**(2), 280-284
82. COWLEY, S.C., ELKINS, K.L. Multiple T cell subsets control *Francisella tularensis* LVS intracellular growth without stimulation through macrophage interferon gamma receptors. *J. Exp. Med.*, 2003, **198**, 379-389
83. COWLEY, S.C., *et al.* CD4⁺CD8⁻ T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.*, 2005, **202**(2), 309-319
84. SUMIDA, T. Predominant expansion of V γ 9/V δ 2 T cells in a tularemia patient. *Infect. Immun.*, 1992, **60**(6), 2554-2558
85. CONLAN, J.W., *et al.* CD4⁺ and CD8⁻ T-cell-dependent and -independent host defence mechanisms can operate to control and resolve primary and secondary *Francisella tularensis* LVS infection in mice. *Infect. Immun.*, 1994, **62**(12), 5603-5607
86. TARNVIK, A., CHU, M.C. New Approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2007, **1105**, 378-404

87. SPLETTSTOESSER, W.D., et al. Diagnostic procedures in tularaemia with special focus on molecular and immunological techniques; J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health, 2005, **52**(6), 249-261
88. JOHANSSON, A., FORSMAN, M., SJOSTEDT, A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. APMIS, 2004, **112**(11-12), 898-907
89. ENDERLIN, G., et al. Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. Clin. Infect. Dis., 1994, **19**(1), 42-47
90. SCHAAD, U.B., SALAM, M.A., AUJARD, Y. Use of fluoroquinolones in pediatrics: consensus report of an International Society of Chemotherapy commission. Pediatr. Infect. Dis. J., 1995, **14**(7), 1-9
91. JOHANSSON, A., et al. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. Pediatr. Infect. Dis. J., 2000, **19**(5), 449-453
92. CROSS, J.T., JACOBS, R.F. Tularemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone. Clin. Infect. Dis., 1993, **17**(6), 976-980
93. BHATNAGAR, N., et al. Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. J. Infect. Dis., 1994, **170**(4), 841-847
94. SCHAIBLE, U.E., et al. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. Adv. Immunol., 1999, **71**, 267-377
95. IKAHEIMO, I., et al. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. J. Antimicrob. Chemother., 2000, **46**(2), 287-290
96. GRIFFIN, K.F., et al. Francisella tularensis vaccines. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2007, **49**(3), 315-323
97. SJOSTEDT, A. Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. Curr. Opin. Microbiol., 2003, **6**(1), 66-71

98. PUKATZKI, S., *et al.* Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, **103**(5), 1528-1533
99. ELKINS, K.L., *et al.* Innate and adaptive immunity to *Francisella*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2007, **1105**, 284-324
100. ERICSSON, M., *et al.* Persistence of cell-mediated immunity and decline of humoral immunity to the intracellular bacterium *Francisella tularensis* 25 years after natural infection. J. Infect. Dis., 1994, **170**(1), 110-114
101. PAULSEN, D.F. Histologie a buněčná biologie, Praha: Nakladatelství H & H Vyšehradská, s r.o., 2004, str. 13-31, ISBN 80-7319-024-9
102. EGGELING, F., *et al.* Microdissecting the proteome. Proteomics., 2007, **7**(16), 2729-2737
103. REKHTER, M.D., CHEN, J. Molecular analysis of complex tissues is facilitated by laser capture microdissection. Cell. Biochem. Biophys., 2001, **35**(1), 103-113 2B
104. Udržalová Jana, Zpráva z odborné praxe, Univerzita Pardubice, 2007
105. ELIAS, J.M. Immunohistopathology. A practical approach to diagnosis. Chicago: American Society of Clinical pathologists Press, 1990, 46
106. GOMOLČÁK Pavol. Základy imunohistochemie v patologii. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1997, ISBN 80-7013-239
107. GUESDON, J.L., *et al.* The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, J. Histochem. Cytochem., 1979, **27**(8), 1131-1139
108. NADJI, M., MORALES, A.R. Immunoperoxidase techniques. I. Facts and artifacts. Am. J. Dermatopathol., 1986, **8**(1), 32-36
109. MURRAY, G.I., *et al.* An overview of laser microdissection technologies. Acta histonem., 2007, **109**(3), 171-176
110. LADANYI, A., *et al.* Laser microdissection in translational and clinical research. Cytometry A, 2006, **69**(9), 947-960
111. CURRAN, S., MURRAY, G.I. Tissue microdissection and its applications in pathology. Curr. Diagn. Pathol., 2002, **8**(3), 183-192

112. CURRAN, S., MCKAY, J.A., McLEOD, H.L., MURRAY G.I. Laser capture microscopy. *Mol. Pathol.*, 2000, **53**(2), 64-68
113. HOOPER, L.V. Laser microdissection: exploring host-bacterial encounters at the front lines. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, **7**(3), 290-295
114. DZIECHCIARKOVÁ, M., *et al.* Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz. *Klinická onkologie*, 2007, **20**(5), 323-329
115. ESPINA, V., *et al.* Laser-capture microdissection. *Nature Protocols*, 2006, **1**(2), 586-602
116. SIMONE, N.L., *et al.* Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.*, 1998, **14**(7), 272-276
117. THALHAMMER, S., *et al.* Laser microtools in cell biology and molecular medicine. *Laser Physics*, 2003, **13**(5), 681-691
118. SIRIVATANAUKSORN, Y., *et al.* Laser-assisted microdissection: applications in molecular pathology. *J. Pathol.*, 1999, **189**(2), 150-154
119. DOMAZET, B., *et al.* Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era: Targeting the genetic basis of cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2008, **1**(6), 475-488
120. FEND, F., RAFFELD, M. Laser capture microdissection in pathology. *J. Clin. Pathol.*, 2000, **53**(9), 666-672
121. CRAVEN, R.A., BANKS, R.E. Laser capture microdissection and proteomics: Possibilities and limitation. *Proteomics.*, 2001, **1**(10), 1200-1204
122. KONDO, T., HIROHASHI, S. Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat. Protoc.*, 2006, **1**(6), 2940-2947
123. WANG, Y., *et al.* Proteome analysis of microdissected tumor tissue using a capillary isoelectric focusing-based multidimensional separation platform coupled with ESI-tandem MS. *Anal. Chem.*, 2005, **77**(20), 6549-6556

124. GUTSTEIN, H.B., MORRIS, J.S. Laser capture sampling and analytical issues in proteomics. *Expert Rev. Proteomics*, 2007, **4**(5), 627-637
125. CHENG, Y., *et al.* Proteome analysis of human gastric cardia adenocarcinoma by laser capture microdissection. *BMC Cancer.*, 2007, **7**, 191
126. LY, L.H., *et al.* Microdissection of the cytokine milieu of pulmonary granulomas from tuberculous guinea pigs. *Cell. Microbiol.*, 2007, **9**(5), 1127-1136
127. BOHM, C., *et al.* Laser microdissection in CNS research. *DDT*, 2005, **10**(17), 1167-1174
128. CHMELÍK, J. Proteomický průvodce. *Chem. Listy*, 2005, **99**, 883-885
129. FIGEYS, D. Proteomics: The basic overview. In *industrial proteomics: Applications for biotechnology and pharmaceuticals*. Vydavatel John Willey & Sons, Inc., 2005, str. 1-62, ISBN 0-471-45714-0
130. CHO, W.C.S. Proteomics technologies and challenges. *Geno. Prot. Bioinfo.*, 2007, **5**(2), 77-85
131. CHALKLEY, R.J. *et al.* Bioinformatic methods to exploit mass spectrometric data for proteomic applications. *Methods Enzymol.*, 2005, **402**, 289-312
132. AEBERSOLD, R., GOODLETT, D.R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.*, 2001, **101**(2), 269-295
133. KOVÁŘOVÁ, H. Proteomika v postgenomové době. *Chem. Listy*, 2005, **99**, 886-889
134. SMITH, P.K., *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 1985, **150**(1), 76-85
135. LEE, T.D., SHIVELY, J.E. Enzymatic and chemical digestion of proteins for mass spectrometry. *Methods Enzymol.*, 1990, **193**, 361-374
136. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003, ISBN 80-86369-07-2

137. Kolektiv autorů. Vyšetřovací metody v klinické mikrobiologii a klinické imunologii. Hradec Králové: Vydavatel Střední zdravotnická škola a Vyšší zdravotnická škola, 2004, ISBN 80-903414-0-3
138. ROSELL, D.F., et al. Bioluminescence and chemiluminescence. *Methods Enzymol.*, 1978, 57, 409
139. BALDWIN, M.A. Mass Spectrometers for the analysis of biomolecules. *Methods Enzymol.*, 2005, **402**, 3-48
140. Kolektiv autorů. Vybrané kapitoly z molekulární patologie: Skripta pro studenty DSP Molekulární patologie. Hradec Králové: Univerzita obrany Fakulta vojenského zdravotnictví, 2008, ISBN 978-80-7231-329-7
141. ČEŠKOVÁ, P., et al. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: Možnosti a limitace. *Chem. Listy*, 2006, **100**(11), 974-979
142. GYGI, S.P., AEBERSOLD, R. Mass spectrometry and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**(5), 489-494
143. www.moleculardevices.com/pages/instruments/microgenomics.html, citováno 28.3.2009
144. www.cellrobotics.com, citováno 28.3.2009
145. www.molecular-machines.com, citováno 28.3.2009
146. www.leica-microsystems.com, citováno 28.3.2009
147. www.palm-microlaser.com/dasat, citováno 28.3.2009
148. www.eppendorf.com, citováno 28.3.2009
149. BAGNATO, C., et al. Proteomic analysis of human coronary atherosclerotic plaque: A feasibility study of direct tissue proteomics by liquid-chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, 2007, **6**(6), 1088-1102
150. MUSTAFA, D.A.N., et al. Identification of glioma neovascularisation-related proteins by using MALDI-FTMS and nano-LC fractionation to microdissected tumor vessels. *Mol. Cell. Proteomics*, 2007, **6**(7), 1147-1152

151. HAQQANI, A.S., *et al.* Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *FASEB J.*, 2005,**19**(13), 1809-1821
152. Al, J., *et al.* Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by laser capture microdissection. *Proteomics*, 2006, **6**(2), 538-546
153. CHAKRABORTY, S., *et al.* Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect. Immun.*, 2008, **76**(7), 2852-2861
154. BOJA, E.S., FALES, H.M. Overalkylation of protein digest with iodoacetamide. *Anal. Chem.*, 2001, **73**(15),3576-3582

5. PŘÍLOHA

Příloha 1: Obr. 1 a Obr. 2

Příloha 2: Obr. 3

Příloha 3: Obr. 4 a Obr. 5

Příloha 4: Obr. 6

Příloha 5: Obr. 7

Příloha 6: Obr. 8

Příloha 7: Obr. 9

Příloha 8: Obr. 10

Příloha 9: Tab. 14

Příloha 10: Obr. 11 a Obr. 12

Příloha 11: Tab. 15 a Tab. 16

Příloha 12: Tab. 17a

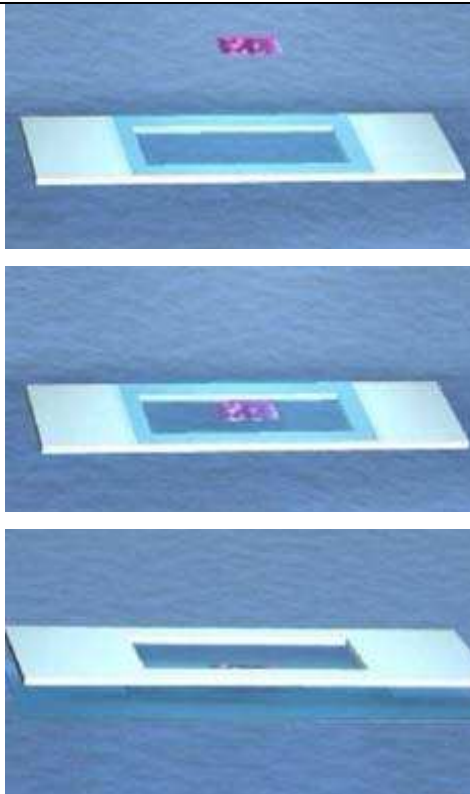
Příloha 13: Tab. 17b

Příloha 14: Tab. 17c

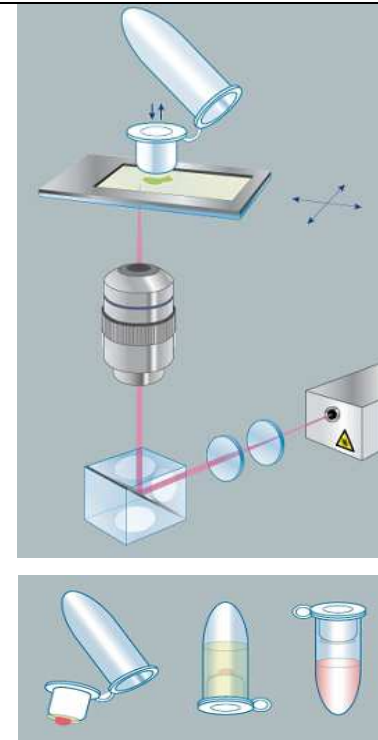
Příloha 15: Tab. 18a

Příloha 16: Tab. 18b

Příloha 17: Tab. 18c

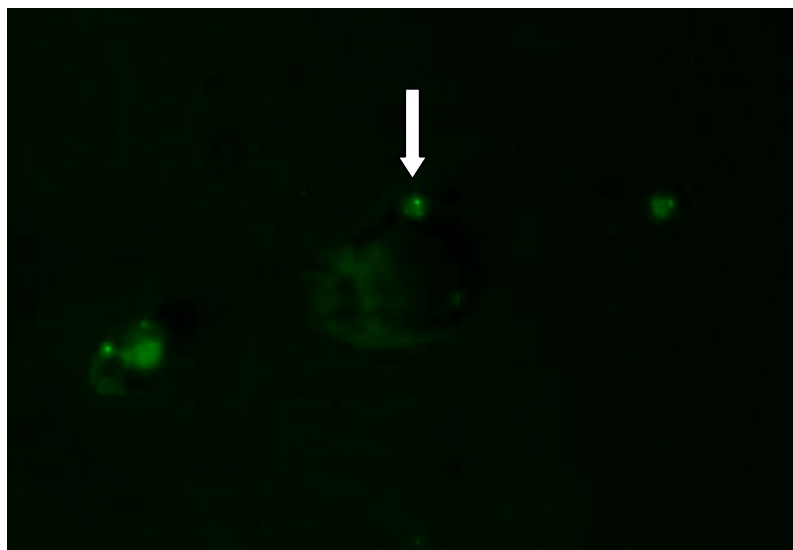


Obr.1 Umístění tkáňového řezu na membránu pro LMD a přikrytí tkáňového řezu na membráně podložním sklem.



Obr. 2 Laserová mikrodisekce se systémem LMM

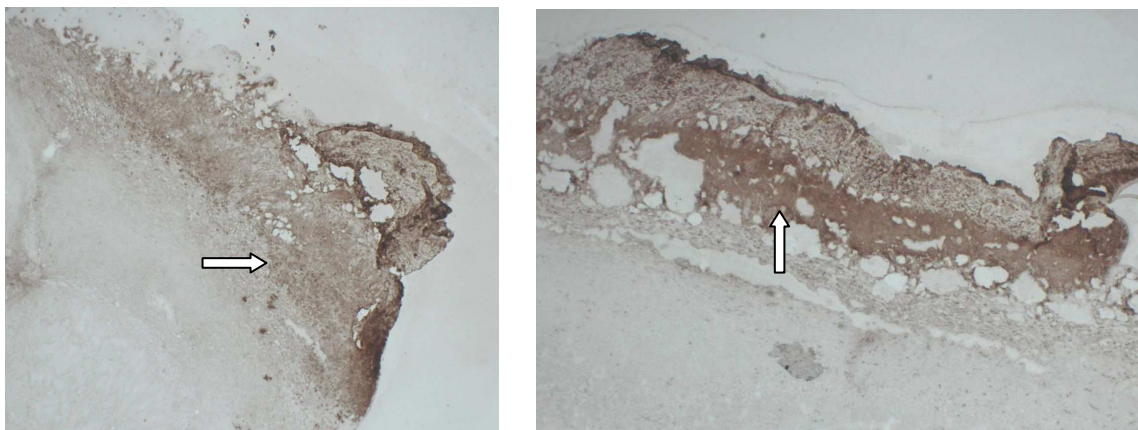
Laserový paprsek je usměřován optickou soustavou mikroskopu a je soustředěn na tkáň upevněnou na membráně pro LMD. Účinkem laseru je požadovaná tkáň vyříznuta a vyzvednuta víčkem zkumavky s adhezivním povrchem. Izolovaná tkáň se uzavře do zkumavky.



Obr. 3 Infekce buněk makrofágové linie J774 bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované pomocí fluorescenční mikroskopie.

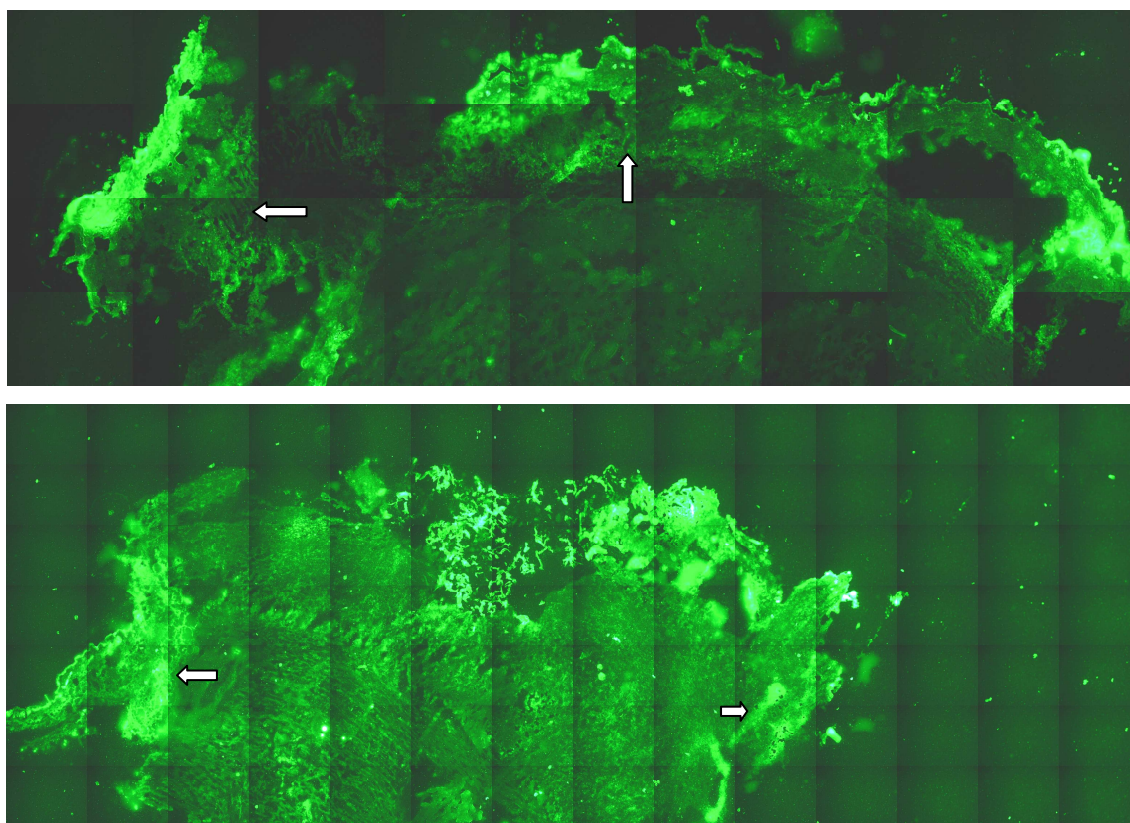
(MOI 500, zvětšení 400x, expoziční čas 1,5s pro fluorescenci).

Šipka označuje zeleně zářící bakterii pohlcenou makrofágem.

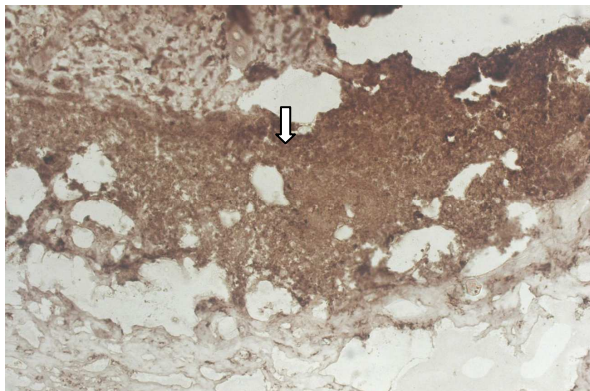


Obr. 4 Imunochemické barvení tkání kůže z intradermální infekce pomocí DAB chromogenu.

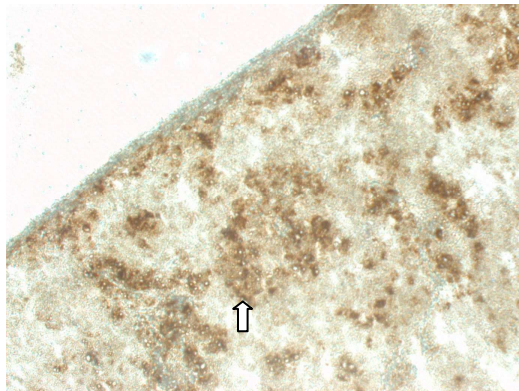
Tkáně kůže (vlevo 1KA, vpravo 2KA) se v infikovaných oblastech vyznačují hnědou barvou (značeno šipkami) Tyto preparáty byly hodnoceny světelnou mikroskopií při zvětšení 40x.



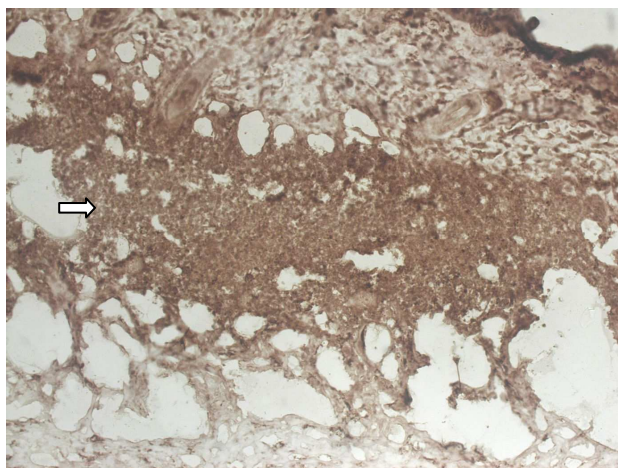
Obr. 5 Tkáňové řezy kůže (z intradermální infekce) infikované bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované fluorescenční mikroskopií. (expoziční čas 1,5s, skenováno při zvětšení 200x) Infikované oblasti se vyznačují intenzivní fluorescencí (silně zeleně zářící oblasti pozorované ve fluorescenčním mikroskopu, pro ilustraci jsou některé značené šipkami). Infekce je soustředěna hlavně do horních vrstev kůže. Na horním obrázku je tkáň kůže s označením 1KA vzorek 6, na dolním 2KA vzorek 9.



Kůže z i.d. infekce 2KA, zvětšení 200x



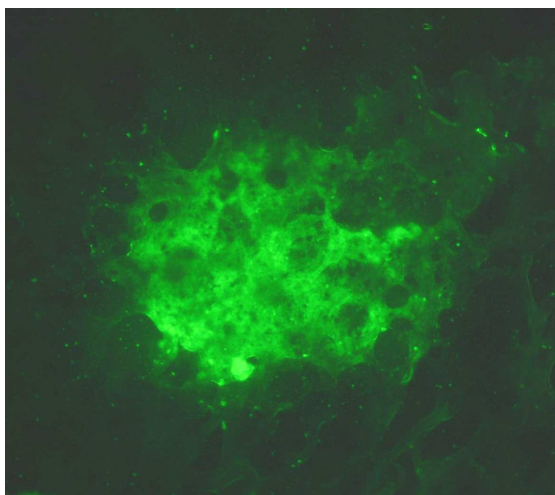
Slezina z s.c. infekce, zvětšení 200x



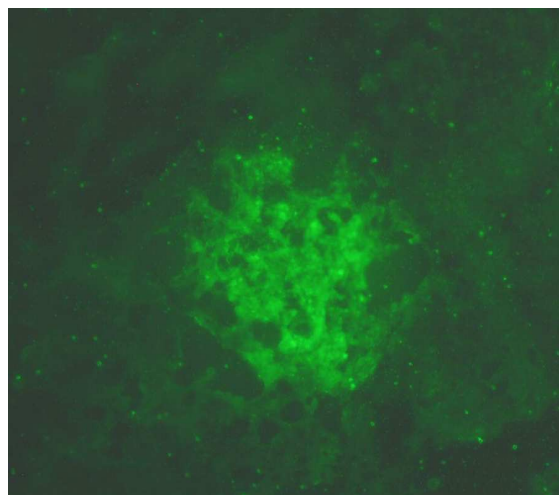
Kůže z i.d. infekce 2KA, zvětšení 200x

Obr. 6 Imunochemické barvení tkání kůže z intradermální infekce a sleziny z subkutání infekce pomocí DAB chromogenu.

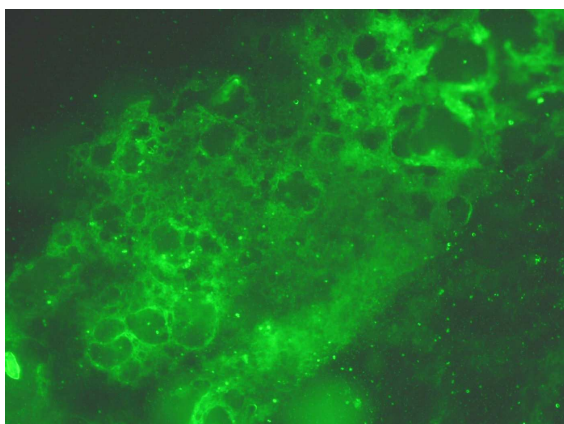
Tkáně kůže a sleziny se v infikovaných oblastech vyznačují hnědou barvou. U tkání kůže jsou patrné větší infikované plochy (granulomy) než u sleziny, kde jsou oblasti více rozptýlené. (značeno šipkami) Tyto preparáty byly hodnoceny světelnou mikroskopií při zvětšení 200x.



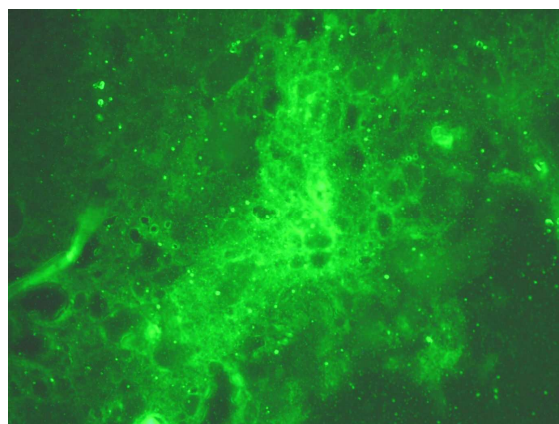
Kůže 1KA, zvětšení 200x



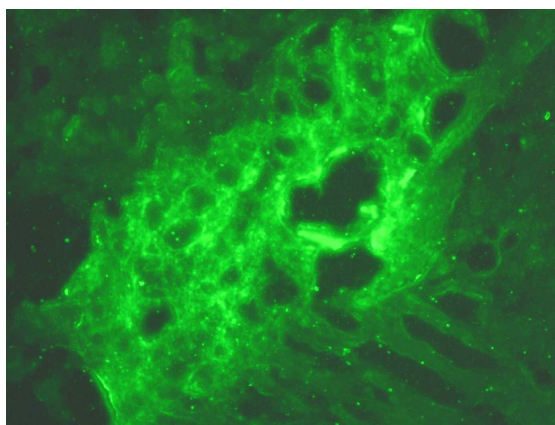
Kůže1KC, vzorek 11, zvětšení 200x



Kůže 1KA, vzorek 6, zvětšení 200x

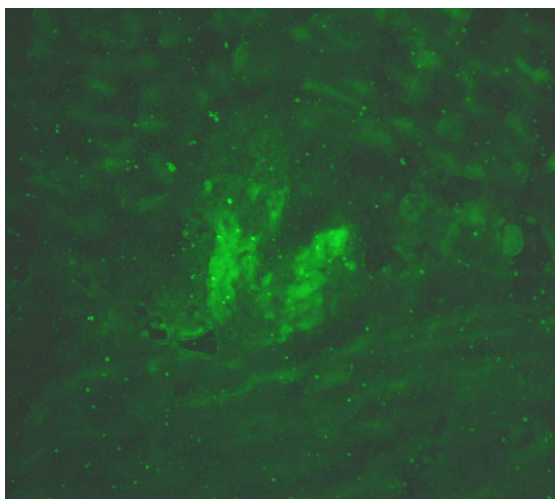


Kůže 2KB, vzorek 14, zvětšení 200x

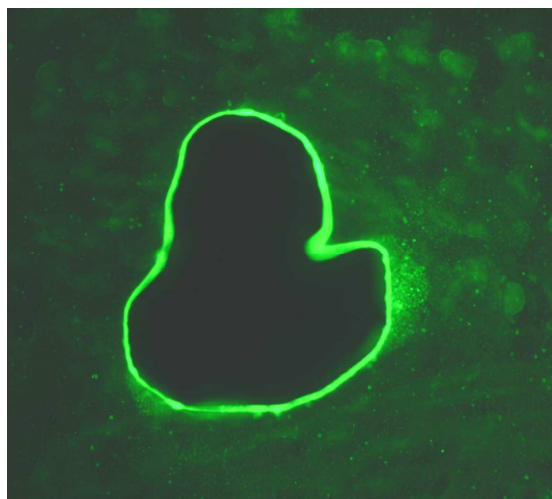


Kůže 2KA, vzorek 13, zvětšení 200x

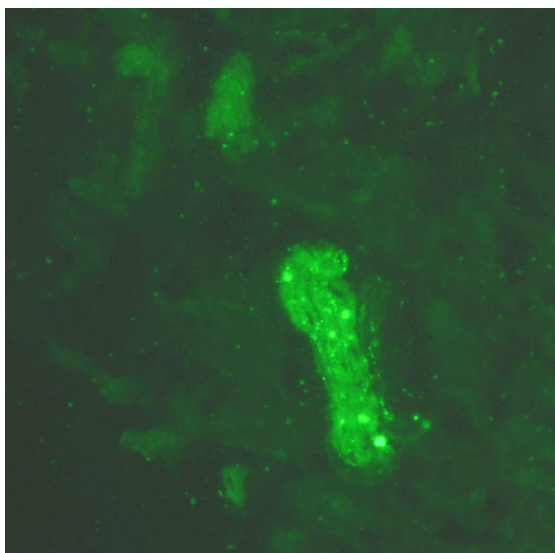
Obr. 7 Tkáňové řezy kůže (z intradermální infekce) infikované bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované fluorescenční mikroskopií. (expoziční čas 1,5s, zvětšení 200x) Infikované oblasti (granulomy) se vyznačují intenzivní fluorescencí (silně zeleně zářící oblasti pozorované ve fluorescenčním mikroskopu, pro ilustraci značené šipkami).



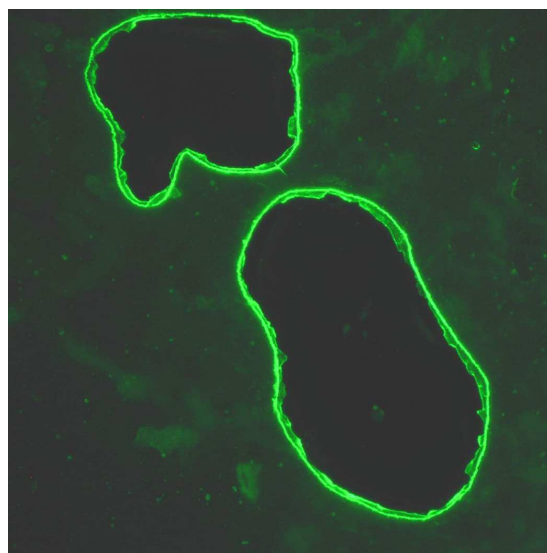
Vzorek 8, před LMD, zvětšení 200x



Vzorek 8, po LMD, zvětšení 200x



Vzorek 9, před LMD, zvětšení 200x

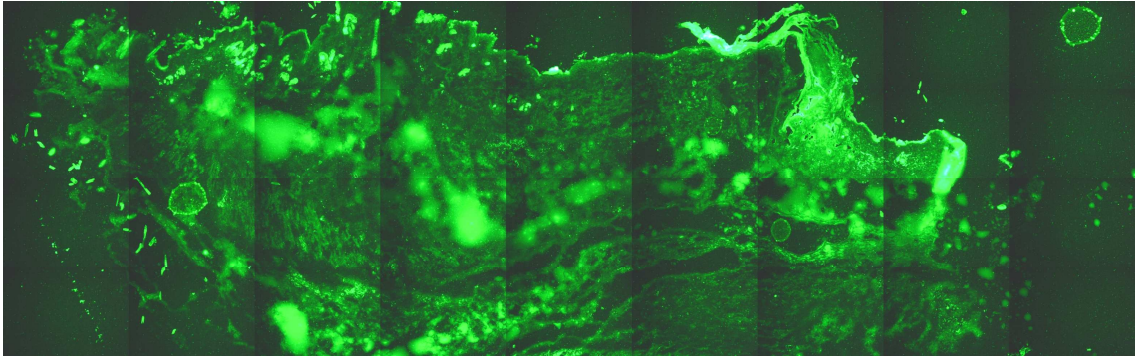


Vzorek 9, po LMD, zvětšení 200x

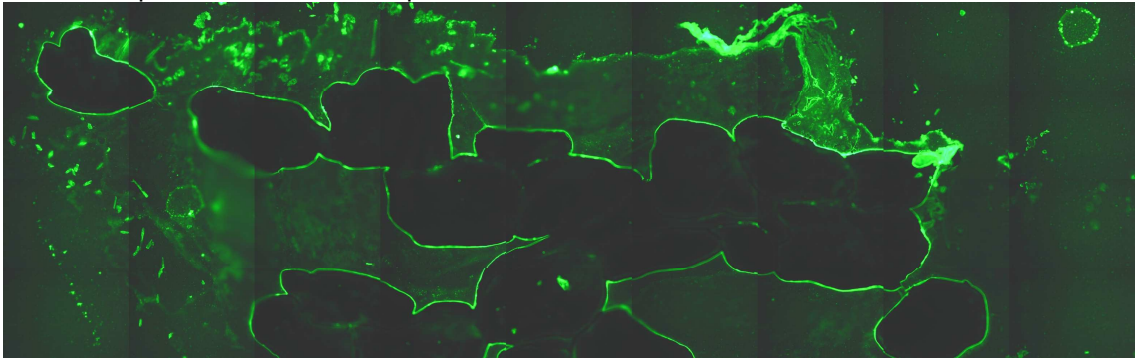
Obr. 8 Tkáňové řezy kůže (z intradermální infekce) infikované bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované fluorescenční mikroskopií před a po laserové mikrodisekci (LMD).

(expoziční čas 1,5s, zvětšení 200x)

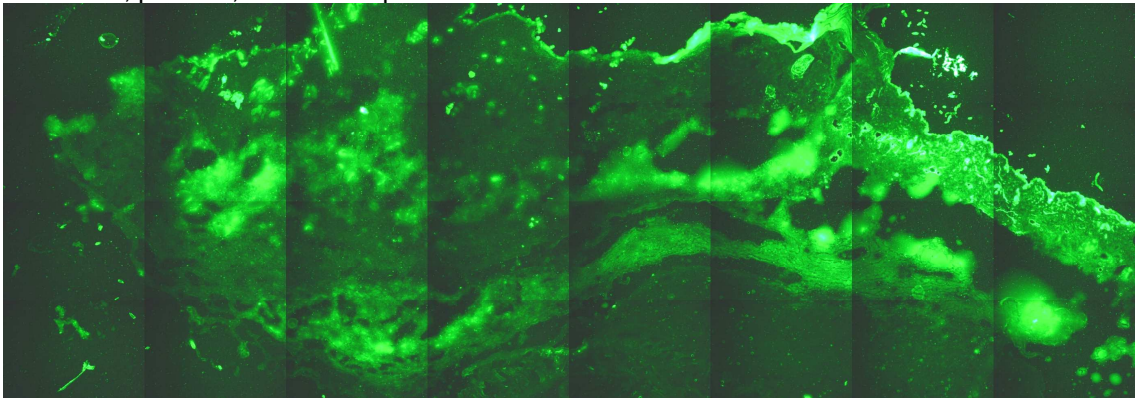
Infikované oblasti (granulomy) se vyznačují intenzivní fluorescencí (silně zeleně zářící oblasti pozorované ve fluorescenčním mikroskopu). Po vyřezání požadovaných úseků tkání jsou ve fluorescenčním mikroskopu vidět jasné zářící okraje řezu.



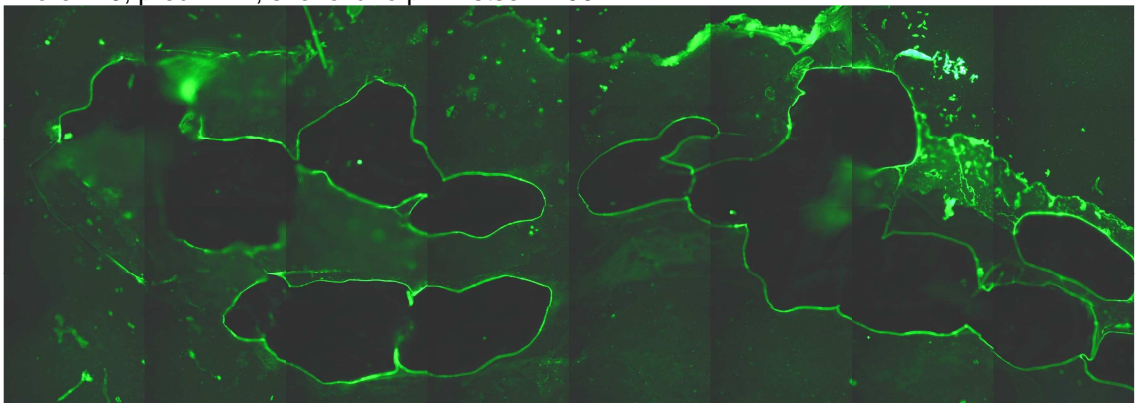
Vzorek 21, před LMD, skenováno při zvětšení 200x



Vzorek 21, po LMD, skenováno při zvětšení 200x

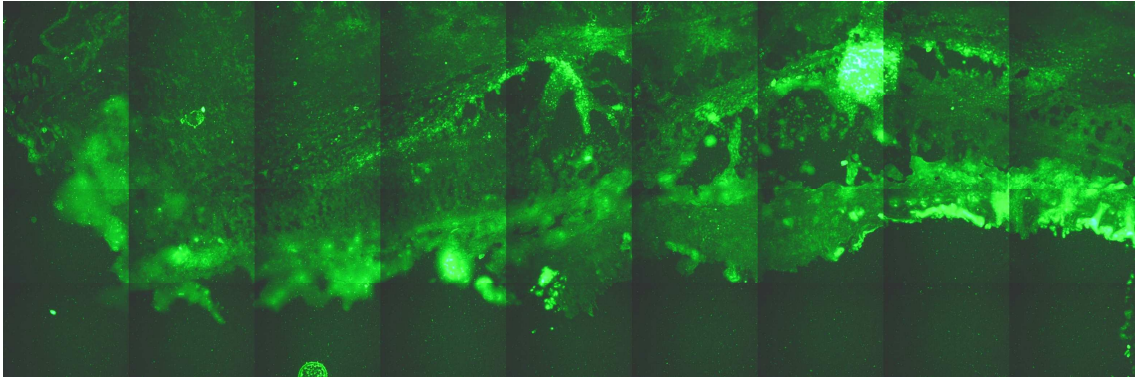


Vzorek 19, před LMD, skenováno při zvětšení 200x

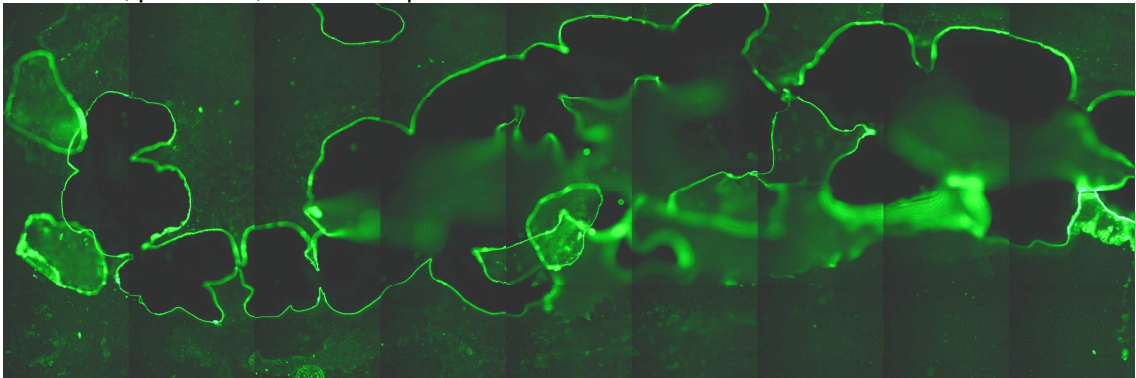


Vzorek 19, po LMD, skenováno při zvětšení 200x

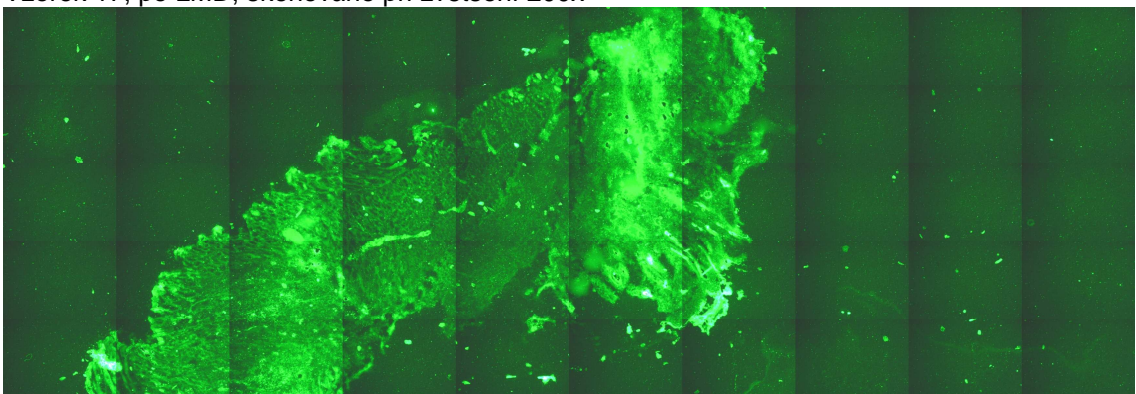
Obr. 9 Tkáňové řezy kůže (z intradermální infekce) infikované bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované fluorescenční mikroskopií před a po laserové mikrodisekci (LMD).



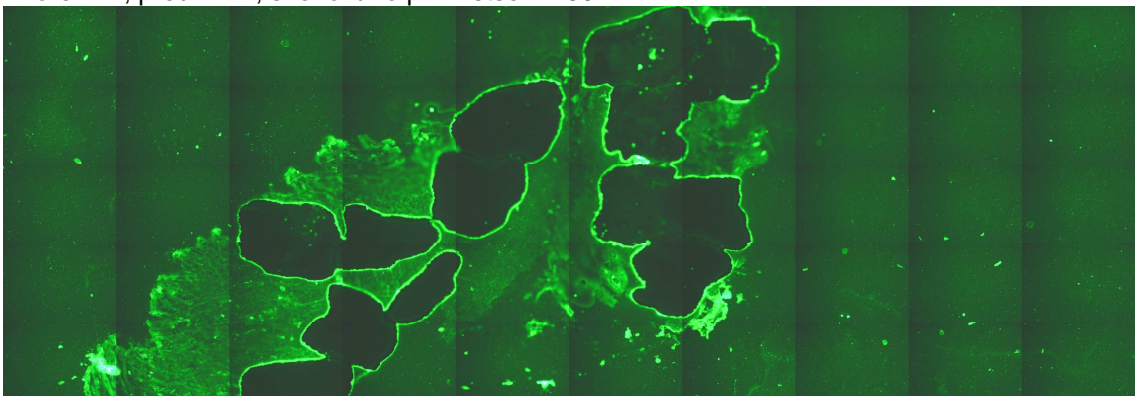
Vzorek 17, před LMD, skenováno při zvětšení 200x



Vzorek 17, po LMD, skenováno při zvětšení 200x



Vzorek 14, před LMD, skenováno při zvětšení 200x



Vzorek 14, před LMD, skenováno při zvětšení 200x

Obr. 10 Tkáňové řezy kůže (z intradermální infekce) infikované bakteriemi *Francisella tularensis* LVS/GFP pozorované fluorescenční mikroskopií před a po laserové mikrodisekci (LMD).

Tabulka 14. Tabulka vyřezaného množství tkáně u jednotlivých vzorků a výsledky ze stanovení bílkoviny

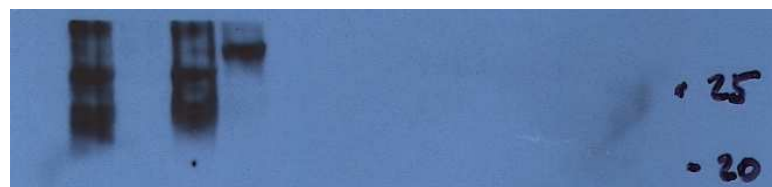
Vzorek č.	Druh tkáně	Vyřezaná plocha (mm ²)	Koncentrace bílkoviny (µg/µl)	Celková bílkovina ve vzorku (µg)
1	1KA	Celé řezy	0,67 (100)	67
2	2KA	Celé řezy	0,58 (100)	58
3	2KA	Celé řezy	0,84 (100)	84
4	1S	Celé řezy	2,12 (100)	212
5	4S	Celé řezy	1,48 (100)	148
6	1KA	5	N	N
7	1KA	5	N	N
8	1KB	10	N	N
9	2KA	10	N	N
10	2KB	10	N	N
11	1KC	7	N	N
12	1KC	8	N	N
13	2KA	20	0,29 (100)	29
14	2KB	12	0,22 (100)	22
15	1KB	10	0,19 (100)	19
16	1KB	10	0,14 (100)	14
17	1KC	10	0,22 (100)	22
18	1KC	10	0,19 (100)	19
19	2KA	18	0,25 (100)	25
20	2KB	17	0,20 (100)	20
21	2KA	20	0,28 (100)	28
22	1KB	Celé řezy	0,20 (60)	12
23	1KC	Celé řezy	0,72 (60)	43,2
24	2KA	Celé řezy	0,42 (60)	25,2
25	2KB	Celé řezy	0,30 (60)	18
26	1KA	5	N	N
27	2KA	5	N	N
CB	1KA	5	0,06	7,48

Pozn. N znamená, že stanovení nebylo provedeno.

Vzorek 1 2 5 3 4 1 2 5 3 4 26 27 standard



IgIB

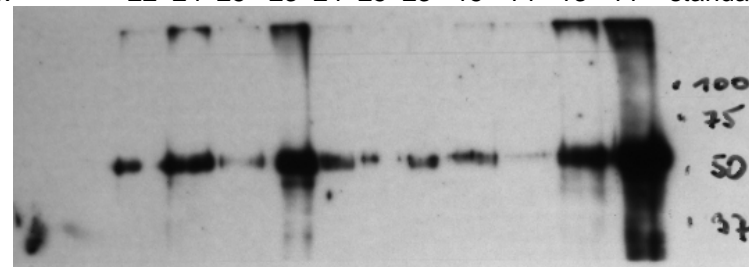


IgIC

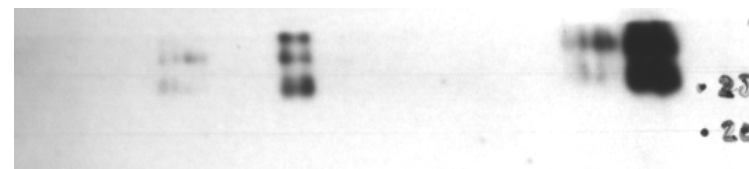
Obr. 11 Western blot VJ081017 (osvit 20 sekund)

Pozitivní výsledek (proužek v místě osvitu RTG filmu) je při detekci proteinu IgIB u vzorků 1, 2, 3, 4, 5 (vzorky celých řezů) a při detekci IgIC u vzorků 2,3,4. U vzorku 26, 27 (LMD vzorky) není protein IgIB ani IgIC detekován.

Vzorek 22 24 25 23 24 25 23 15 14 13 11 standard



FTT1103



IgIC

Obr. 12 Western blot VJ090320 (osvit 10 minut)

Pozitivní výsledek je při detekci hypotetického proteinu FTT1103 zaznamenán u všech vzorků (22-25 vzorky celých řezů; 11,13-15 LMD vzorky). Při detekci proteinu IgIC je pozitivní nález u vzorků 11, 13, 23 a 24.

Tabulka 15. Výsledky identifikace z hmotnostní spektrometrie

Vzorek č.	Identifikované bakteriální proteiny	Identifikované sekvence peptidů k bakteriálním proteinům	Identifikované myšič proteiny	Nanášené množství proteinů (μg)
6	11	14	138	-
7	8	17	108	-
8	5	7	83	-
9	4	4	77	-
10	2	2	71	-
11	2	2	26	-
12	3	3	70	-
13	2	2	22	4,8
14	2	2	35	3,7
15	1	2	43	3,2
16	3	3	95	2,5
17	4	7	85	3,9
18	4	5	76	3,4
19	4	7	98	4,5
20	5	6	109	3,6
21	3	3	111	5,0
22	0	0	9	1,9
23	2	2	36	9,1
24	2	4	56	4,2
25	3	3	50	2,3

Tabulka 16. Celkový počet identifikovaných proteinů a sekvencí peptidů ve vzorcích

Identifikace	LMD vzorky	Vzorky celých řezů	Všechny vzorky
Počet bakteriálních proteinů	32	4	34
Počet sekvencí peptidů k bakteriálním proteinům	48	6	52
Počet myšič proteinů	349	88	367

Tabulka 17a. Identifikované proteiny k jednotlivým vzorkům

Název proteinu	AC označení	vzorky č.
1-acylglycerol-3-phosphate acyltransferase	gi 187932253	6, 7, 12, 13, 21, 23, 25
30S ribosomal protein S7	gi 110669946	6
ABC superfamily ATP binding cassette transporter, ABC protein	gi 115315503	17
ABC transporter, ATP-binding protein	gi 110669812	7, 6, 8, 10, 12, 18
ABC-type nitrate/sulfonate/bicarbonate transport system, ATPase component	gi 118496765	19
adenine specific DNA methylase	gi 118498062	20, 15
ATp-dependent helicase	gi 110671029	6
ATP-dependent helicase HrpA	gi 115314469	8
beta-lactamase	gi 110670207	17, 18
cytochrome oxidase bd-II, subunit II	gi 110669738	11
DNA polymerase III, delta subunit	gi 134302695	14
DNA primase	gi 134301934	19

Tabulka 17b. Identifikované proteiny k jednotlivým vzorkům

Název proteinu	AC označení	vzorky č.
fatty acid desaturase	gi 134301357	9
glycine dehydrogenase (decarboxylating)	gi 115314378	7
HrpA-like helicase	gi 118498004	7, 8
Hypothetical lipoprotein	gi 110670934	6
hypothetical protein FTA_1823	gi 156503189	7, 13,16, 23,24, 25
hypothetical protein FTF0016	gi 110669666	6
hypothetical protein FTF1284c	gi 110670815	8
hypothetical protein FTH_1781	gi 115315460	24
hypothetical protein FTW_0967	gi 134301955	6, 7, 9, 16, 17, 18, 19
hypothetical protein FTW_1556	gi 134302419	6
isoleucyl-tRNA synthetase	gi 187931314	6, 7, 9, 12, 16
		17, 18, 19, 20, 21

Tabulka 17c. Identifikované proteiny k jednotlivým vzorkům

Název proteinu	AC označení	vzorky č.
major facilitator superfamily (MFS) transport protein	gi 110670690	20
membrane-bound lytic murein transglycosylase A (MLT) family protein	gi 134301630	25
MHC_I C-terminus family	gi 156503266	14
N-acetylmuramic acid-6-phosphate etherase	gi 134301821	8, 9, 20
nicotinamide mononucleotide transport	gi 156502540	20
outer membrane associated protein	gi 156502769	6
sulfate adenyltransferase subunit 1	gi 156502461	11
tRNA and rRNA cytosine-C5-methylases, sun protein	gi 118497926	7
tRNA(Ile)-lysidine synthase	gi 134301750	21
Type IV pili fiber building block protein	gi 110670462	6
UDP-N-acetylmuramate--alanine ligase	gi 110669867	10

Tabulka 18a. Identifikované sekvence peptidů a k nim přiřazené proteiny u jednotlivých vzorků

Id. protein	Identifikovaná sekvence	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	poč	
gi 110669666	DNVMTFWR	x																					1
gi 110669738	LPLDNLYK						x																1
gi 110669812	TIELDYPR	x	x	x		x		x						x									6
gi 110669867	NALIKVTGVAR					x																	1
gi 110669946	VAAEILEAVEGR	x																					1
gi 110670207	ELGGLQNLNKFVK												x	x									2
	QDNNTGANR												x										1
gi 110670462	AQLGSDLSALGGAK	x																					1
gi 110670690	SLACNMIFALGR															X							1
gi 110670815	VQQLEDKMAVANK			x																			1
gi 110670934	SSALIGIIEGNIR	x																					1
gi 110671029	QILTNSSENIKINRHS	x																					1
	SVITDCDQESSILKHDSKSS	x																					1
	IKYVIDSGLAR	x																					1
gi 115314378	PGDMGFVDLHMNLHKT		x																				1
	ASHEFIVTLKPE		x																				1
	YASLAGFLER		x																				1
gi 115314469	VHRDFNIYFIEGYR			x																		1	

Pozn. Žlutá pole značí, že tato peptidová sekvence byla identifikována i pro jiný protein a nachází se na více místech tabulky.

Tabulka 18b. Identifikované sekvence peptidů a k nim přiřazené proteiny u jednotlivých vzorků

Id. protein	Identifikovaná sekvence	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	poč	
gi 115315460	LHYFIYNNENPKK																				x		1
	NDVLNDVVRFLYSK																					x	1
	RNDVLNDVVR																					x	1
gi 115315503	YNICLEYNQDKK												x										1
	TIELDYPR												x										1
gi 118496765	DIMRLWHTGQAKTK														x								1
	TIELDYPR															x							1
gi 118497926	NLQSKILTNL		x																				1
	QAINAKADM FIR		x																				1
	RLELLR		x																				1
gi 118498004	IKYVIDSGLAR		x	x																			2
	IVALLRALPKNIRK		x																				1
	KIRLQNQLSQK			x																			1
	KKNFISPVR		x	x																			2
gi 118498062	KIMQENYNLILK										x					x							2
	KIMQENYNLILKK																x						1
	QRPGIGDLPTK										x												1
gi 134301357	IGWCYDLKTTTPK				x																	1	
gi 134301630	VINTDLKTK																				x	1	

Pozn. Žlutá pole značí, že tato peptidová sekvence byla identifikována i pro jiný protein a nachází se na více místech tabulky.

Tabulka 18c. Identifikované sekvence peptidů a k nim přiřazené proteiny u jednotlivých vzorků

Id. protein	Identifikovaná sekvence	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Poč	
gi 134301750	LKILFQELQIPTTER																x					1	
gi 134301821	VAIVMILNNCDYEK			x	x											x						3	
gi 134301934	EQLYNK														x							1	
gi 134301955	DQALVYMERANR	x	x		x							x	x	x	x							7	
	KDYTNKYKVIYSMK															x						1	
	QALVYMER		x										x	x	x							4	
	TKLIKAQDLAKQ		x																			1	
gi 134302419	YSQDTEKYR	x																				1	
gi 134302695	LQQLVVDK									x												1	
gi 156502461	GFQGTVVSGSAK						x															1	
gi 156502540	RQQNTNVDNIIMLNR																x					1	
gi 156502769	AIASFVNFIKDSNISSVTVK	x																				1	
	YFAVQYNQLVGR	x																				1	
gi 156503189	LNDSHVLVILDVNSK		x						x			x								x	x	x	6
gi 156503266	LLLPLEK									x												1	
gi 187931314	QRTWGVPLSLFIHK	x	x		x			x				x	x	x	x	x	x					10	
	VTSPQDIYNTLGADILR		x																			1	
gi 187932253	LFSPTKFEIEQNTK	x	x					x	x								x			x		7	
celkový počet identifikovaných peptidů		14	17	7	4	2	2	3	2	2	2	3	7	5	7	6	3	0	2	4	3	95	

