

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Studium membránové lokalizace konservovaného hypotetického
lipoproteinu bakterie *Francisella tularensis* s využitím
molekulárně-biologických metod

Bc. Martina Čapková

Diplomová práce

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Název tématu: **Studium membránové lokalizace lipoproteinu FTT1103 bakterie F.tularensis s využitím molekulárně-biologických metod**

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

Teoretická část:

- 1.F. tularensis - intracelulární patogen
- 2.faktory virulence intracelulárních patogenů
- 3.bakteriální lipoproteiny - struktura, funkce, lokalizace
- 4.metody používané k objasnění lokalizace bakteriálních lipoproteinů - predikční přístupy, molekulárně biologické metody, separační techniky a jiné
- 5.proteiny membránové frakce F.tularensis
- 6.FTT1103 - dosud známá fakta

Experimentální část:

- 1.příprava expresních vektorů
- 2.exprese jednotlivých variant proteinů v E.coli
- 3.detekce jednotlivých variant proteinů v E.coli
- 4.využití fosfatasové aktivity pro lokalizaci FTT1103

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**
Seznam odborné literatury:

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Marcela Šimšová, Ph.D.**
APRONEX s.r.o. Jesenice u Prahy
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Lenka Hernychová, Ph.D.**
Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošfák, DrSc.
děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Bc. Martina Čapková

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala Ing. Marcelě Šimšové, Ph.D., za vedení mé diplomové práce a cenné rady při jejím zpracování. Dále chci poděkovat také všem zaměstnancům firmy Apronex s.r.o., kteří mi ochotně pomáhali a poskytli mi skvělé zázemí, zvláště pak Mgr. Daně Manglové za její obětavou pomoc. Také bych chtěla poděkovat doc. Zuzaně Bílkové a doc. Lence Hernychové za konzultace.

Děkuji svým rodičům, že mi umožnili studium na vysoké škole a vždy mě podporovali. Děkuji také svému manželovi za jeho podporu a trpělivost.

Anotace

Nedávno publikované studie ukazují, že proteiny membránového bakteriálního komplexu DsbA-DsbB mají přímý vztah k virulenci mikroba (Inaba and Ito, 2008). Předkládaná práce je zaměřena na studium topologie jednoho z těchto lipoproteinů *Francisella tularensis* (*F. tularensis* subtyp *tularensis*), označovaného jako lipoprotein FTT1103 (gi 56708183, teoretická Mh 38 721 Da, pI 5.23) s DsbA doménou. Metodami genového inženýrství byla, pro ověření výsledků predikčních algoritmů, připravena sada vektorů pro expresi jak fúzních rekombinantních proteinů, tak i volných forem FTT1103.

Expresní vektory byly vytvořeny klonováním genu pro FTT1103 a reportérového genu pro periplazmaticky aktivní enzym alkalickou fosfatázu (PhoA). K určení lokalizace lipoproteinu v *Escherichia coli* (*E. coli*) byla využita právě přirozená enzymatická aktivita PhoA při sekreci proteinů do periplazmatického prostoru díky přítomnosti funkčního N-koncového signálního peptidu. Připravené vektory byly použity pro expresi, následnou detekci proteinů a jejich enzymatické aktivity v modelovém organismu *E.coli*. Na základě získaných poznatků byl navržen topologický model proteinu FTT1103.

KLÍČOVÁ SLOVA: *Francisella tularensis*, proteinová topologie, alkalická fosfatáza

Summary

Recently was published, that *Francisella tularensis* proteins in membrane compartment have direct relation to the microbe pathogenicity. The referred diploma thesis is focused on FTT1103 lipoprotein topology study. There was prepared a set of vectors for expression of phusion recombinant proteins as well as their free variants by using of genetic engineering methods to validate data in bioinformatic study. Expression vectors were prepared by “in frame” cloning of FTT1103 gene and reporter gene for periplasmatically active enzyme alkaline phosphatase (PhoA). Activity of PhoA due to enzyme secretion into periplasmatic space in the presence of functionally active N-terminal signal sequence was used to determine lipoprotein localization in *Escherichia coli* (*E. coli*). The vectors were used for expression, protein detection and enzymatic activity prediction in a model organism of *E. coli*. Based on research data the topology model was proposed.

KEYWORDS: *Francisella tularensis*, phusion protein, alkaline phosphatase

Zkratky:

2-DE	Dvoudimenzionální elektroforéza
A	Alanin
A,C,G,T,W	Nukleotidy - adenin, cytosin, guanin, tymin, adenin nebo tymin
ABC	ATP binding cassette transporter (ATP vazebný kazetový přenašeč)
AD	adaptor
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
bp	Počet párů bází (base pair)
BSA	Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
C	Cystein
CIAP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (telecí střevní alkalická fosfatáza)
D	Kyselina asparagová
dNTP	Deoxyribonukleotidtrifosfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
FTT1103	Funkční lipoprotein FTT1103
FTT1103-AD	Funkční lipoprotein FTT1103 s připojeným adaptorem
FTT1103Δ	Lipoprotein FTT1103 bez signální sekvence
G	Glycin
GAM _{Px}	Goat anti-mouse (kozí sekundární protilátka proti myši primární protilátce)
GAR _{Px}	Goat anti-rabbit (kozí sekundární protilátka proti králičí primární protilátce)
h	hodina
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
His	Histidin
I	Izoleucin
IFN- γ	Interferon γ
IgG, IgM	Protilátky – imunoglobulin G a M
iMALDI	Immunoaffinity Matrix-assisted laser desorption/ionization
kDa	Kilodalton
L	Leucin
LB	Luria-Bertani Broth; Lysogeny Broth
LD pufr	Leading DNA pufr
LP	Lipoprotein
LPS	Lipopolysacharid

LVS	Live Vaccine Strain
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MHC II	Hlavní histokompatibilní komplex II. třídy
min	minuta
PBS	Phosphate-buffered saline (fosfátový pufr)
PCR	Polymerase-chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PhoA	Alkalická fosfatáza
rpm	Počet otáček za minutu (revolutions per minute)
RT	Laboratorní teplota
S	Serin
SDS	Dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
Sp	Signální peptidáza
T	Treonin
TB	Transformation buffer (transformační pufr)
TBE	Tris/boritan/EDTA
TLR	Toll-like receptor
Tul4	T-lymphocyte-reactive protein
V	Valin
X	Libovolná aminokyselina

Obsah

1.	Úvod.....	11
2.	Teoretická část	12
2.1	<i>Francisella tularensis</i>	12
2.1.1	<i>Francisella tularensis</i> – intracelulární patogen	12
2.1.2	Faktory virulence <i>F. tularensis</i>	13
2.1.3	Diagnostika <i>F. tularensis</i> a projevy onemocnění	15
2.1.4	Dostupné vakcíny proti tularémii	18
2.2	Faktory virulence intracelulárních patogenů.....	18
2.3	Bakteriální lipoproteiny – struktura, funkce, lokalizace	20
2.4	Metody používané k objasnění lokalizace bakteriálních lipoproteinů	22
2.5	Konservovaný hypotetický lipoprotein FTT1103 – dosud známá fakta	24
3.	Cíl práce	26
4.	Experimentální část.....	27
4.1	Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení	27
4.1.1	Chemikálie.....	27
4.1.2	Roztoky.....	28
4.1.3	Kity	31
4.1.4	Enzymy	33
4.1.5	Protilátky.....	35
4.1.6	Syntetické oligonukleotidy	35
4.1.7	Gely.....	36
4.1.8	Kultivační média.....	37
4.1.9	Plazmidy	38
4.1.10	Bakteriální kmeny.....	38

4.1.11	Použité přístroje a pomůcky	38
4.2	Metody a pracovní postupy	40
4.2.1	Příprava superkompetentních buněk <i>E.coli</i>	40
4.2.2	Transformace plazmidové DNA do superkompetentních buněk	41
4.2.3	Izolace plazmidové DNA	41
4.2.4	Manipulace s plazmidovou DNA	42
4.2.5	Elektroforéza v agarózovém gelu	43
4.2.6	Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu.....	44
4.2.7	Kontrola exprese proteinu.....	45
4.2.8	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	45
4.2.9	Barvení SDS-PAGE gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue	46
4.2.10	Imunochemická detekce proteinů na membráně (Western-blot).....	46
4.2.11	Glycerolové bakteriální konzervy.....	47
4.2.12	Příprava sekvenční PCR	47
5.	Výsledky a diskuse	48
5.1	Příprava expresních vektorů.....	48
5.2	Exprese a detekce jednotlivých proteinů v <i>E.coli</i>	57
5.3	Využití fosfatázové aktivity pro lokalizaci konservovaného hypotetického lipoproteinu	60
5.4	Diskuse.....	60
6.	Závěr	62
7.	Literatura:.....	63

1. Úvod

F. tularensis je jemná pleimorfnní Gram-negativní intracelulární bakterie vyvolávající zoonotické onemocnění tularemie. *F. tularensis* se vyskytuje ve čtyřech subtypech: subtyp *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* a *tularensis*. Pokud není nasazena léčba antibiotiky, je onemocněné hypervirulentní variantou *F. tularensis* subtyp *tularensis* smrtelné až v 60 % případů. Ostatní subtypy jsou méně virulentní. *F. tularensis* se vyskytuje prakticky po celé severní polokouli. U subtypů *tularensis* a *holarctica* byl sekvenován a anotován genom (Larsson P. et al. 2005) a charakterizován základní proteom (Hubálek M. et al. 2004). *F. tularensis* subtyp *tularensis* je jedním ze šesti mikroorganismů klasifikovaných The U.S. Centers for Disease Control and Prevention jako biologické agens typu A vojensky a teroristicky zneužitelné (Dennis a kol., 2001; Ellis a kol., 2002). Vzhledem k nebezpečí, které představuje, se v dnešní době mnoho výzkumů věnuje podrobnému zkoumání této bakterie.

Předkládaná práce je zaměřena na studium jednoho z lipoproteinů (LP), který je podle predikčních algoritmů lokalizován v periplazmě nebo vnější membráně bakterie *F. tularensis*. Tento LP se označuje FTT1103 a pokud by se potvrdila jeho lokalizace ve vnější membráně a vliv na patogenicitu, mohl by být využit při vývoji vakcín, nových diagnostických metod nebo při zlepšování možností léčby.

2. Teoretická část

2.1 *Francisella tularensis*

2.1.1 *Francisella tularensis* – intracelulární patogen

Bakterie *F.tularensis* je Gram-negativní, opouzdřená, nepohyblivá, aerobní bakterie tyčinkovitého tvaru. Její rozměry jsou 0,4-0,6 μm na šířku a 0,8-1,0 μm na délku. *F. tularensis* patří mezi bakterie, které netvoří spóry (Macela a kol., 2006).

F. tularensis je původcem tularémie, nemoci označované také jako zaječí nemoc. Jde o onemocnění s přírodním výskytem, které se šíří zejména mezi vnímavými hlodavci, jakými jsou divoce žijící hlodavci - králíci a zajáci (odtud označení zaječí nemoc). Může však dojít k jejímu přenosu i na jiné savce včetně člověka. Přenos probíhá různými způsoby: (1) vzdušnou cestou (kontaminovaným prachem nebo aerosolem), (2) členovci, kteří sají krev na infikovaných zvířatech (komáři a klíšťata), (3) požitím kontaminované vody apod. Tato bakterie napadá různé typy eukaryotických buněk (profesionální makrofágy i nefagocytující buňky) a může se vyskytovat v různých tkáních (např. uzliny, slezina, plíce). Je také schopná uniknout z fagolysozomu a množit se v cytoplasmě hostitelské buňky (Thakran a kol., 2007). Letální infekční dávka *F. tularensis* subtyp *tularensis* je pro člověka 10 bakterií aerosolovou cestou (Dennis a kol., 2001; Pávková a kol., 2005).

Bylo prokázáno několik subtypů tohoto mikroorganismu, které se liší ve virulenci. Dva pravděpodobně nejznámější subtypy jsou vysoce virulentní *F. tularensis* subtyp *tularensis* (typ A, kmen SchuS4) a méně virulentní subtypy *F. tularensis* subtyp *holarctica*, *mediasiatica*, *novidica* (typ B). *F.tularensis* subtyp *tularensis* se vyskytuje v severní Americe a subtyp *holarctica* v Evropě a Asii. Právě subtyp *holarctica* způsobuje epidemie také v České republice. Zatímco nákaza způsobená subtypem *holarctica* neléčená antibiotiky je letální asi jen ve 30 %, jde-li o infekci subtypem *tularensis*, může být úmrtnost až 60 %. Neléčená nebo nedostatečně léčená infekce vede k selhání dýchání, šoku a smrti. Ve střední Asii se vedle subtypu *holarctica* vyskytuje také *F. tularensis* subtyp *mediasiatica*, jež svými charakteristikami připomíná *F. tularensis* subtyp *tularensis*. V Japonsku se dále vyskytuje *F. tularensis* subtyp *japonica* (Macela a kol., 2006; Havlasová a kol., 2005).

2.1.2 Faktory virulence *F. tularensis*

Jedny z klíčových struktur spojených s virulencí se jeví povrchové proteinové struktury bakterií. Proteiny vnější membrány umožňují *F. tularensis* vstup do hostitelské buňky, přežívání uvnitř buňky a tím únik před imunitním systémem hostitele. V současnosti je známo 38 membránových proteinů a stále jsou přidávány další, u kterých je ověřován vztah k virulenci mikroba. Identifikace povrchových struktur je důležitá, protože vede k vývoji nových protilátek, diagnostických souprav, vakcín apod. Zatím však nebyl jednoznačně určen protein či skupina proteinů zodpovědných za virulenci (Janovská a kol., 2007).

Vedle proteinů mohou být za virulenci *F. tularensis* zodpovědné i další součásti bakterií, jako je její pouzdro, povrchový lipopolysacharid (LPS) a lipid A nebo alkyl-pyrofosfoestery (fosfoantigeny). Pouzdro je důležité jako ochrana proti lyzi zprostředkované sérem, avšak uvnitř hostitelských buněk vede k respiračnímu vzplanutí a usmrcení bakterií. LPS *F. tularensis* má asi 1000x nižší toxicitu než je tomu u *E. coli* a současně má jeho O-řetězec unikátní složení. Lipid A obsažený uvnitř bakterie má vliv na virulenci LPS. Fosfoantigeny jsou silnými induktory růstu T-buněk a tento růst je patrný především při onemocnění tularemií, nikoli při vakcinaci (Sjödstedt, 2003).

Jedním z proteinů vnější membrány je FopA (Francisella outer membrane protein), jehož hmotnost je 43-kDa. Tento protein byl testován jako možný kandidát využitelný při přípravě vakcín. Ukázalo se však, že nevyvolává ochranu ani proti subtypu A, ale dokonce ani proti kmenu LVS (live vaccine strain – oslabený kmen používaný k vakcinaci zvířat). Další molekulou lokalizovanou ve vnější membráně *F. tularensis* je Tul4 (T-lymphocyte-reactive protein) s molekulovou hmotností 17-kDa. Výzkum ukázal, že jde o integrální membránový LP. Při dalším zkoumání byly objeveny dva paralogy toho proteinu – Tul4-A (FTT0901) a Tul4-B (FTT0904) (Huntley a kol., 2006).

Další proteiny pravděpodobně lokalizované ve vnější membráně jsou: LP asociovaný s peptidoglykanem Pal (peptidoglycan-associated lipoprotein, FTT0842); ortology proteinu vnější membrány TolC-A (FTT1095c) a TolC-B (FTT1724c); podjednotka pilinu typu IV PilQ (FTT1156c); protein zodpovědný za rezistenci proti stříbrným kationtům SilC (FTT1258); antigen na povrchu vnější membrány FtaG (FTT1573c); násobitel infekčnosti makrofágů Mip (macrophage infectivity

potentiator, FTT1043); N-koncová část ortologu autotransporterového proteinu *Yersinia* YapH-N (FTT0918); C-koncová část ortologu autotransporteru *Yersinia* YapH-C (FTT0919); LVS ortolog autotransporteru *Yersinia*, který je výsledkem delece C-koncové části YapH-N a N-koncové části YapH-C ve čtecím rámci a jehož název je YapH-LVS (FTL_0439) (Huntley a kol., 2006).

Pomocí predikčních programů byly objeveny další dva proteiny: protein z chitinázové rodiny Cht1 (FTT0715) a antigen povrchu vnější membrány SrfA (FTT0025c). Počítačový program LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/>) umožňující předpovědět lipoproteinový charakter ukázal, že Pal, Mip, YapH-N, YapH-LVS, Tul4-A a Tul4-B by mohly být lipoproteiny. Detailní analýza N-koncových sekvencí TolC-A a SilC však odhalila, že postrádají sekvenci zvanou „lipobox“ a proto s velkou pravděpodobností nejde o lipoproteiny (Huntley a kol., 2006).

Podle počítačového programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) obsahuje *F. tularensis* kompletní Lol systém, který je nezbytný pro přenos lipoproteinů z vnitřní do vnější membrány (Takeda a kol., 2003). Zatím však není zcela známo, zda dochází opravdu pomocí tohoto systému k translokaci lipoproteinů přes periplasmatický prostor nebo nikoli (Huntley a kol., 2006).

Dalšími potenciálními faktory virulence jsou 23-kDa protein (IglC), který je důležitý pro intracelulární proliferaci; proteiny MglA a MglB, které jsou pravděpodobně regulátory genové exprese; 17-kDa lipoprotein, který je rozpoznáván lidskými T-buňkami po vakcinaci kmenem LVS (Sjöstedt, 2003); proteiny IglA a IglB, u nichž dosud nebyla objasněna jejich funkce a produkt genu *iglD*. S využitím bioinformatické analýzy byly navrženy další kandidáti faktorů virulence, kterými jsou proteáza CplB, důležitá pro správné skládání proteinů do jejich terciární konformace; RNA označovaná jako host factor 1 (Hfq), vázající protein nutný pro translaci sigma faktorů stacionární fáze; sigma 54 modulační protein, který je alternativním sigma faktorem; superoxid dismutáza a peroxidáza/kataláza, pomáhající bakteriím přežít oxidativní vzplanutí ve fagozomech; alkalická fosfatáza (AcpA), která by mohla pomáhat *F.tularensis* unikat z fagolyzozomů. Mezi potenciální faktory virulence patří i tzv. „housekeeping“ proteiny (tj. proteiny nezbytné pro přežívání a proliferaci bakterií), mezi něž patří glutamin-syntáza, serin-hydroxymethyltransferáza (NP_406411), gama-glutamyltranspeptidáza (NP_462452), thymidylát syntáza (NP_820530), tzv. putative chorismate mutase (NP_456242), beta podjednotka

riboflavin syntázy (NP_819678) a ABC transportér (ATP binding cassette transporter). Z výše uvedených údajů je patrné, že otázka faktorů virulence *F. tularensis* je dosud nedostatečně objasněná (Macela a kol., 2006). V nedávné době byla prokázána důležitost LP s DsbA doménou (disulfid oxidoreduktáza) jako klíčového faktoru virulence *F. tularensis* subtypu *holarctica*. Tento lipoprotein je nezbytný pro přežití a replikaci bakterie v hostitelské buňce (Straskova a kol., in press).

2.1.3 Diagnostika *F. tularensis* a projevy onemocnění

V minulosti se pro diagnostiku používaly bakterie zachycené z krve při bakteriémii. Izolace se následně prováděla na vnímavých laboratorních hlodavcích. Po jejich smrti se materiál z typických orgánových lézí kultivoval. Pro kultivaci se používal krevní agar s přísadkami glukózy a cysteinu, příp. inokulace testovaného materiálu do žlutkového vaku kuřecího embrya. V dnešní době se však kultivace pro diagnostické účely běžně neprovádí kvůli obtížné izolaci, kultivaci a také reálnému riziku nákazy personálu laboratoře. Pro rychlou a přímou diagnostiku se s výhodou využívají imunofluorescenční metody. Buňkami zprostředkovanou přecitlivělost lze detekovat jak *in vitro* testem inhibice migrace makrofágů a blastickou transformací lymfocytů, tak také *in vivo* kožním alergickým tularinovým testem. Provádí-li se přímé nátěry z patologického materiálu, mají tyčinky kokobacilární tvar. Pro starší kultury jsou pak charakteristické puchýřkovité útvary a zduřelé vláknité formy (Bednář a kol., 1996).

Na běžných laboratorních půdách nemůže být *F. tularensis* kultivována, protože je velice náročná na kultivační podmínky. Pro její růst na živných půdách je nutná přítomnost železa a sloučenin obsahujících -SH skupiny např. cystein nebo thioglykolát sodný (Lukáš, Libich, 1962). Kultivace je možná také na krevním agaru, kde je vedle cysteinu přítomná i glukóza, příp. na půdě z koagulovaných vaječných žloutků. Mezi nezbytná růstová aditiva pro kultivaci *F. tularensis* patří kromě již zmíněného cysteinu i glutamin, histidin a thiamin. Ke kultivaci lze použít také chemicky definované medium s pH mezi 6,2 a 6,4 obsahující mimo jiné vápenatou sůl kyseliny pantothenové. Oba tyto faktory mají pozitivní vliv na růst bakterií (Chamberlein, 1965). Kolonie vyrůstají po 2 i více dnech. Zpočátku jsou drobné a průsvitné, po čase se mléčně zakalí a začnou mít mukózní konzistenci. Fermentace cukrů je u *F. tularensis* velice slabá (Bednář a kol., 1996).

Pro diagnostiku se spíše než kultivace používá aglutinační test nebo ELISA. Tradiční metodou diagnostiky je právě aglutinační test, který však není příliš citlivý a navíc dochází k případům, kdy izolovaný kmen obsahuje jiné antigeny, než které jsou používány v komerčních testech (Ellis a kol., 2002). Doba, po kterou může aglutinační test podávat falešně negativní výsledky je i více než 25 dnů. Vzhledem k tomu, že včasná léčba předchází dalším komplikacím, je jasné, že jsou potřeba rychlejší a robustnější diagnostické metody. Jedním z přístupů může být ELISA, která využívá navázaný vysoce purifikovaný lipopolysacharidový antigen (LPS antigen) k detekci IgG a IgM v séru. Ani ELISA však nedokáže s jistotou stanovit IgG a IgM v séru dříve než za 2-3 týdny. Další nevýhodou metod ELISA a aglutinačního testu je to, že nejsou schopny od sebe odlišit typy A a B. Rychlejší diagnostika je v dnešní době možná s využitím PCR (polymerase chain reaction). S pomocí PCR lze stanovit až 10^2 CFU/ml bakterií ve fosfátovém pufru (CFU – colony-forming unit). Ve vzorku krve, který obsahuje inhibitory PCR, však takovéto citlivosti nelze dosáhnout. V lidském séru byla citlivost PCR 10^3 - 10^4 CFU/ml bakterií (při použití více PCR to bylo až 10^2 CFU/ml bakterií v lidské krvi). Speciální filtrační papír a spojení s tzv. „PCR-enzyme immunoassay“ (příp. stanovení pomocí TaqMan 5´ nukleázy) zvyšuje citlivost až na méně než 100 CFU/ml bakterií (Ellis a kol., 2002). Metoda PCR je dostatečně citlivá pro kožní formu tularémie, avšak nedostatečná pro ostatní formy jako např. respirační nebo tyfoidní forma. Byl však proveden výzkum, který využíval stimulaci lymfocytů plné krve (Whole-Blood Lymphocyte Stimulation Test). Měřítkem aktivace lymfocytů je u tohoto testu hladina interferonu γ (IFN- γ). Díky tomu, že buněčná imunita je rychlejší než humorální, lze již během jednoho týdne od infikování člověka prokázat onemocnění. Tato metoda je zatím stále ve vývoji a běžně se nepoužívá. Její nevýhodou může být, že se vzorky po odebrání musí zpracovat během pár hodin, protože jsou velice citlivé k poškození - již za 24 hodin mohou být výsledky zkreslené (Eliasson a kol., 2008). Další rychlou diagnostickou metodou je mikroskopické pozorování s využitím fluorescenčně značených protilátek. V tomto případě je možné získat výsledky již během několika hodin (Dennis a kol., 2001).

ELISA metodou využívající monoklonální protilátky lze detekovat přímo bakteriální lipopolysacharid. Citlivost tohoto stanovení je 10^3 CFU/ml bakterií ve fosfátovém pufru a 10^4 CFU/ml bakterií v lidském séru. Pro rychlé stanovení v terénu lze použít ruční imunochromatografický test využívající jak monoklonální,

tak i polyklonální protilátky proti LPS antigenu. Citlivost tohoto testu je 10^6 CFU/ml ve fosfátovém pufru a 10^7 CFU/ml v lidském séru. Imunochromatografický test je sice jednoduchý a rychlý (výsledky jsou k dispozici během 15 minut), avšak díky nízké citlivosti nelze na základě negativního výsledku jednoznačně vyloučit infekci *F. tularensis* (Ellis a kol., 2002).

Nová kvantitativní diagnostická metoda využívající pro detekci *F. tularensis* hmotnostní spektrometrii je rychlá, bezpečná, citlivá a specifická. Tato metoda se nazývá immunoaffinity MALDI (zkráceně označováno iMALDI) a je založena na detekci IglC peptidu *F. tularensis*. Protilátky proti peptidu jsou nejprve imobilizovány na afinitní kuličky, následně jsou přidány natrávené „lehké“ a „těžké“ peptidy, které jsou adsorbovány na kuličku (imunoadsorpce), kuličky se uspořádají na destičku pro MALDI analýzu, je přidán roztok matrix a další postup je již stejný jako u MALDI. „Těžké“ peptidy jsou izotopicky značené peptidy s hledaným epitopem, které slouží jako vnitřní standard. Jako „lehké“ peptidy jsou označeny peptidy, které jsou analyzovány. Metoda iMALDI má oproti mikroaglutinačnímu testu tu výhodu, že je rychlá (měřitelná hladina protilátek pro mikroaglutinační test je asi za 1 týden po infekci), a oproti PCR a ELISA není tolik citlivá ke kontaminaci materiálu jinou DNA/mikroorganismem. Metodou iMALDI se stanovuje IglC v PBS roztoku, ale stanovení lze provést i z lidské plazmy nebo nosního výtěru (Jiang a kol., 2007).

F. tularensis je intracelulárním parazitem, díky čemuž se jí daří unikat před imunitním systémem napadeného organismu. Je schopná žít a množit se v makrofázích a má aparát, který jí umožní únik z fagolysosomů do cytoplazmy. Její lokalizace v orgánech závisí do určité míry na způsobu infikování, i když přednostně napadá játra, slezinu, ledviny, plíce a lymfatické uzliny. Počátek onemocnění bývá provázen bolestmi hlavy, horečkami (38-40 °C), zimnicemi, rýmou a podrážděním krku (Dennis a kol., 2001). Onemocnění má charakter buď akutní infekce, nebo je chronické. Při akutní fázi lze pozorovat zvýšenou teplotu a malátnost, při chronické pak zhnisání a zvětšení mízních uzlin a ztrátu pohyblivosti (Sedlák, Tomšíčková, 2006; Bednář a kol., 1996).

Podle způsobu nakažení lze tularémii rozdělit na několik forem. A to kožní, způsobenou především členovci, dále pak oční forma, ústní forma po požití kontaminované potravy nebo vody a plicní, která je způsobena vdechnutím kontaminovaného

prachu nebo aerosolu. Pravděpodobně nejzávažnější je poslední zmiňovaná forma – plicní. Projevuje se zánětem plic, kašlem, dušností a bolestí na hrudi. Ústní forma může mít dvě různé manifestace. Buď připomíná těžkou angínu, nebo tyfus (tyfoidní), kdy jsou časté bolesti břicha, průjmy, zvětšení sleziny, krvácení a vředy v zažívacím traktu (Sedlák, Tomšíčková, 2006; Bednář a kol., 1996).

2.1.4 Dostupné vakcíny proti tularémii

Z kmene *F.tularensis* subtyp *holarctica* byl izolován oslabený kmen „Live Vaccine Strain“ (LVS), který se používal k vakcinaci. V dnešní době se lidé neočkují tímto kmenem, protože kmen LVS již není licencován, není znám důvod atenuace a také hrozí reálné riziko konverze na virulentní kmen. Dále není vyřešen mechanismus navození imunity a hrozí tak nebezpečí infekce imunosuprimovaných jedinců. Ovšem vzhledem k tomu, že jiná vakcína zatím neexistuje, vakcinace lidí kmenem LVS se ve speciálních případech provádí. Jde o lidi, kteří jsou v přímém ohrožení touto bakterií (Janovská a kol., 2007).

Nedávný výzkum odhalil možný cíl vývoje živé oslabené vakcíny. Pokusy provedené s kmenem *F. tularensis* subtyp *holarctica*, který obsahoval nefunkční gen pro lipoprotein FTT1103 s DsbA doménou, ukázaly, že tento lipoprotein je klíčovým pro virulenci bakterie *F. tulaensis*. Tento lipoprotein navozoval u pokusných zvířat protektivní imunitu, takže byly chráněny před infekcí plně virulentním kmenem typu B (Straskova a kol., in press). Byly testovány také mutantní kmeny s defektním genem pro lipoprotein FTT1103 s DsbA doménou, které navozovaly protektivní imunitu proti SchuS4. Pokud by se tedy potvrdilo, že lipoprotein FTT1103 je skutečně zodpovědný za virulenci *F. tularensis*, znamenalo by to důležitý objev nejen pro vývoj vakcíny proti *F. tularensis*, ale i pro diagnostiku (Qin a kol., 2009).

2.2 Faktory virulence intracelulárních patogenů

Pro virulenci intracelulárních patogenů je klíčové nejenom adherovat na povrch hostitelských buněk, ale také proniknout do jejich nitra. K přichycení na povrch hostitelských buněk využívají bakterie molekuly označované jako adheziny. Tyto molekuly jsou velice variabilní od jednoduchých sacharidů až po složité organely. Mohou mít vláknitou a ohebnou podobu fimbrií (pili) nebo to mohou být složky buněčné membrány. Tyto molekuly jsou specifické pro jednotlivé druhy bakterií. Velice důležité jsou povrchové struktury bakterií, jako LPS a proteiny vnější membrány u

Gram-negativních bakterií, nebo polysacharidy obsažené v buněčné stěně Gram-pozitivních bakterií. Tyto struktury mohou vedle ochrany proti vnějšímu prostředí sloužit také k adhezi bakterií na hostitelskou buňku (Macela a kol., 2006).

Molekuly, které pomáhají průniku bakterií do hostitelských buněk, se nazývají invaziny (u bakterie *Listeria monocytogenes* se nazývají internaliny). Některé adheziny mohou plnit zároveň i funkci invazinů, jako např. „fibronectin binding protein“ bakterií *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Mezi invaziny patří i proteázy a peptidázy, fosfolipázy, kolagenázy, hyaluronidázy apod., které umožňují průnik bakterií tkáněmi. Invaziny rozrušují membránu vakuol a tím umožňují únik bakterií z vakuoly do cytoplazmy. Průnik skrze membránu hostitelské buňky může být zprostředkován také přestavbou cytoskeletu hostitelské buňky, která je indukována GTPázou z rodiny Rho (např. *Brucella melitensis*, *Salmonella enterica*). Sekreční systémy jsou pro patogenitu bakterií také důležité, protože s jejich pomocí bakterie transportuje adheziny a invaziny na svůj povrch a zároveň umožňují sekretovat i regulátory obranných mechanismů hostitelské buňky (Macela a kol., 2006).

Pro patogenitu bakterií jsou nutné proteiny, které zajišťují základní metabolické pochody a umožňují bakteriím přežít v buňkách hostitelského organismu. Tyto proteiny se označují jako tzv. „house-keeping“ proteiny. Mezi „house-keeping“ proteiny lze zařadit např. glutamin-syntázu nezbytnou pro přežívání bakterií v makrofázích (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*), thymidylát-syntázu umožňující intracelulární proliferaci (*Salmonella enterica*) nebo γ -glutamyl transpeptidázu indukující apoptózu (*Helicobacter pylori*) (Bednář a kol., 1996).

Dalším z faktorů virulence jsou bakteriální toxiny. Tyto toxiny mohou působit buď přímo v hostitelské buňce nebo jejím těsném okolí, nebo mohou být krevním oběhem zaneseny do jiných částí těla. U Gram-pozitivních bakterií se toxiny do prostředí uvolňují během růstu. Toxiny Gram-negativních bakterií se uvolňují až po narušení jejich buněčné stěny. Účinky toxinů jsou různé od cytotoxických, jako např. O-streptolyzin, δ -lyzin nebo listeriolyzin, přes pyrogenní jako např. pyrogenní toxin bakterie *Streptococcus pyogenes* nebo mohou způsobovat toxický šok jako je tomu v případě toxinu toxického šoku *Staphylococcus aureus*. Jako endotoxin se označuje lipopolysacharid nebo jeho odštěpená část. Mezi toxiny lze zařadit i superantigeny, molekuly vázající se nespecificky na T-lymfocyty a MHC II (hlavní histokompati-

bilní komplex II. třídy). Nebezpečí superantigenů spočívá v jejich schopnosti vyvolat autoimunitní onemocnění (Bednář a kol., 1996; Macela a kol., 2006).

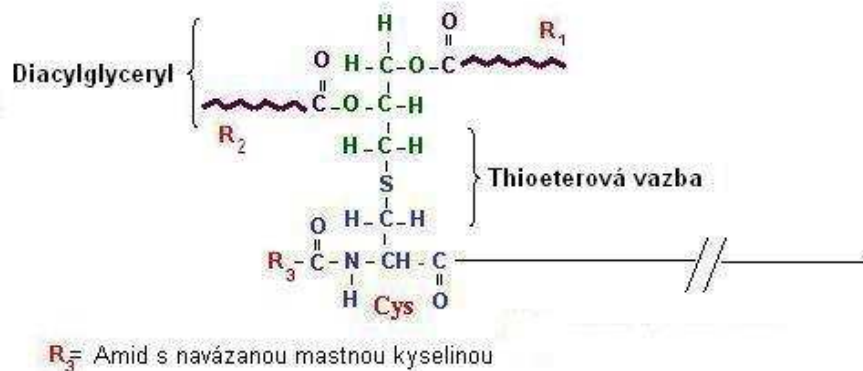
Geny pro faktory virulence jsou často lokalizovány blízko sebe v oblastech označovaných jako „ostrovy patogenity“.

2.3 Bakteriální lipoproteiny – struktura, funkce, lokalizace

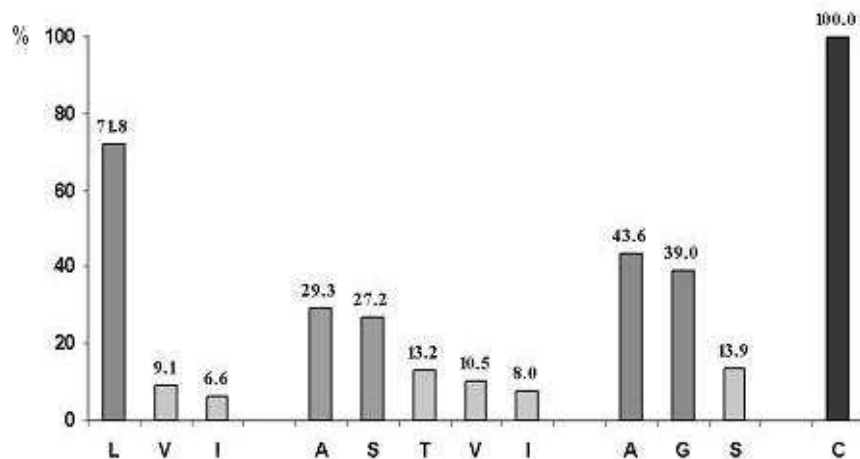
Lipoproteiny se skládají z proteinové a lipidické části. Na N-konci proteinu je navázána N-acyl diacylglycerolová skupina, která umožňuje ukotvení lipoproteinu v membráně. Spojení proteinu s diacylglycerolem zajišťuje thioeterová vazba mezi diacylglycerolem a cysteinovým zbytkem (Obr. 1).

Pro lipoproteiny je charakteristický „lipobox“. Jde o krátkou aminokyselinovou sekvenci na N-konci peptidu, která obsahuje vždy cysteinový zbytek. Tato sekvence je tvořena aminokyselinami [LVI][ASTVI][GAS][C] (Obr. 2). Bakterie používají charakteristický způsob lipidace této oblasti peptidu. Posttranslačně dojde k navázání N-acyl-diacyl-glycerolové skupiny na thiolovou skupinu cysteinu. Peptid je následně rozštěpen enzymem signální peptidázou (Sp) a na volnou N-koncovou skupinu cysteinu je navázán třetí acyl. Tím vzniká triacylovaný lipoprotein. Přítomnost lipidových zbytků umožňuje ukotvení proteinu v membráně. N-konec lipoproteinů obsahuje signální peptid, který je důležitý pro jejich lokalizaci v membráně bakterií (Obr. 3) (www.mrc-lmb.cam.ac.uk).

Lipidace je také klíčová pro správnou funkci proteinů, která je rozmanitá. Některé slouží k transportu exopolysacharidů a kapsulárních polysacharidů přes membránu, jiné jsou aktivátory pro další proteiny (Marczak a kol., 2006). Příkladem takových lipoproteinů je i FTT1103 (gi 56708183) a Tul4 (32395512), které umožňují aktivovat Toll-like receptory (TLR) (Thakran a kol., 2007). Pro správnou funkci lipoproteinů je důležitá i jejich sekundární struktura. Jako příklad lze uvést přítomnost sekundární struktury proteinů β -barelu u transportních proteinů, které v membráně vytváří kanál (Marczak a kol., 2006).



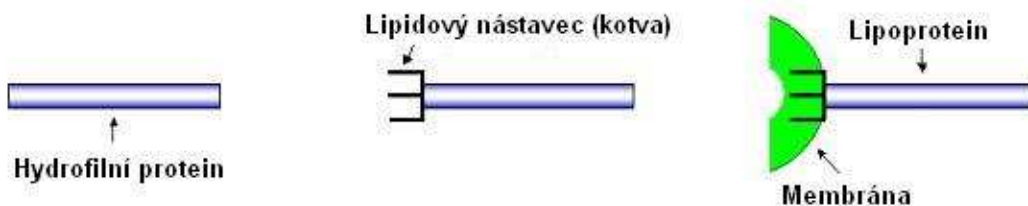
Obr. 1 **Schematické znázornění struktury lipoproteinů.** Na cysteinový zbytek proteinu je thioeterovou vazbou navázán diacylglyceryl. Třetí acyl je navázán na N-konci cysteinu (R_3). V pozicích R_1 a R_2 bývá navázán zbytek kyseliny palmitové, v pozici R_2 může být navázán zbytek kyseliny palmitové nebo olejové (www.mrc-lmb.cam.ac.uk; Kamalakkannan a kol., 2004).



Obr. 2 **Zastoupení aminokyselinových zbytků v N-terminální proteo-
vé sekvenci „lipobox“.** Na ose x jsou uvedeny zkratky jednotlivých amino-
kyselinových zbytků (L, V, I, A, S, T, G, C); na ose y je procentuelní za-
stoupení aminokyselinových zbytků. Na první pozici v „lipobox“ bývá nej-
častěji leucin, druhá a třetí pozice je variabilnější – na druhé je to často ala-
nin nebo serin, na třetí pak alanin nebo glycin. Poslední pozici vždy zaujímá
cystein (www.mrc-lmb.cam.ac.uk).

Bakteriální lipoproteiny jsou u Gram-negativních bakterií lokalizovány ve vnitřní či vnější membráně nebo v periplazmě. To, v jaké části membrány bude lipoprotein lokalizován, závisí na mnoha faktorech a jedním z nich je uspořádání a za-

stoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v „lipobox“ sekvenci. Pokud je na druhém místě kyselina asparagová (CXD), pak bude teoreticky odhadnuta lipoproteinová lokalizace ve vnitřní membráně. Jestliže lipoprotein v této pozici kyselinu asparagovou postrádá, bude pravděpodobně lokalizován ve vnější membráně. Lipoproteiny mohou obsahovat jednu nebo i více transmembránových oblastí a mohou tvořit homo- i heterokomplexy (Thakran a kol., 2007; Marczak a kol., 2006).



Obr. 3 **Schematické znázornění ukotvení lipoproteinu v membráně.** Hydrofilní část proteinu je orientována do cytoplazmy, periplazmatického prostoru nebo vnějšího prostředí, zatímco hydrofobní lipidická část představuje kotvu, kterou je celý lipoprotein ukotven v membráně (www.mrc-lmb.cam.ac.uk).

2.4 Metody používané k objasnění lokalizace bakteriálních lipoproteinů

K predikci bakteriálních lipoproteinů lze použít počítačové programy, které obsahují databáze známých lipoproteinů. Proteinovou sekvenci hledaného lipoproteinu porovnávají s již známými sekvencemi a motivy lipoproteinů v databázi a statistickými výpočty následně určí pravděpodobnou lokalizaci lipoproteinu v bakterii. Jako příklady programů lze uvést **BLAST** (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), **PSORT-B** (www.psорт.org) nebo **LipoP** (www.cbs.dtu.dk/services/lipoP/). Program **PSORT-B** hledá oblasti signálních peptidů, transmembránových α -helixů a motivů specifických pro určitou lokalizaci. Je schopen zařadit lipoprotein do jedné z pěti možných lokalizací (cytoplazma, vnitřní membrána, periplazmatický prostor, vnější membrána a extracelulární prostor) a dokonce je schopen určit, zda protein není lokalizován zároveň ve dvou místech (např. cytoplazma a vnitřní membrána). Předpověď lokalizace některých lipoproteinů však může být obtížná, pokud jde o proteiny vnitřní membrány se 2 a méně α -helixy, proteiny asociované s vnější membránou bez

klasického β -barelu či proteiny sekretované jinak než sekreční drahou typu II (Gardy a kol., 2003). Program **LipoP** je schopný predikovat N-koncovou signální sekvenci, oblast rozeznávanou signálními peptidázami I a II a protein bez signální sekvence. Při predikci lokalizace využívá oblasti signální sekvence, která může být buď v n-oblasti, h-oblasti nebo c-oblasti („lipobox“). Tento program je vhodný pro predikci lokalizace lipoproteinů a míst rozeznávaných signálními peptidázami I a II, dále pak cytoplazmatických a transmembránových proteinů (Juncker a kol., 2003).

K izolaci proteinů jednotlivých buněčných kompartmentů se používá rozdělení v sacharózovém gradientu. Tento gradient se vytvoří postupným vrstvením 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 % a 30 % (w/v – hmotnostní procenta) roztoku sacharózy. Sacharóza je nakonec převrstvena homogenizovaným vzorkem obsahujícím analyzované proteiny a lipoproteiny. Následuje dlouhodobá centrifugace, během které dojde k rozdělení směsi proteinů na jednotlivé frakce podle obsahu proteinů a lipidů. Přítomnost studovaných proteinů v jednotlivých vrstvách je analyzována SDS-PAGE s detekcí stříbrem nebo imunochemicky (Huntely a kol., 2006).

Pro separaci jednotlivých bakteriálních proteinů se používá dvoudimenzionální elektroforézu (2-DE). Touto metodou se proteiny nejprve rozdělí podle svého izoelektrického bodu a následně se dělí podle molekulové hmotnosti (SDS-PAGE). Proteiny lze detekovat buď stříbrem přímo v polyakrylamidovém gelu nebo imunochemicky metodou Western-blot. Takto získané mapy jsou pro daný kmen charakteristické. Dalším krokem může být analýza proteinů hmotnostní spektrometrií. Nejprve jsou jednotlivé body, odpovídající konkrétním proteinům, z SDS gelu izolovány a následně upraveny pro vlastní analýzu. Analýza vzorků probíhá metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-fly) a získaná hmotnostní spektra jsou použita pro identifikaci proteinu (Havlasová a kol., 2005).

K analýze proteinů lze použít i fúzi s reportérovým genem. Proteiny kódované reportérovými geny mají specifickou aktivitu, která slouží k jejich průkazu. Jako příklad cytoplasmatického reportérového genu lze uvést chloramfenikol acetyltransferázu (CAT), která bakterii poskytuje ochranu proti antibiotiku chloramfenikolu. Membránovými reportérovými geny mohou být hybridní protein manitol permeáza-PhoA nebo b-podjednotka F_0 ATPázy. Periplazmatickými reportérovými geny jsou β -laktamáza (bla), která rozkládá penicilin

(http://www.epibio.com/f5_4/f5_4pp.asp) a alkalická fosfatáza (PhoA), která po přidání vhodného substrátu (např. 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát BCIP) umožňuje konverzi bezbarvého substrátu na barevný produkt (Prochazkova a kol., 2005; Mierendorf a kol., 1987).

2.5 Konservovaný hypotetický lipoprotein

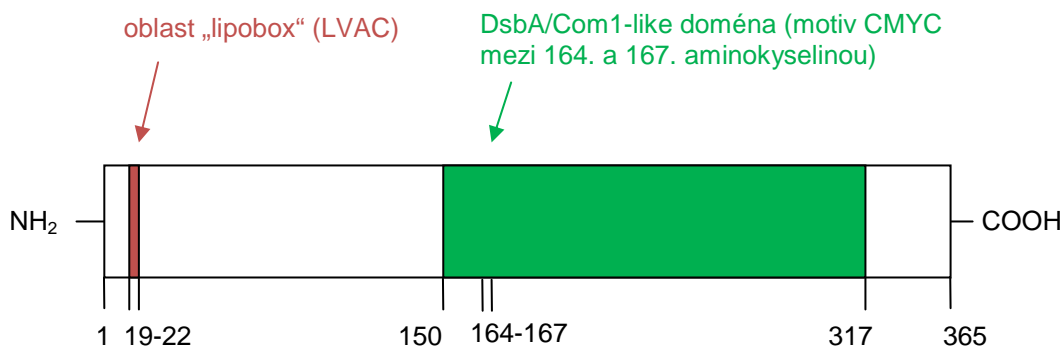
FTT1103 – dosud známá fakta

Protein FTT1103 je tvořen 365 aminokyselinovými zbytky. Jeho teoretická molekulová hmotnost je 38,72 kDa a izoelektrický bod 5,11. Podle výsledků hmotnostní analýzy je jeho reálná molekulová hmotnost 49,82 kDa a izoelektrický bod 4,45. Při analýze využívající 2-DE se protein FTT1103 vyskytuje v několika nábojových a hmotnostních variantách. Podle predikčního programu LipopP je FTT1103 membránový lipoprotein (Janovská a kol., 2007). Obsahující DsbA doménu. Je vysoce pravděpodobné, že jde o periplazmatický lipoprotein (Qin a kol., 2009), čemuž by odpovídalo i to, že jeho N-terminální signální peptid je odštěpován signální peptidázou II (Janovská a kol., 2007). Signální peptidáza I odštěpuje také N-terminální signální peptid, avšak na rozdíl od signální peptidázy II nepřenáší protein na lipidovou kotvu. Proteiny štěpené signální peptidázou I jsou buď sekretované proteiny nebo proteiny ukotvené v membráně další transmembránovou doménou. Proteiny štěpené signální peptidázou II jsou k membráně vázány lipidovou kotvou (Gomez a kol., 1999).

FTT1103 obsahuje motiv CXXC, který je součástí „DsbA-like“ struktur. Patří tedy do skupiny DsbA, podskupiny Com1-like (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>) (Obr. 4). Protein DsbA má disulfid oxidoreduktázovou aktivitu, avšak jeho role v patogenezi je nejasná. DsbA/Com1-like doména je důležitá pro správné sbalení proteinů vnější membrány a sekretovaných proteinů, které mohou sloužit jako toxiny (Strašková a kol., in press).

Lipoprotein FTT1103 spolu s TUL4 a dalšími triacylovanými lipoproteiny jsou schopny aktivovat Toll-like receptory (TLR), konkrétně heterodimer TLR2/TLR1. TLR jsou molekuly na povrchu buněk a v endosomálních kompartmentech, které jsou schopny detekovat produkty bakterií, virů, kvasinek a prvoků. Za stimulaci TLR2/TLR1 je pravděpodobně zodpovědná právě lipidová složka lipoproteinů FTT1103 a TUL4. Oba proteiny jsou s největší pravděpodobností triacylovány.

Podle nedávných výzkumů tyto dva lipoproteiny hrají jednu z hlavních a důležitých rolí při vrozené imunitní odpovědi na infekci vyvolanou *F. tularensis*. Konkrétně lipoprotein FTT1103 je pravděpodobně zodpovědný za humorální imunitní odpověď. Díky stimulaci TLR2/TLR1, která vede k produkci cytokinů, lze TUL4 a FTT1103 považovat za faktory virulence *F. tularensis* (Thakran a kol., 2007).



Obr. 4 **Schematické znázornění lipoproteinu FTT1103.** Červeně lipobox, zeleně DsbA/Com1-like doména, motiv CXXC („DsbA-like“ struktura) mezi aminokyselinami 164 a 167. Čísla udávají pořadí aminokyselinových zbytků (počítáno od N-konce). Oblast „lipobox“ je charakteristická pro membránové lipoproteiny, zatímco DsbA je periplazmatický protein (proto je motiv CXXC typický pro proteiny periplazmy). Písmena L, V, A, C, M, Y označují aminokyseliny – leucin (L), valin (V), alanin (A), cystein (C), metionin (M) a tyrosin (Y).

Nedávné studie ukazují, že nejenom FTL_1096 izolovaný z kmene LVS (označení pro FTT1103 subtypu *holarctica*) je schopen navodit protektivní imunitu. Stejnou vlastnost má i FTT1103 izolovaný z kmene SchuS4. Lipoprotein FTT1103 je zodpovědný za únik *F. tularensis* z fagolysozomu. U mutantních kmenů s nefunkčním FTT1103, bylo pozorováno, že se z fagolysozomů uvolňuje méně bakterií. Ty bakterie, které se přesto uvolnily, byly imunitním systémem rychle odstraněny a rozšíření bakterií do orgánů bylo minimální. Navíc myši, které byly infikovány tímto mutantním kmenem, byly následně ve většině případů imunní vůči infekci divokým typem („wild-type“) kmene SchuS4 (Qin a kol., 2009).

3. Cíl práce

Cíle diplomové práce vycházejí z výsledků a požadavků předcházejícího výzkumu. Hlavním cílem bylo, na základě predikčních algoritmů a s využitím nových přístupů pro studium membránové lokalizace lipoproteinů, potvrdit a určit topologii jednoho z proteinů FTT1103 mikroba *F. tularensis*. Metodami genového inženýrství jsme připravili sérii vektorů jak pro expresi fúzních proteinů, sestávajících z FTT1103 a reportérového enzymu alkalická fosfatáza – PhoA, tak pro expresi volných forem proteinu FTT1103 v plné délce i s chybějící N-terminální signální sekvencí.

Pro určení lokalizace FTT1103 v komplexu vnitřní membrána – periplazmatický prostor – vnější membrána byla využita přirozená aktivita alkalické fosfatázy v periplazmatickém prostoru. Pro tento účel jsme sestrojili expresní vektory s předpokládanou funkční signální sekvencí odvozenou od FTT1103 v porovnání se signální sekvencí PhoA a zároveň jsme připravili vektory bez signálních sekvencí. Důkaz funkční signální sekvence a zároveň ověření lokalizace jsme provedli barevnou detekcí růstu bakterií na tuhém kultivačním mediu obohaceném o substrát pro PhoA.

Kontrolu úrovně exprese proteinů jsme provedli pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s barvením Coomassie Brilliant Blue a zároveň imunochemickým stanovením Western-blot s následnou detekcí proteinů specifickými protilátkami.

4. Experimentální část

4.1 Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

4.1.1 Chemikálie

40 % akrylamid/bis 37,5:1 (akrylamid), Amresco, USA
Agaróza pro DNA elektroforézu, Cambrex, USA
Ampicilin, sodná sůl (Amp), Amresco, USA
Azid sodný (NaN_3), Penta, ČR
Bakteriologický agar (LB-agar), Amresco, USA
Bromfenolová modř, Sigma, USA
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP), Fermentas, Litva
Comassie Brilliant Blue R250 (CBB), Serva, Německo
D-glukosa, bezvodá (glukosa), Amresco, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), Penta, ČR
Dimethylsulfoxid (DMSO), Amresco, USA
Dithiothreitol (DTT), Serva, Německo
DNA polymeráza, Finnzymes, Finsko
dNTPs mix, Fermentas, Litva
Dodecylsulfát sodný (SDS), Amresco, USA
Ethidiumbromid, Amresco, USA
Ethylalkohol, absolutní (etanol), Penta, ČR
Ethylendiamin-tetraoctová kyselina (EDTA), Amresco, USA
Glycerin, bezvodý (glycerin), Penta, ČR
Glycin, Serva/Lachema/Penta, Německo/ČR/ČR
Hydrogenfosforečnan sodný, heptahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), Amresco, USA
Hydroxid sodný (NaOH), Amresco, USA
Chlorid draselný (KCl), Penta, ČR
Chlorid sodný (NaCl), Penta, ČR
Isopropylalkohol (isopropanol), Penta, ČR
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), Alexis, Švýcarsko
Kanamycin sulfát (Kan), Amresco, USA

Koncentrát rychloustalovače, Foma Bohemia spol. s r.o., ČR
 Koncentrát vývojky, Foma Bohemia spol. s r.o., ČR
 Kyselina boritá (H_3BO_3), Penta, ČR
 Kyselina chlorovodíková (HCl), Penta, ČR
 Kyselina kumarová, Sigma, USA
 Kyselina octová (CH_3COOH), Penta, ČR
 LB médium, Amresco, USA
 Luminol, Sigma, USA
 Methylalkohol (metanol), Penta, ČR
 Močovina, Penta, ČR
 N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanosulfonová kyselina (HEPES), Amresco, USA
 N,N,N',N'-tetramylethylendiamin (TEMED), Amresco, USA
 Octan draselný (CH_3COOK), Penta, ČR
 Odtučněné mléko, Bohemilk, ČR
 Peroxid vodíku (H_2O_2), Penta, ČR
 Persíran amonný (APS), Amresco, USA
 Reakční pufr pro DNA polymerázu (HF) , Finnzymes, Finsko
 Reakční pufr pro T4 DNA ligázu – 10x koncentrovaný, Fermentas, Litva
 Restrikční endonukleázy a jejich pufry, Fermentas, Litva
 Roztoky E1-E6 z kitu JETSTAR 2.0, Genomed, Německo
 Sacharóza, Amresco, USA
 λ DNA, Fermentas, Litva
 Standard molekulových hmotností pro SDS PAGE (Prestained Protein Molecular Weight Marker), Fermentas, Litva
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Amresco, USA
 Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Amresco, USA
 Tween 20, Pro Pure, Norsko

Všechny použité chemikálie byly v analytické čistotě.

4.1.2 Roztoky

Ampicilin (Amp; 150 mg/ml):

ampicilin 7,5 g
 destilovaná H_2O 30 ml

Destilovanou H₂O jsme doplnili do 50 ml, zamíchali a filtrovali přes filtr 0,2 µm Corning. Alikvoty jsme uchovávali při -20 °C.

Blokovací roztok:

sušené odtučněné mléko 2,5 g
PBS (10x konc.) 5 ml
destilovaná H₂O doplnit do 50 ml

Blotovací pufr (10x koncentrovaný):

glycin 390 mM
Tris 480 mM
SDS 0,37 % (w/v)

Zásobní roztok jsme uchovávali při 4°C.

Blotovací pufr (1x koncentrovaný):

glycin 39 mM
Tris 48 mM
SDS 0,037 % (w/v)
metanol 20 % (w/v)

Zásobní roztok jsme uchovávali při 4°C a spotřebovali do 1 týdne.

ECL1:

luminol 0,0675 g
DMSO 1,5 ml
kyselina kumarová 0,0555 g
1,5 M Tris (pH=8) 9,99 ml
destilovaná H₂O doplnit do 50 ml

ECL2:

H₂O₂ 91,8 µl
0,1 M Tris-Cl (pH=8,5) 9,99 ml
destilovaná H₂O doplnit do 50 ml

Kanamycin (Kan; 60 mg/ml):

kanamycin 3 g
destilovaná H₂O 30 ml

Destilovanou H₂O jsme doplnili do 50 ml, zamíchali a filtrovali přes filtr 0,2 µm Corning. Alikvoty jsme uchovávali při -20 °C.

Odbarvovací roztok:

metanol 10 % (w/v)
CH₃COOH 10 % (w/v)
destilovaná H₂O doplnit do 100 ml

PBS (10x koncentrovaný):

NaCl 80 g
KCl 2 g
Na₂HPO₄ · 7 H₂O 21,4 g
KH₂PO₄ 2 g
destilovaná H₂O doplnit do 1000 ml

Roztok jsme sterilizovali autoklávováním (121 °C, 20 min) a uchovávali při 4 °C.

Promývací roztok:

PBS
Tween 20 0,05 % (w/v)

Roztok Coomassie Brilliant Blue R-250:

Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25 g
metanol 45 ml
CH₃COOH 10 ml
destilovaná H₂O doplnit do 100 ml

Po rozpuštění jsme roztok přefiltrovali přes filtrační papír.

TB pufr:

HEPES 10 mM

MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

MnCl₂ jsme přidali až po úpravě pH na 6,7 pomocí KOH. Roztok jsme filtrovali přes filtry s velikostí pórů 0,45 µm (4 °C).

TBE pufr (10x koncentrovaný):

Tris	54 g
kyselina boritá	27,5 g
0,5 EDTA (pH=8,0)	20 ml
destilovaná H ₂ O	doplnit do 1000 ml

Tris-glycinový elektrodový pufr (10x koncentrovaný):

Tris	250 mM
glycin	2,5 M
SDS	1 % (w/v)

Vzorkový pufr pro agarózovou elektroforézu (6x koncentrovaný):

bromfenolová modř	0,25 % (w/v)
sacharóza	40 % (w/v)

Alikvoty jsme uchovávali při -20 °C.

Vzorkový pufr pro SDS PAGE (2R – 2x koncentrovaný):

Tris-Cl (pH=6,8)	100 mM
DTT	200 mM
glycerin	20 % (w/v)
SDS	4 % (w/v)
bromfenolová modř	0,2 % (w/v)

Alikvoty jsme uchovávali při -20 °C.

4.1.3 Kity

Jet Quick Gel Extraction Spin Kit (izolace z gelu), Genomed, Německo

JET Star

JET Star (Genomed, Německo):

E1 (resuspendace buněk):

Tris 50 mM

EDTA 10 mM

pH upravené pomocí HCl na 8,0

E2 (lyze buněk):

NaOH 200 mM

SDS 1 % (w/v)

E3 (neutralizace):

octan draselný 3,1 M

pH upravené pomocí CH₃COOH na 5,5

E4 (ekvilibrace kolony):

NaCl 600 mM

octan sodný 100 mM

TritonX-100 0,15 %

pH upravené pomocí CH₃COOH na 5,0

E5 (promytí kolony):

NaCl 800 mM

octan sodný 100 mM

pH upravené pomocí CH₃COOH na 5,0

E6 (eluce DNA):

NaCl 1250 mM

Tris 100 mM

pH upravené pomocí HCl na 8,5

JET Quick (Genomed, Německo):

L1 (rozpuštění gelu):

NaClO₄

octan sodný

TBE-rozpouštěcí roztok

L2 (promytí, rekonstituce):

etanol
NaCl
EDTA
Tris-Cl

4.1.4 Enzymy

T4 DNA ligáza a 10x koncentrovaný T4 DNA ligázový pufr, Fermentas, Litva

RNáza, Fermentas, Litva

DNA Phusion Polymeráza a 5x koncentrovaný Phusion HF pufr, Finnzymes, Finsko

Název endonukleázy	Rozpoznávaná sekvence	Doporučený pufr
<i>Bam</i> HI	G GATCC	<i>Bam</i> HI pufr; Green
<i>Eco</i> 47I (<i>Ava</i> II)	G GWCC	Red
<i>Eco</i> RI	G AATTC	<i>Eco</i> RI pufr; Orange, 2x Tango
<i>Mlu</i> I	A CGCGT	Red
<i>Nco</i> I	C CATGG	1x Tango, 2x Tango
<i>Pst</i> I	CTGCA G	Orange, Red
<i>Pvu</i> II	CAG CTG	Green
<i>Sac</i> I	GAGCT C	<i>Sac</i> I pufr; Blue, 1x Tango
<i>Sal</i> I	G TCGAC	Orange
<i>Sma</i> I	CCC GGG	1x Tango
<i>Xba</i> I	T CTAGA	1x Tango
<i>Xho</i> I	C TCGAG	Red, 2x Tango

Tab. I **Použité restriční endonukleázy, jimi rozpoznávané sekvence a doporučený pufr.** Všechny restriční endonukleázy byly od firmy Fermentas (Litva) a jejich restriční teplota byla 37 °C. G,T,C,A,W označují nukleotidy – guanin (G), thymin (T), cytosin (C), adenin (A) a adenin nebo thymin (W).

Pufry pro restrikční endonukleázy:

*Bam*HI pufr:

Tris-HCl (pH=8,0 při 37 °C)	10 mM
MgCl ₂	5 mM
KCl	100 mM
2-merkaptoetanol	1 mM
Triton X-100	0,02 %
BSA	0,1 mg/ml

Blue pufr:

Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
BSA	0,1 mg/ml

*Eco*RI pufr:

Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
Triton X-100	0.02 %
BSA	0,1 mg/ml

Green pufr:

Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	10 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	50 mM
BSA	0,1 mg/ml

Orange pufr:

Tris-HCl (pH=7,5 při 37 °C)	50 mM
MgCl ₂	10 mM
NaCl	100 mM
BSA	0,1 mg/ml

Red pufr:

Tris-HCl (pH=8,5 při 37 °C) 10 mM
MgCl₂ 10 mM
KCl 100 mM
BSA 0,1 mg/ml

*Sac*I pufr:

Bis-Tris Propan-HCl (pH=6,5) 10 mM
MgCl₂ 10 mM
BSA 0,1 mg/ml

Tango pufr:

Tris-acetát (pH=7,9 při 37 °C) 33 mM
Acetát hořečnatý 10 mM
Acetát draselný 66 mM
BSA 0,1 mg/ml

4.1.5 Protilátky

Monoklonální myší protilátka proti alkalické fosfatáze anti-PhoA (BAP, PhoA; klon BAP-77), myší IgG1 izotyp, Sigma, USA

Polyklonální kozí protilátka proti myší IgG protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou, Southern Biotech, USA

Polyklonální králičí protilátka proti FTT1103, Apronex s.r.o., ČR

Polyklonální kozí protilátka proti králičí IgG protilátce konjugovaná s křenovou peroxidázou, Southern Biotech, USA

4.1.6 Syntetické oligonukleotidy

Pomocí uměle vytvořeného dvojřetězcového adaptoru jsme do plasmidu pET28b obsahující FTT1103 vnesli sekvenci rozpoznávanou *Sal*I restriční endonukleázou (vyznačena tučně).

AD1 – kódující řetězec: 5'-CATGCTGTCGAC-3'

AD2 – komplementární řetězec: 5'-CATGGGTCGACAG-3'

Uměle vytvořené oligonukleotidy jsme využili jako primery pro amplifikaci alkalické fosfatázy PhoA, FTT1103 a FTT1103Δ-PhoA (Tab. II).

Název primeru	Nukleotidová sekvence	Restrikční enzym
FW-PhoA	5'AT <u>CTCGAG</u> CGGGTACCTGACTCTGAC3'	<i>XhoI</i>
R-PhoA	5' <u>TACTCGAGGAGCTC</u> GTAACCTTTCAGCCCCAG3'	<i>XhoI, SacI</i>
FW-FTT1103	5'AT <u>CCATGG</u> ACACTAAGAAAAAACTTTTAAAAGC3'	<i>NcoI</i>
R-FTT1103	5' <u>CACTCGAGT</u> CCTTGGCTGAGCTAATTGC3'	<i>XhoI</i>
FW-FTT1103Δ-PhoA	5' <u>ATTCTAGA</u> ATGGACTCAGATAGTTCTAG3'	<i>XbaI</i>

Tab. II **Seznam použitých primerů.** Tučně je vyznačena sekvence rozeznávaná uvedenou restrikční endonukleázou.

Všechny použité oligonukleotidy byly dodány jako jednořetězcové DNA v lyofilizované formě (GeneriBiotech, ČR). Před použitím jsme je rozpustili dle pokynů výrobce v destilované vodě na výslednou koncentraci 0,1 mM.

4.1.7 Gely

Agarózový gel 0,6 % s ethidiumbromidem:

agaróza 2,4 g
TBE doplnit do 400 ml
ethidiumbromid 20 µl

Agarózový gel 1 % s ethidiumbromidem:

agaróza 4 g
TBE doplnit do 400 ml
ethidiumbromid 20 µl

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE:

akrylamid (40 %) 0,4 ml
Tris (1 M, pH=6,8) 1,25 ml

destilovaná H₂O 3,25 ml
SDS (10 %) 50 µl
APS (10 %) 50 µl
TEMED 5 µl

Dělicí gel pro SDS-PAGE (12 %):

akrylamid (40 %) 1,5 ml
Tris (1,5 M, pH=8,8) 1,25 ml
destilovaná H₂O 2,20 ml
SDS (10 %) 50 µl
APS (10 %) 50 µl
TEMED 1,8 µl

Dělicí gel pro SDS-PAGE (10 %):

akrylamid (40 %) 1,25 ml
Tris (1,5 M, pH=8,8) 1,25 ml
destilovaná H₂O 2,45 ml
SDS (10 %) 50 µl
APS (10 %) 50 µl
TEMED 1,8 µl

4.1.8 Kultivační média

LB-agarová půda (Luria-Bertani):

agar 1,8 g
LB médium 2 g
destilovaná H₂O doplnit do 100 ml

Půdu jsme sterilizovali autoklávováním (121 °C, 20 min).

Tekuté LB médium:

LB médium 20 g
destilovaná H₂O doplnit do 1000 ml

Médium jsme sterilizovali autoklávováním (121 °C, 20 min)

SOB:

Bacto Tryptone	2 % (w/v)
kvasničný extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM

Sterilizovali jsme autoklávováním (121 °C, 20 min) a potom přidali:

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

4.1.9 Plazmidy

Plazmid pET28b (5368 bp) obsahuje T7-promotor a T7-terminátor, na N- i C-konci plazmidu je sekvence kódující histidinovou kotvu (His-Tag), na N-konci je sekvence pro T7-kotvu (T7-Tag) a nese gen zajišťující rezistenci na antibiotikum kanamycin.

Plazmid pTZ19R (2862 bp) obsahuje T7-promotor a *bla* gen, který zajišťuje rezistenci na antibiotikum ampicilin.

Plazmid pSWFII nese gen pro alkalickou fosfatázu (Ehrman a kol., 1990).

4.1.10 Bakteriální kmeny

Pro transformaci a vytvoření fúzních proteinů jsme používali kmen *E.coli* XL1-Blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*.

Kontrolu exprese jednotlivých proteinů jsme prováděli v kmenu *E.coli* BL21(λDE3) *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)*.

4.1.11 Použité přístroje a pomůcky

Autokláv FN 120, Nüve, Turecko

Autokláv MLS 3750, Sanyo, Belgie

Automatické pipety BioPette, Labnet, USA, Velká Británie

Automatické pipety CAPP autoclavable, CAPP, Německo

Automatické pipety Gilson pipetman, Gilson, USA

Bio-Imaging Systém MiniBis Pro, DNR Bio-imaging systems, Izrael

Blotter TE70XP, Hoefer, USA

Centrifuga 5415R, Eppendorf, Německo

Centrifuga mikro 200, Hettich zentrifugen, Německo

Centrifuga Rotanta 460R, Hettich zentrifugen, Německo

Centrifuga Sigma 3-18K, Sigma, Německo
Digitální váhy EW 150-3M, Kern&Sohn GmbH, Německo
Elektroforetická vana s podložkou a těsnícími klíny, Hoefer, USA
Film MEDIX XBU, Foma Bohemia spol. s r.o., ČR
Fólie, GE, Velká Británie
Horizontální elektroforéza HE33, Hoefer, USA
Chladicí box (-4 °C), Caravell, Dánsko
Injekční stříkačka, Hamilton, USA
Jehla, Hamilton, USA
Kazeta na vyvolávání filmů, Japonsko
Kolona DyeEx™ 2.0 Spin Column, Qiagen, Německo
Kolona z kitu JETSTART 2.0 , Genomed, Německo
Kývačka Rocker 35A, Labnet, USA, Velká Británie
Magnetické míchadlo MR Hei-Mix S, Heidolph, Německo
Mikrovlnná trouba ZMC 19M, Zanussi, Itálie
Mrazicí box (-20 °C), Liebherr Comfort, Německo
Mrazicí box (-20 °C), Liebherr Premium, Německo
Mrazicí box (-80 °C) Platinum 340, Angelantoni industrie AS Biomedical
Division, Itálie
Nitrocelulózová membrána, PALL Life Sciences BioTrace NT, USA
pH metr pH211 Microporcessor, pH metter HANNA instruments, Itálie
Plynový kahan, Kavalier, ČR
Příslušenství pro vertikální SDS-PAGE elektroforézu (skla, hliníkové destič-
ky, svorky, spacers a hřebeny), Hoefer/Amarsham Biosciences (GE)/GE
Healthcare Bio-Sciences Corp., USA/Velká Británie/Velká Británie
Spektrofotometr Lightwave II, WPA, Nizozemsko
Spektrofotometrické kyvety 302100, Deltalab, Španělsko
Termoblok Digital Dry Bath, Labnet, USA, Velká Británie
Termostat EN 055, Nüve, Turecko
Termostat GallenKamp, GallenKamp, Velká Británie
Třepačka GallneKamp, GallenKamp, Velká Británie
Třepačka OS-10 Orbital Shaker, Biosan, Litva
Třepačka vortex VX100, Labnet, USA

UV transluminátor UVT-20M/W, Herolab, Německo
Vertikální elektroforéza SE250, Hoefer, USA
Vodní lázeň-termostatovaná BM 302, Nüve, Turecko
Zdroj elektrického napětí pro agarózovou elektroforézu EC105, Thermo Electron Corporation, USA
Zdroj elektrického napětí pro agarózovou elektroforézu Power Station 300, Labnet, USA
Zdroj elektrického napětí pro SDS-PAGE elektroforézu EPS301, GE, Velká Británie
Zdroj elektrického napětí pro SDS-PAGE elektroforézu Power Station 300, Labnet, USA

Při práci jsme používali běžný laboratorní plastik a vybavení.

4.2 Metody a pracovní postupy

4.2.1 Příprava superkompetentních buněk *E.coli*

Na tuhou LB-agarovou půdu jsme nanесли příslušný kmen *E.coli* a kultivovali (37 °C, přes noc). Tři kolonie jsme přenesli do 50 ml kompletního SOB a kultivovali při soustavném třepání (37 °C, přes noc, třepačka Biosan OS-10, 200-250 rpm/min). Přenesli jsme 5 ml z nočního inokula do 500 ml kompletního SOB a následně kultivovali při soustavném třepání do optické denzity $OD_{600} = 0,6$ (18-20 °C, třepačka Gallenkamp 200-250 rpm/min). Po dosažení optické denzity $OD_{600} = 0,6$ jsme přemístili Erlenmayerovu baňku na 10 min na led. Kulturu jsme rozdělili po 30 ml do 50 ml zkumavek (16 zkumavek) a centrifugovali (2 500g/4 °C/10 min). Supernatant jsme odstranili, sedimenty resuspendovali ve 20 ml TB roztoku o teplotě 4 °C, nechali inkubovat (4 °C, 10 min) a opět centrifugovali (2 500g/4 °C/7 min). Supernatant jsme opět odstranili a sedimenty resuspendovali ve 4 ml TB roztoku o teplotě 4 °C. Obsah každých 4 zkumavek jsme spojili dohromady a přidali 1,1 ml DMSO (konečná koncentrace 7 % (v/v)). Suspenzi jsme inkubovali (4 °C, 10 min), rozplnili do mikrozkušavek po 200 µl a rychle zamrazili ponořením do tekutého dusíku. Buňky jsme uchovávali při -80 °C.

4.2.2 Transformace plazmidové DNA do superkompetentních buněk

Na ledu jsme nechali rozehrát suspenzi superkompetentních buněk (BL21 λ DE3 nebo XL1) a plazmidovou DNA (po rozehrání nutně důkladně zamíchat). Do předem vychlazené mikrozkušavky jsme nepipetovali 50 μ l buněk a 1 μ l plazmidové DNA, příp. 5 μ l ligační směsi. Po jemném promíchání jsme nechali buněčnou suspenzi inkubovat (4 °C, 20 min), opět jemně promíchali a vystavili teplotnímu šoku (42 °C, 1 min). K suspenzi jsme okamžitě přidali 1 ml vychlazeného LB média a nechali inkubovat (37 °C, 1 h). Na tuhou LB-agarovou půdu s příslušným antibiotikem jsme vyseli 50 μ l buněčné suspenze a nechali inkubovat v závěsné poloze (37 °C, přes noc).

4.2.3 Izolace plazmidové DNA

4.2.3.1 Miniprepce plazmidové DNA

Po úspěšné transformaci (4.2.2) byla jedna kolonie přenesena do 3 ml LB média s příslušným antibiotikem a za soustavného třepání inkubována (37 °C, 200-250 rpm/min, přes noc). Do mikrozkušavky jsme přenesli 1,5 kultury, centrifugovali (13 200 rpm/ laboratorní teplota - RT/1 min), supernatant jsme odstranili a sediment jsme nechali na stole okapat. Sediment jsme pomocí vortexu resuspendovali ve 100 μ l roztoku SOL I a inkubovali (RT, 5 min). Buňky jsme lyzovali 150 μ l roztoku SOL II, jemně promíchali a inkubovali (4 °C, 5 min). Přidali jsme 150 μ l roztoku SOL III, promíchali vortexem a inkubovali (4 °C, 15 min). Lyzované buňky jsme centrifugovali (13 200 rpm/4 °C/15 min) a následně přenesli 400 μ l supernatantu do nové zkumavky. K supernatantu jsme přidali 400 μ l isopropanolu, důkladně promíchali pomocí vortexu, inkubovali (4 °C, 2 min) a centrifugovali (13 200rpm/4 °C/5-15 min). Supernatant jsme vylili a sediment nechali na stole okapat. Zkumavku jsme propláchli 1 ml etanolu (70 %) a po odstranění etanolu jsme sediment vysušili v termobločku (55-60 °C, cca 5 min). Supernatant jsme rozpustili v 40 μ l roztoku TE s pankreatickou RNázou, mírně zamíchali a inkubovali (70 °C, 30 min). Vzorek plazmidové DNA jsme uchovávali při -20 °C.

4.2.3.2 Midiprepce plazmidové DNA

Po transformaci (4.2.2) jsme několik kolonií přenesli do 50 ml LB média s příslušným antibiotikem a za soustavného třepání nechali inkubovat (37 °C, 200-250 rpm/min, přes noc). Centrifugací (4 000 rpm/4 °C/10 min) jsme od-

dělili buňky, které jsme následně resuspendovali ve 4 ml roztoku E1. Postupně jsme přidali roztoky E2 a E3 a inkubovali (RT, vždy po 5 min). Vzniklou suspenzi jsme promíchali a centrifugovali (8 000 rpm/16 °C/10 min), čímž jsme odstranili všechny nežádoucí příměsi. Supernatant byl přes gázu přenesen na kolonku, kterou jsme předem ekvilibrovali 10 ml roztoku E4. Kolonku jsme promyli 10 ml roztoku E5 a následně eluovali DNA 5 ml roztoku E6 do 15 ml zkumavky. Pro vysrážení DNA jsme přidali 4-4,5 ml isopropanolu, promíchali a inkubovali (RT, 20 min). Suspenzi jsme centrifugovali (8 000 rpm/18 °C/15 min). Po odstranění supernatantu jsme zkumavku propláchli 3-5 ml etanolu (75 %), opět centrifugovali (8 000 rpm/18 °C/5 min) a sediment následně vysušili v termobločku (55-60 °C, cca 15 min). Po úplném odpaření etanolu jsme sediment resuspendovali v 50 µl destilované vody a uchovávali při -20 °C.

4.2.4 Manipulace s plazmidovou DNA

4.2.4.1 Příprava dsDNA syntetických oligonukleotidů

Lyofilizované ssDNA oligonukleotidy (GeneriBiotech, ČR) jsme před použitím rozpustili ve sterilní destilované vodě na výslednou koncentraci DNA 0,1mM. Pro vytvoření dsDNA oligonukleotidů jsme nejprve obě ssDNA zahřáli ve vodní lázni (70 °C, 5 min), potom smíchali oba ssDNA oligonukleotidy v poměru 1:1 a vzniklou směs opět zahřáli ve vodní lázni (70 °C, 20 min). Tuto směs jsme nechali pomalu vychladnout na laboratorní teplotu.

4.2.4.2 Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami

Plazmidovou DNA (5 µg) jsme smíchali s 1-2 µl restrikčního enzymu (Fermentas, Litva) a 3 µl 10x koncentrovaného příslušného reakčního pufru (Fermentas, Litva). Destilovanou vodou jsme doplnili celkový objem do 30 µl. Směs jsme důkladně promíchali a inkubovali při vhodné teplotě (pro většinu používaných enzymů 37 °C, 1-2 h). Dalším krokem byla agarózová elektroforéza, případně jsme reakční směs uchovávali při -20 °C.

4.2.4.3 Defosforylace 5'-konců lineární plazmidové DNA

K 20 μl reakční směsi (4.2.4.2) jsme přidali 1 μl CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase; Fermentas, Litva) a inkubovali (37 °C, 30 min). Potom jsme celou směs aplikovali na agarózovou elektroforézu.

4.2.4.4 Ligace fragmentů DNA

Do mikrozkušavky s 2 μl linearizované plazmidové DNA (může být defosforylovaná) jsme přidali 8 μl inzertu. Poměr inzertu a vektoru by měl být 1:1, případně inzert v mírném nadbytku. Ke směsi jsme dále přidali 2 μl 10x koncentrovaného T4-ligačního pufru (Fermentas, Litva) a 1-2 μl T4 DNA ligázy (Fermentas, Litva). Destilovanou vodou jsme směs doplnili do objemu 20 μl a důkladně promíchali. Ligační směs jsme inkubovali přes noc při 4 °C nebo minimálně 2 h při 18 °C.

4.2.4.5 Amplifikace fragmentů plazmidové DNA metodou PCR

Do mikrozkušavky pro amplifikaci DNA metodou PCR jsme pipetovali takové množství templátové DNA, aby její množství bylo 1 pg – 10 ng/50 μl a přidali jsme 10 μl HF pufru (Phusion pufr, Finnzymes, Finsko). Příslušné primery (GeneriBiotech, ČR) jsme přidali v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace byla 0,5 μM (tj. 2,5 μl primeru o koncentraci 10 μM). Ke směsi jsme přidali 0,8 μl dNTP a 0,5 μl DNA polymerázy (Phusion polymeráza, Fermentas, Litva). Destilovanou vodou jsme doplnili do celkového objemu 50 μl . Směs pro PCR jsme připravovali na ledu. V přístroji pro PCR proběhla nejprve úvodní denaturace templátové DNA (98 °C, 30 s) a potom 30 cyklů, ve kterých se střídaly tyto fáze: denaturační (98 °C, 10 s), nasedání primerů (45-72 °C dle teploty tání primerů, 30 s) a polymerační fáze (72 °C, 30 s). Následovala ještě finální polymerace (72 °C, 10 min) a potom postupné ochlazení na 4 °C.

4.2.5 Elektroforéza v agarózovém gelu

4.2.5.1 Příprava λ DNA standardu molekulových velikostí

Pro přípravu 1000 μl (případně 250 μl) jsme k 400 μl (100 μl) λ DNA přidali 100 μl (25 μl) pufru orange a 80 μl (20 μl) restriktivní endonukleázy *Pst*I (Fermentas, Litva). Destilovanou vodou jsme směs doplnili do celkového objemu (tj. 420 μl ,

resp. 105 μ l). Restrikční směs jsme důkladně promíchali a nechali štěpit 2 hodiny při 37 °C. Poté jsme restrikční směs obarvili 160 μ l (40 μ l) bromfenolové modří a rozpipetovali na jednotlivé alikvoty.

4.2.5.2 Příprava gelu, průběh elektroforézy a detekce DNA

Podle velikosti separovaných fragmentů DNA jsme si připravili agarózový gel o koncentraci 0,6 % (w/v) nebo 1 % (w/v) a přidali do něj ethidiumbromid, tak aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 μ g/ml. Gel jsme zahřáli v mikrovlnné troubě do úplného rozvaření agarózy. Po tom, co agaróza částečně vychladla, jsme gel nalili do utěsněné elektroforetické vany a vložili do něj hřeben s potřebným množstvím jamek. Gel jsme následně nechali tuhnout při laboratorní teplotě. Ze ztuhlého gelu jsme vyjmuli hřeben, gel přenesli do elektroforetické vany a převrstvili 1x koncentrovaným TBE pufrům. Do jamek jsme napipetovali 5 μ l standardu molekulových velikostí λ DNA (štěpený restrikčním enzymem *Pst*I) a vzorky DNA naředěné vzorkovým pufrům LD (leading DNA pufr, 6x koncentrovaný). Přístroj jsme následně uzavřeli, připojili ke zdroji napětí a nechali procházet napětí 80-100 V. Po době potřebné k dostatečnému rozdělení fragmentů DNA (cca 1 h), jsme odpojili zdroj napětí a celý gel jsme přenesli na transluminátor, kde jsme pod UV světlem pozorovali proužky DNA. Všechny gely byly zaznamenány pomocí přístroje Bio-Imaging Systém MiniBis.

4.2.6 Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu

K izolaci fragmentů DNA z agarózového gelu jsme použili kit JETQuick (Genomed, Německo). Na UV transluminátoru jsme vyřízli pruhy agarózy, které obsahují námi hledané fragmenty DNA, a přenesli je do předem zvážených mikroz-kumavek. Na každých 100 mg gelu jsme přidali 300 μ l roztoku L1 a inkubovali (50 °C, 15 min). Během inkubace jsme směs občas promíchali, aby se agaróza lépe rozpustila. Do sběrné zkumavky jsme umístili kolonku pro izolaci DNA z agarózového gelu a přenesli na ni 600 μ l vzniklé suspenze. Následovala centrifugace (12 000g/1 min), po které jsme vylili propad a bylo-li to nutné, nanесли jsme zbytek suspenze opět na kolonku a centrifugovali. Poté jsme na kolonku nanесли 500 μ l roztoku L2, centrifugovali (12 000g/1 min) a propad opět vylili. Kolonku jsme centrifugovali ještě jednou „nasucho“ (12 000g/1 min). Poté jsme kolonku přenesli do

čisté mikrozkuhavky a doprostřed sorpční hmoty jsme napipetovali 50 μ l destilované vody přehřáté na 70 °C. Kolonku jsme opět centrifugovali (12 000g/2 min) a takto izolovanou DNA jsme uchovávali při -20 °C.

4.2.7 Kontrola exprese proteinu

Provedli jsme transformaci (4.2.2) do buněčného kmenu *E. coli* BL21 λ DE3, druhý den jsme několik kolonií přenesli do 50 μ l LB média s příslušným antibiotikem a za soustavného třepání nechali inkubovat (37 °C, 200-250 rpm/min, přes noc). Odebrali jsme 100-150 μ l nočního inokula a přenesli jej do 10 ml LB média s příslušným antibiotikem. Za soustavného třepání jsme buňky inkubovali (37 °C, 200-250 rpm/min) a průběžně měřili optickou densitu OD₆₀₀ (jako slepý vzorek jsme použili čisté LB medium). Jakmile byla OD₆₀₀=0,6-0,1, odebrali jsme 1 ml bakterií do mikrozkuhavky a zbytek bakterií jsme indukovali k produkci proteinu přidavkem IPTG do výsledné koncentrace 1 mM. Spolu s IPTG jsme bakterie inkubovali (37 °C, 3-4 h) a následně opět odebrali 1 ml bakterií. Pokaždé jsme 1 ml odebraných bakterií centrifugovali (13 200/1 min) a sediment resuspendovali ve 100 μ l pufru 8 M močovina, 50 mM Tris-HCl pH=8, 1 % SDS a přidali jsme vzorkový pufr 2R (5x koncentrovaný). Všechny vzorky jsme následně analyzovali pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu.

4.2.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Dle návodu jsme si připravili aparaturu pro přípravu SDS-PAGE. Nejprve jsme si připravili dělicí gel a potom zaostřovací gel. Hustotu obou gelů jsme volili podle relativní molekulové hmotnosti proteinů. Ihned po přidání APS a TEMEDu jsme gel nalili mezi připravená skla a nechali polymerovat. Nejprve jsme nalili gel dělicí, který jsme převrstvili 1 ml butanolu nasyceného destilovanou vodou. Po ztuhnutí gelu jsme butanol odstranili a dosušili pomocí filtračního papíru. Následně jsme si připravili a nalili a gel zaostřovací a ponořili do něho hřebínek odpovídající potřebnému množství jamek. Když zpolymeroval i gel zaostřovací, přenesli jsme skla s SDS-PAGE gelem do aparatury pro vertikální elektroforézu, kterou jsme naplnili elektrodovým pufrem a tímto pufrem zalili i jamky. Vzorek proteinu s 2R pufrem jsme zahřáli (100 °C, 5 min) a následně aplikovali na SDS-PAGE gel. Do první jamky jsme napipetovali 5 μ l standardu molekulových hmotností pro SDS-PAGE, do ostatních jamek 5-20 μ l vzorků. Aparaturu jsme připojili ke zdroji napětí a nechali

procházet napětí 80 V, dokud vzorek neprošel zaostřovacím gelem. Jakmile vzorek doputoval do gelu dělicího, zvýšili jsme napětí na 150 V. Elektroforézu jsme nechali probíhat, dokud čelo nedosáhlo spodního okraje gelu. Potom jsme vyjmuli skla s SDS-PAGE gelem z aparatury pro vertikální elektroforézu a opatrně odstranili skla a zaostřovací gel. Dělicí gel jsme barvili pomocí Coomassie Brilliant Blue (CBB) nebo z něho proteiny přenesli na membránu metodou Western blot.

4.2.9 Barvení SDS-PAGE gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

SDS-PAGE gel jsme ponořili do roztoku Coomassie Brilliant Blue (CBB) a nechali barvit (10-60 min). Když byl gel dostatečně obarven, odstranili jsme roztok CBB a gel nechali odbarvovat v odbarvovacím roztoku. Barvení i odbarvování jsme prováděli na kývačce, abychom umožnili co nejlepší obarvení, případně odbarvení. Odbarvovací roztok jsme během odbarvování několikrát vyměnili a po dostatečném odbarvení jsme gel přenesli do destilované vody. V destilované vodě jsme si namočili i celofán, který jsme použili k uzavření gelu do rámu a jeho vysušení.

4.2.10 Imunochemická detekce proteinů na membráně (Western-blot)

Připravili jsme si nitrocelulózovou membránu o rozměrech přibližně o 10 % větších, než jsou rozměry SDS-PAGE gelu (v našem případě 6x9 cm) a také dva watman filtrační papíry o stejných rozměrech jako membrána. Po odstranění ochranných papírů z membrány jsme ji ponořili do blotovacího pufru (5 min) a blotovacím pufrem jsme nasýtili také filtrační papíry. Na elektrodu blotovacího přístroje jsme složili blotovací sendvič v pořadí od anody: filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír. Tlakem jsme opatrně odstranili případné vzduchové bubliny. Blotovací sendvič jsme uzavřeli víkem s druhou elektrodou a aplikovali konstantní proud 50 mA po dobu 60 min. Po přenosu proteinů lze membránu uchovávat ve fólii při -20 °C nebo ji rovnou barvit protilátkami proti cílovému proteinu.

Pro detekci proteinu na membráně pomocí protilátek jsme museli nejprve zablokovat místa nescifických interakcí pomocí blokovacího roztoku (45 min, RT, na kývačce). Membránu jsme po zablokování promyli roztokem PBS a inkubovali s odpovídající primární protilátkou (1 h, RT, kývačka). Následně jsme membránu promyli promývacím roztokem (3x15 min) a inkubovali se sekundární protilátkou (GAM_{Px} nebo GAR_{Px}) naředěnou 20 000x do roztoku 1 % mléka v promývacím roztoku (45 min, RT, kývačka). Sekundární protilátka je konjugována

s křenovou peroxidázou, která umožňuje detekci. Po inkubaci se sekundární protilátkou jsme membránu promyli v promývacím roztoku, který jsme několikrát během promývání vyměnili (45 min, RT, kývačka). Jakmile jsme membránu dostatečně promyli, smíchali jsme si v temné komoře 1 ml roztoku ECL1 a 1 ml roztoku ECL2 a vzniklou směs jsme ihned aplikovali na membránu, kterou jsme předem osušili. Membránu jsme nechali se substrátem pro křenovou peroxidázu inkubovat 60 s, potom přebytek substrátu vysušili a membránu uložili do fólie. K membráně jsme přiložili film, kazetu uzavřeli a exponovali dle potřeby 10 s-30 min. Potom jsme exponovaný film přenesli do nádoby s vývojkou a nechali jej inkubovat, dokud se neobjevily tmavé proužky. Film jsme následně přenesli do nádoby s rychloustalovačem a inkubovali (cca 1 min). Aby nedocházelo k poškození filmu vlivem rychloustalovače, důkladně jsme jej opláchli pod tekoucí vodou. Film jsme nechali oschnout a potom na něj vyznačili jednotlivé pozice standardu molekulových hmotností a odečetli specifický signál (Sambrook a kol., 1989)

4.2.11 Glycerolové bakteriální konzervy

Několik bakteriálních kolonií, které obsahovaly správnou plazmidovou DNA, jsme přenesli do 750 μ l 40 % glycerolu. Takto vytvořenou konzervu jsme dlouhodobě uchovávali při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.12 Příprava sekvenční PCR

Pro sekvenaci DNA jsme si na ledu namíchali dvě směsi DNA s primery a BD kitem. V jedné směsi jsme použili 3 μ l primeru pET28b-UP a ve druhé stejný objem primeru pET28b-TERM. Objem použité midiprepové DNA jsme volili tak, aby její hmotnost ve výsledné směsi byla cca 100 ng. Přidali jsme 8 μ l BD kitu a destilovanou vodou doplnili do 20 μ l. Na PCR cyklu jsme nastavili tyto parametry: denaturace při $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 s), nasedání primerů při $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 s), polymerace při $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 min) a nechali jsme proběhnout 25 cyklů. PCR směs jsme následně přečistili pomocí kolony DyeExTM 2.0 Spin Column. Kolonu jsme před použitím mírně protřepali, povolili horní uzávěr a spodní uzávěr kolony odlomili. Kolonu jsme přemístili do sběrné zkumavky a centrifugovali (720 rpm/3 min). Po centrifugaci jsme kolonu přemístili do čisté zkumavky, doprostřed napipetovali 20 μ l PCR směsi a opět centrifugovali (680 rpm/3 min). Takto připravenou směs jsme nechali analyzovat sekvenčním servisním pracovištěm na Mikrobiologickém ústavu AV ČR.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Příprava expresních vektorů

Výsledky získané predikčním programem LipoP ukazují, že FTT1103 je membránově lokalizovaný lipoprotein. Motiv DsbA, naznačuje, že by se alespoň jeho část mohla nacházet v periplazmě. Pro zjištění přesnější lokalizace a topologie lipoproteinu FTT1103 jsme zvolili strategii vytvoření fúzního proteinu, kdy jsme fúzovali rekombinantní lipoprotein FTT1103 s reportérovým genem pro alkalickou fosfatázu PhoA (Prochazkova a kol., 2005; www.sci.sdsu.edu). Gen pro alkalickou fosfatázu jsme získali z vektoru pSWFII (Ehrmann a kol., 1990). Fúzní proteiny jsme vytvořili v plazmidu pET28b a následně je pomocí restričních endonukleáz přenesli do vektoru pTZ19R, který jsme použili pro kontrolu exprese rekombinantních proteinů a jejich detekci. Vektor pET28b-FTT1103 s N-terminální signální sekvencí i bez ní byl připraven firmou Apronex s.r.o. V případě fúzního proteinu FTT1103 bez signální N-terminální sekvence s PhoA jsme použili odlišnou strategii. Celý fragment jsme amplifikovali metodou PCR a jako templát jsme použili vektor obsahující FTT1103 fúzovaný s PhoA. Získané vektory jsou uvedeny v tab. III. Podrobnější strategie tvorby jednotlivých fúzních proteinů jsou uvedeny v dalším textu. Bakterie nesoucí plazmid pET28b jsme kultivovali na médiu obsahující kanamycin, ty které nesly plazmid pTZ19R jsme kultivovali na médiu s ampicilinem.

Alkalická fosfatáza (PhoA) umožňuje defosforylaci 5- a 3- fosfátové skupiny. Jako substrát pro PhoA může sloužit např. 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát (BCIP). Bezbarvý BCIP se působením PhoA přemění na modrý precipitát (Prochazkova a kol., 2005; Gomez a kol., 2000). Tohoto jevu jsme využili i při přímém určení enzymové aktivity periplazmaticky produkované PhoA a tím i topologie lipoproteinu FTT1103. Je-li PhoA lokalizována v cytoplazmě, je enzymatická aktivita velmi nízká a naopak je-li PhoA lokalizována v periplazmě, je její aktivita vysoká (Ehrman a kol., 1990; Gilmore a kol., 2004). Bakterie obsahující funkční PhoA v přirozené formě nebo ve formě fúzního proteinu FTT1103 s funkční N-terminální signální sekvencí jsou detekovány tmavě modré kolonie (Gomez a kol., 2000). Exprimované rekombinantní proteiny jsme detekovali také metodou Western-blot a barvením SDS-PAGE gelu CBB.

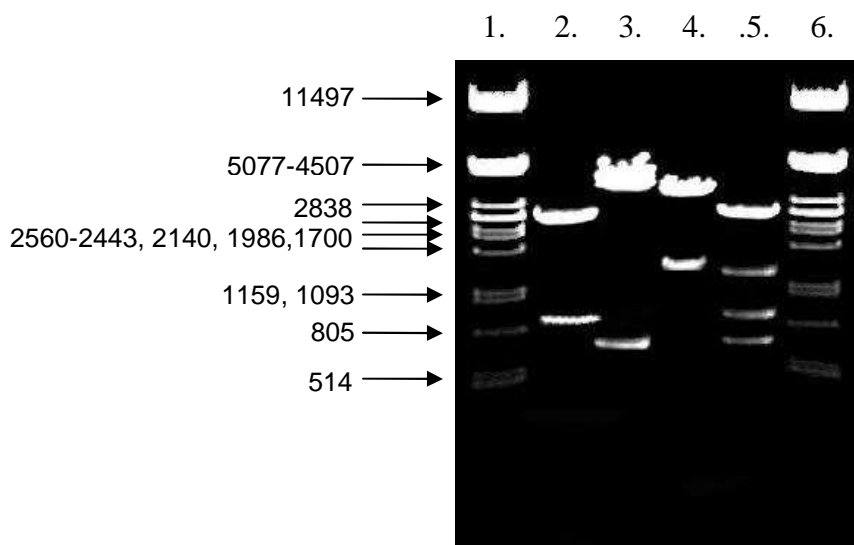
U všech vytvořených vektorů jsme restriční analýzou ověřovali správnost zaklonovaných inzertů. Velikosti fragmentů jsou uvedeny v tab. IV a výsledky štěpení reprezentované elektroforézou v agarosovém gelu jsou na obr. 5.

Název vektoru	Kódované proteiny	Barevné kolonie
pTZ19R-PhoA	PhoA	+
pTZ19R-FTT1103-AD	FTT1103	-
pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA	PhoA, FTT1103	+
pTZ19R-FTT1103 Δ -PhoA	PhoA, FTT1103 Δ	-

Tab. III **Vytvořené fúzní vektory.** Název vektoru je používané označení jednotlivých vektorů; kódované proteiny jsou ty, pro něž jsou na vektoru geny; barevné kolonie (+) jsme pozorovali v případě, že PhoA je lokalizována do periplazmatického prostoru, bezbarvé kolonie (-) jsme pozorovali při lokalizaci PhoA v cytoplazmě. FTT1103 je protein s N-koncovou signální sekvencí, FTT1103 Δ je protein bez N-koncové signální sekvence a PhoA je alkalická fosfatáza.

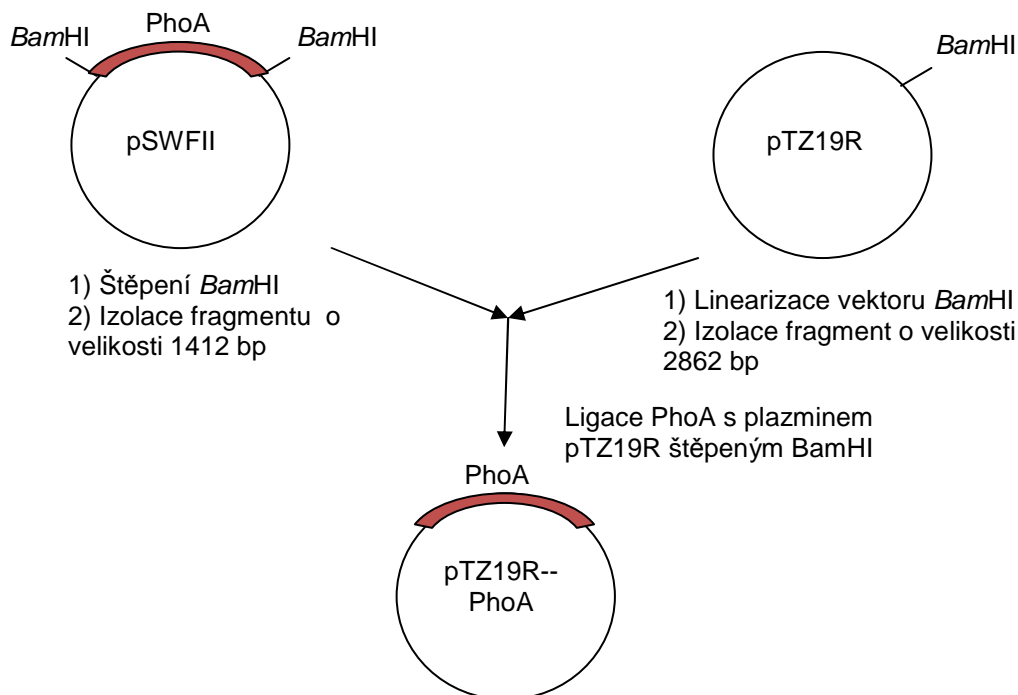
vektor	restriční endonukleáza	Fragmenty po štěpení	
		správné	špatné
pTZ19R-PhoA	<i>PvuII</i>	2513, 886,875	2513,1013,748
pTZ19R-FTT1103-AD	<i>EcoRI</i>	3310, 657	3453, 514
pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA	<i>EcoRI</i>	3313, 1409, 331, 300	2862
pTZ19R-FTT1103 Δ -PhoA	<i>PvuII</i>	2513, 1220, 870, 689	2513, 349

Tab. IV **Fragmenty DNA při kontrolním štěpení vektorů.** Po štěpení vytvořených vektorů restričními endonukleázami jsme na agarózové elektroforéze zaznamenali správné fragmenty. Pokud bychom zaznamenali špatné fragmenty, znamenalo by to, že orientace zaklonovaného inzertu je chybná, nebo že inzert není zaklonován vůbec a na agarózové elektroforéze pozorujeme pouze linearizovaný plazmid.



Obr. 5 **Fotografie agarózového gelu (0,6 %) s vektory**, které byly kontrolně štěpeny restričními endonukleázami. V jamkách č. 1. a 6. je standard velikostí molekul λ -DNA, v jamce č. 2. je vektor pTZ19R-PhoA štěpený enzymem *PvuII*, v jamce č. 3. je vektor pTZ19R-FTT1103-AD štěpený enzymem *EcoRI*, v jamce č. 4. je vektor pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA štěpený enzymem *EcoRI* (fragmenty 331bp a 300 bp nejsou patrné) a v jamce č. 5. je vektor pTZ19R-FTT1103 Δ -PhoA štěpený enzymem *PvuII*. Velikosti standardu molekulových velikostí λ -DNA jsou uvedeny vlevo vedle obrázku, velikosti fragmentů jsou uvedeny v tab IV.

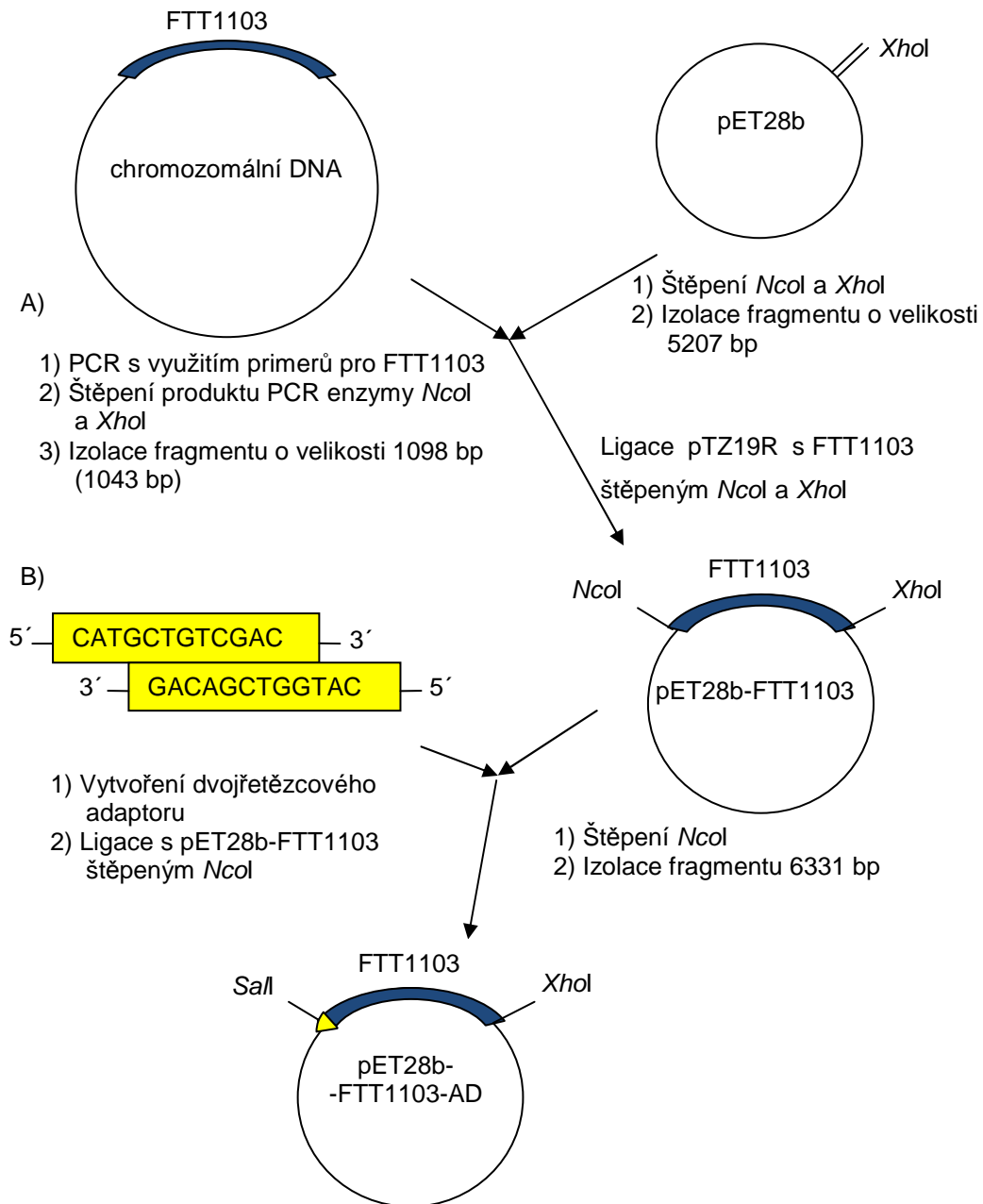
Strategie vytvoření vektoru pTZ19R-PhoA je znázorněna na obr. 6. Zdrojem PhoA byl plazmid pSWFII, ze kterého jsme alkalickou fosfatázou vyštěpili pomocí restriční endonukleázy *BamHI*. Plazmid pTZ19R obsahuje pouze jednu sekvenci rozeznávanou restriční endonukleázou *BamHI* a to v multiklonovacím místě. Vzhledem k tomu, že jsme k vložení PhoA do plazmidu pTZ19R používali pouze jeden enzym, bylo nutné ověřit, zda má vložená DNA sekvence PhoA správnou orientaci. Tuto kontrolu jsme provedli restriční analýzou s využitím enzymu *PvuII*. Po amplifikaci tohoto vektoru midiprepací jsme opět provedli kontrolní štěpení restriční endonukleázou *PvuII* (Obr. 5).



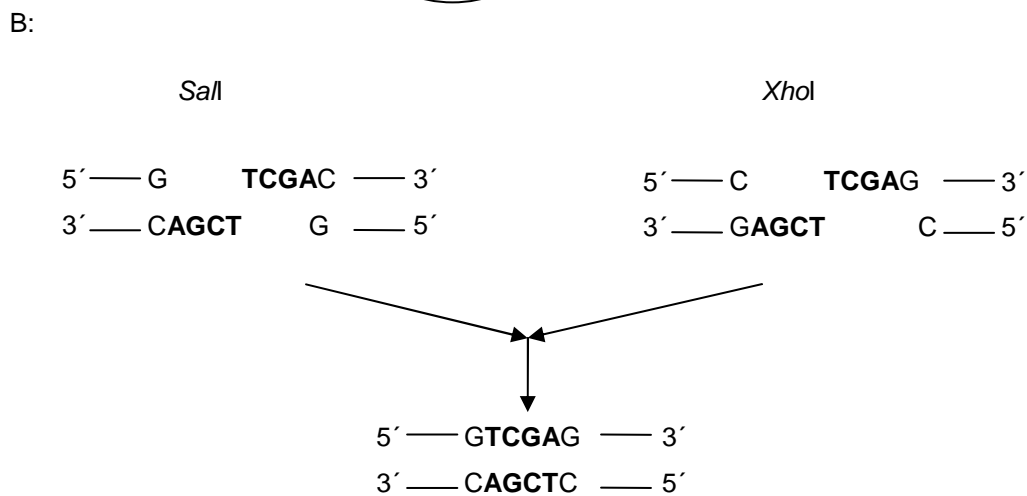
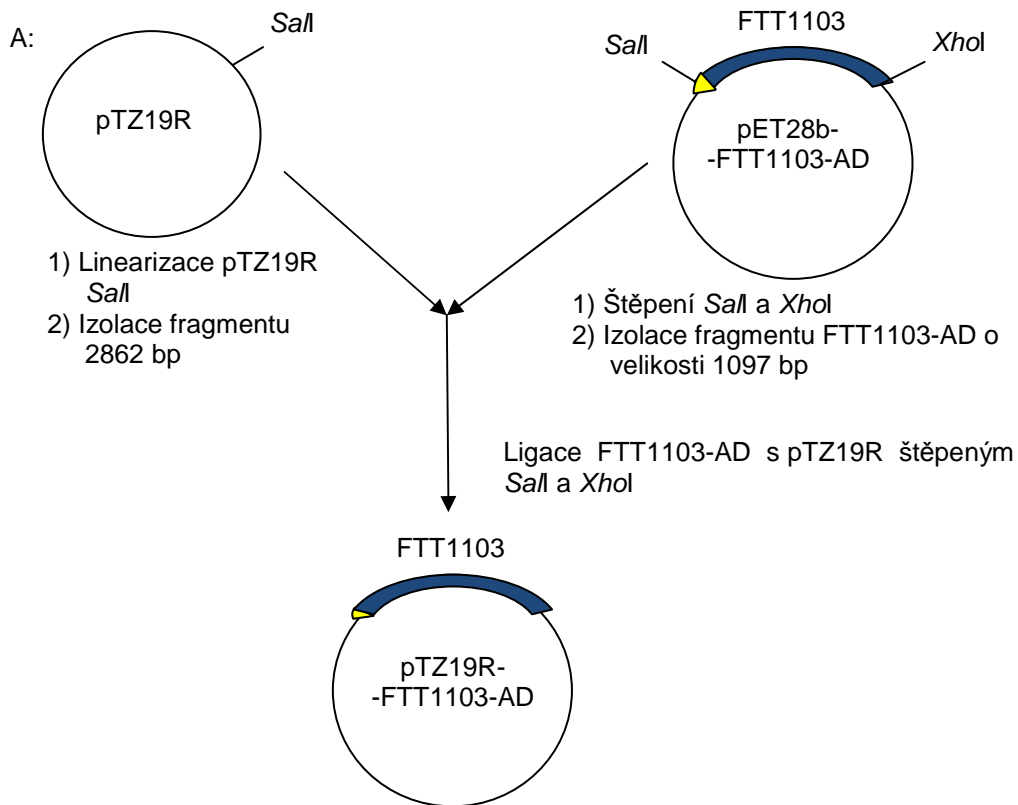
Obr. 6 **Schematické znázornění klonování vektoru pTZ19R-PhoA.**
 Vnesením genu pro alkalickou fosfatázu (PhoA) do plazmidu pTZ19R (4292 bp) pomocí restriční endonukleázy *Bam*HI vznikl pTZ19R-PhoA.

Dalším vektorem, který jsme vytvořili, byl pTZ19R-FTT1103-AD (Obr. 7 a 8). Spojení FTT1103 s adaptorem (AD) jsme vytvořili nejprve v plazmidu pET28b a teprve potom jej celý fragment FTT1103-AD přenesli do plazmidu pTZ19R. Gen pro funkční lipoprotein FTT1103 jsme získali metodou PCR (Obr. 9) s využitím primerů FW-FTT1103 a R-FTT1103 uvedených v kap. 4.1.6. Produkt PCR reakce, stejně jako plazmid pET28b, jsme štěpili restričními endonukleázami *Nco*I a *Xho*I. S využitím agaróзовé elektroforézy jsme následně FTT1103 i pET28b přečistili a izolovali z gelu (kap. 4.2.5 a kap. 4.2.6). Připravený izolovaný vektor pET28b-FTT1103 jsme štěpili restriční endonukleázou *Nco*I, rozdělili agaróзовou elektroforézou a izolovali z gelu. Abychom do něj mohli vložit dvojřetězcový adaptor, museli jsme jej nejprve vytvořit z lyofilizovaných jednořetězcových alikvotů (kap. 4.1.6). Vzniklý dvojřetězcový adaptor jsme vložili do vektoru pET28b-FTT1103 do místa rozštěpeného restriční endonukleázou *Nco*I. Správnost zaklonování adaptoru jsme ověřili restričními endonukleázami *Sal*I a *Xho*I a sekvenční analýzou (Mikrobiologický ústav AV ČR). Restričními endonukleázami *Sal*I a *Xho*I jsme z vektoru pET28b-FTT1103-AD vyštěpili FTT1103-AD DNA fragment

o velikosti 1105 bp a pomocí agarózové elektroforézy jej izolovali. Plazmid pTZ19R jsme linearizovali restričními endonukleázami *SalI* a *SacI* a přečistili a izolovali z agarózového gelu (kap. 4.2.5 a kap. 4.2.6). Fragment FTT1103-AD jsme do štěpeného plazmidu pTZ19R vnesli s využitím kompatibility přesahujících konců po štěpení enzymy *SacI* a *XhoI* (Obr. 8).

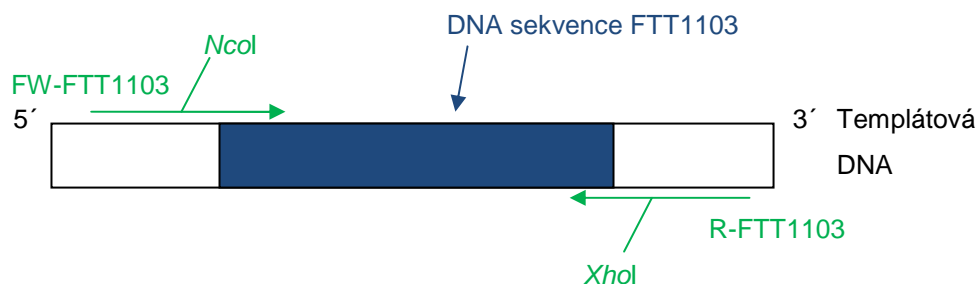


Obr. 7 Schematické znázornění vytvoření plazmidu A) pET28b-FTT1103 a B) s vloženým adaptorem (pET28b-FTT1103-AD 6343 bp). FTT1103 připravené metodou PCR jsme pomocí restričních endonukleáz *NcoI* a *XhoI* vložili do plazmidu pET28b a následně s využitím restriční endonukleázy *NcoI* vložili i dvojřetězcový adaptor.



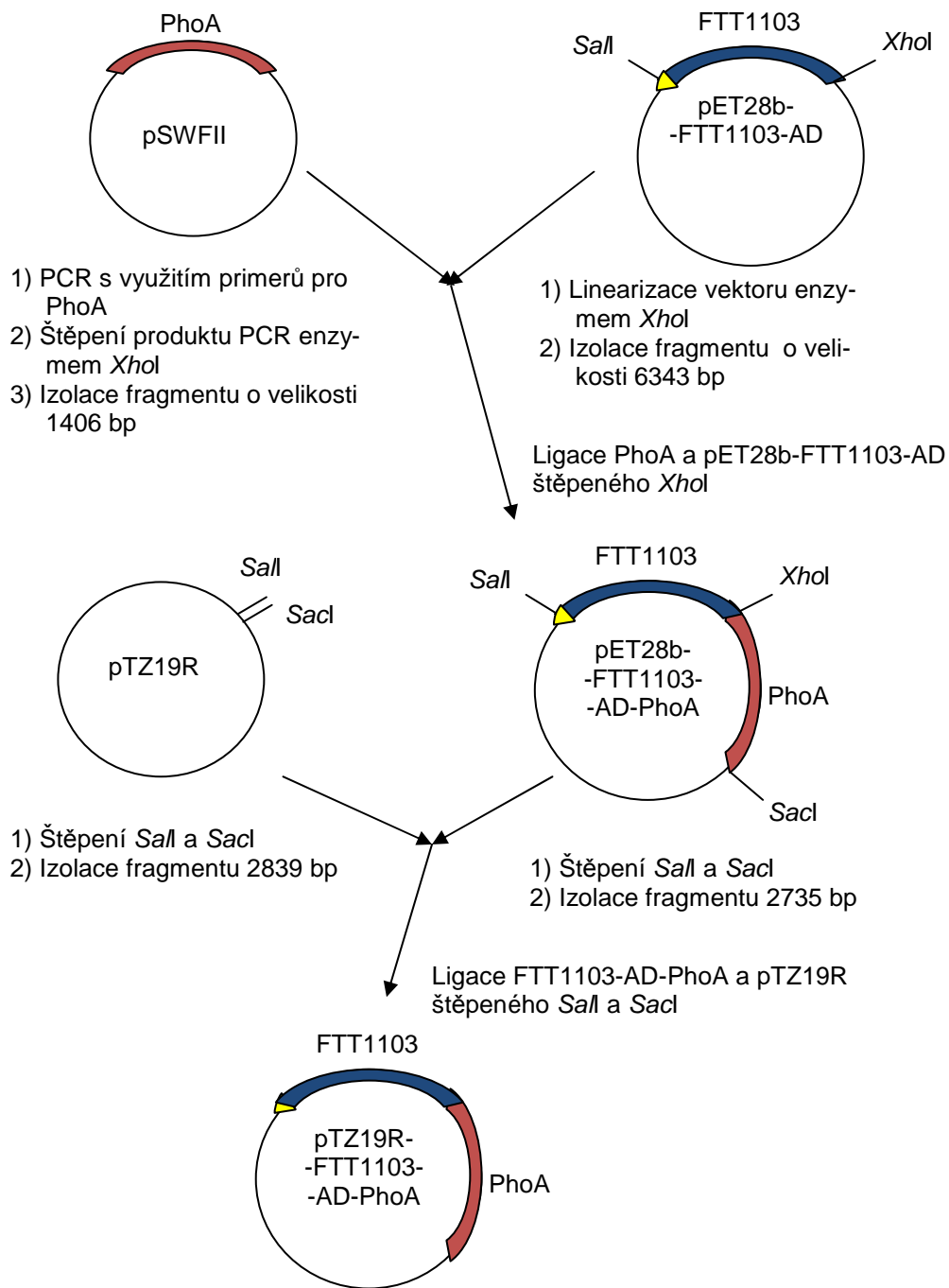
Obr. 8 A: Schematické znázornění vytvoření plazmidu pTZ19R-FTT1103-AD (3967 bp) s využitím komplementarity přesahujících konců fragmentů štěpených *XhoI* a *SalI*. Z plazmidu pET28b-FTT1103-AD jsme pomocí restričních endonukleáz *SalI* a *XhoI* vyštěpili DNA úsek FTT1103-AD, který jsme následně vložili do plazmidu pTZ19R štěpeným *SalI*.

B: Komplementarita přesahujících konců po štěpení restričními endonukleázami *SalI* a *XhoI*. Po ligaci toto místo nerozpoznávají ani jeden z uvedených enzymů.

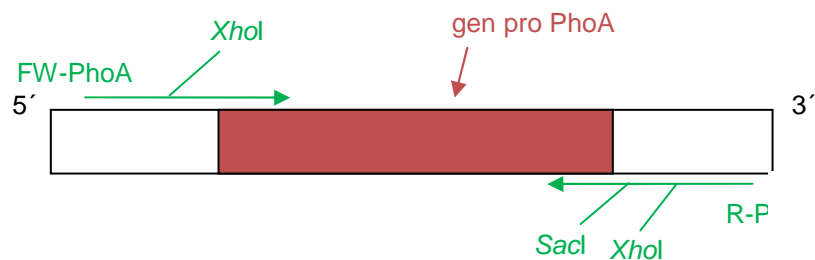


Obr. 9 **Schematické znázornění PCR amplifikace FTT1103.** S využitím primerů FW-FTT1103 a R-FTT1103 jsme provedli PCR amplifikace a zároveň vnesli místa pro rozeznání restričními endonukleázami *NcoI* a *XhoI*. Jako templátovou DNA jsme použili chromozomální DNA *F.tularensis* SchuS4 (dar z Hradce Králové)

Pro vytvoření vektoru pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA jsme využili již připravený vektor pET28b-FTT1103-AD z výroby vektoru pTZ19R-FTT1103-AD (Obr. 10). Abychom mohli PhoA do vektoru pET28b-FTT1103-AD vložit přes místo rozeznávané restriční endonukleázou *XhoI* a tím vytvořit fúzní protein FTT1103-PhoA, museli jsme nejprve pomocí metody PCR získat PhoA, jejíž modifikované konce obsahují sekvenci rozeznávanou enzymem *XhoI* (Obr. 11). K tomu jsme použili primery FW-PhoA a R-PhoA uvedené v kap. 4.1.6. Produkt PCR reakce a vektor pET28b-FTT1103-AD jsme štěpili restriční endonukleázou *XhoI* a následně přečistili na agarózové elektroforéze. Takto upravenou PhoA jsme vložili do připraveného vektoru a restriční analýzou určili správné klony (data nejsou uvedena). Midiprepací jsme získali dostatečné množství čisté DNA a mohli přejít k přenesení fragmentu pro fúzní protein FTT1103-AD-PhoA z plazmidu pET28b do plazmidu pTZ19R. Díky tomu, že primer reverse-PhoA obsahoval vedle sekvence rozeznávané restriční endonukleázou *XhoI* i sekvenci rozeznávanou restriční endonukleázou *SacI*, bylo možné celý fragment FTT1103-AD-PhoA přenést do pTZ19R pomocí restričních endonukleáz *SacI* a *SalI*. Správné klony jsme opět určili pomocí restriční analýzy (data nejsou uvedena). Vektor získaný midiprepací jsme kontrolně štěpili restriční endonukleázou *EcoRI* (Obr. 5).

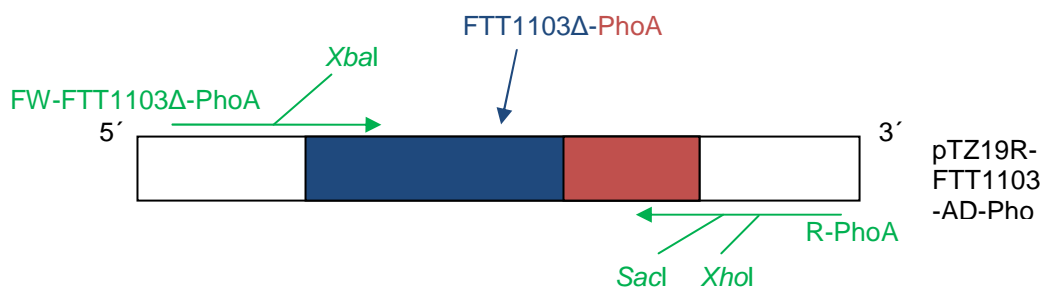


Obr. 10 Schematické znázornění vytvoření plasmidu pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA. PhoA získanou PCR metodou jsme štěpili restriční endonukleázou XhoI a následně vložili do plasmidu pET28b-FTT1103-AD. Z plasmidu pET28b-FTT1103-AD jsme FTT1103-AD-PhoA (5353 bp) vyštěpili restričními endonukleázami SalI a SacI, s jejichž pomocí jsme celý fragment vložili do plasmidu pTZ19R.

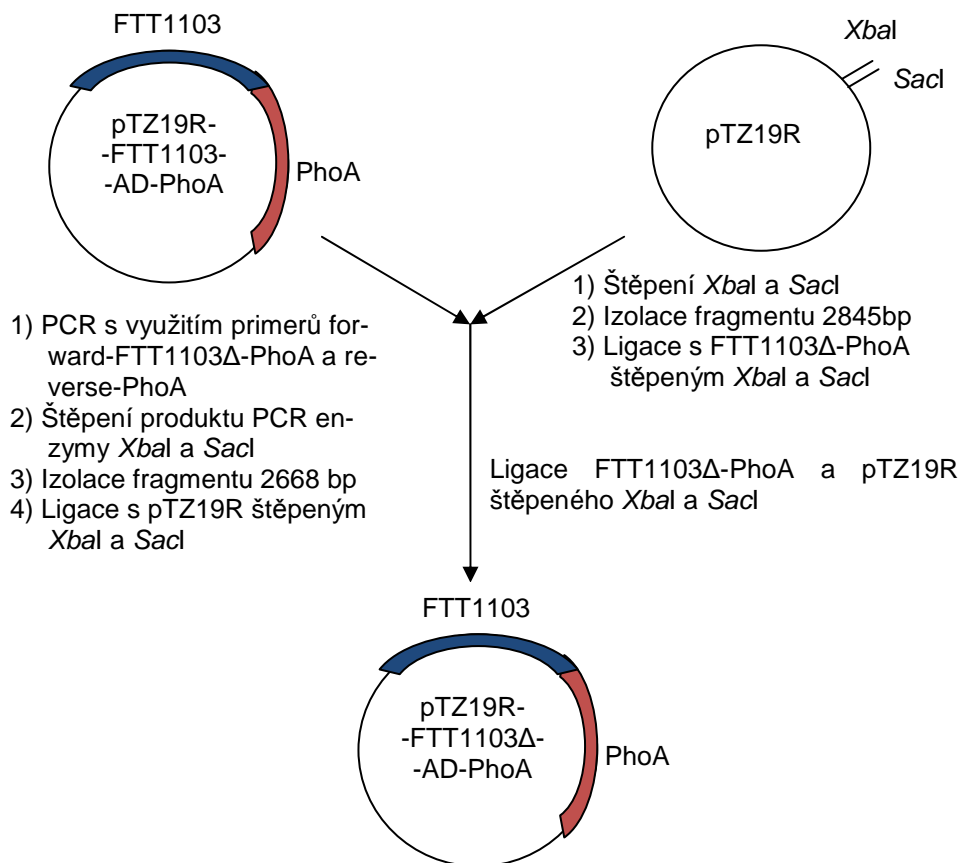


Obr. 11 **Schematické znázornění amplifikace PhoA s využitím primerů FW-PhoA a R-PhoA.** Místa rozeznávaná restričními endonukleázami *XhoI* a *SacI* jsou označena šipkami. Jako templátovou DNA jsme použili plazmid pSWFII.

Pro vytvoření vektoru pTZ19R-FTT1103 Δ -PhoA jsme nejprve chtěli použít stejnou strategii jako u vytváření vektoru pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA, avšak tímto způsobem se nám daný vektor nepodařilo získat. Použili jsme proto metodu PCR, s jejíž pomocí jsme získali fragment FTT1103 Δ -PhoA (Obr. 12) a ten jsme následně vložili přímo do vektoru pTZ19R (Obr. 13). Primery FW-FTT1103 Δ -PhoA a R-PhoA, které jsme při PCR použili, jsou uvedeny v kap. 4.1.6. Správné klony získané minipreparací DNA jsme určili restriční analýzou.



Obr. 12 - **Schematické znázornění amplifikace FTT1103 Δ -PhoA s využitím primerů FW-FTT1103 Δ -PhoA a R-PhoA.** Místa rozeznávaná restričními endonukleázami *XbaI*, *XhoI* a *SacI* jsou označena šipkami. Jako templátovou DNA jsme použili vektor pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA.



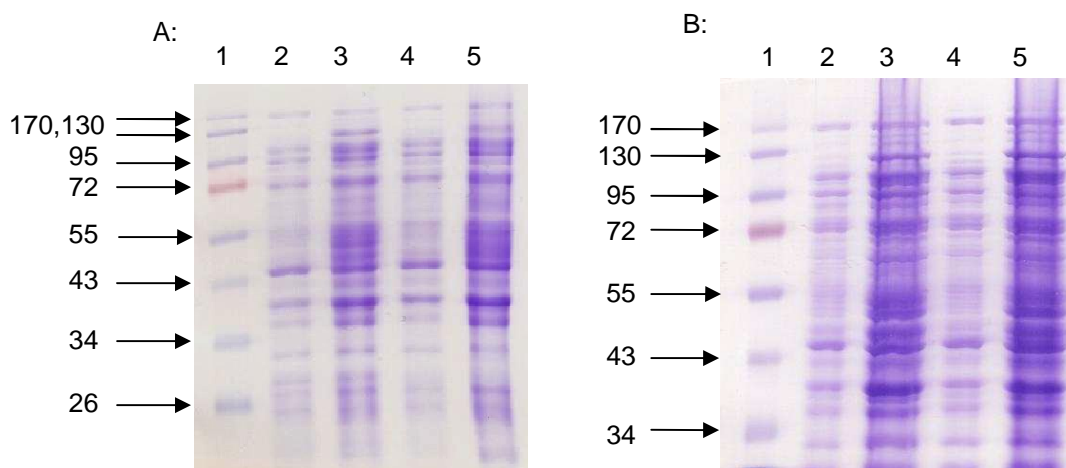
Obr. 13 Schematické znázornění vytvoření plazmidu pTZ19R-FTT1103Δ-PhoA (5275 bp). Pomocí PCR jsme získali FTT1103Δ-PhoA z vektoru pTZ19R-FTT1103-AD-PhoA a následně jej vložili do plazmidu pTZ19R pomocí restričních endonukleáz XbaI a SacI.

5.2 Expresa a detekce jednotlivých proteinů v *E.coli*

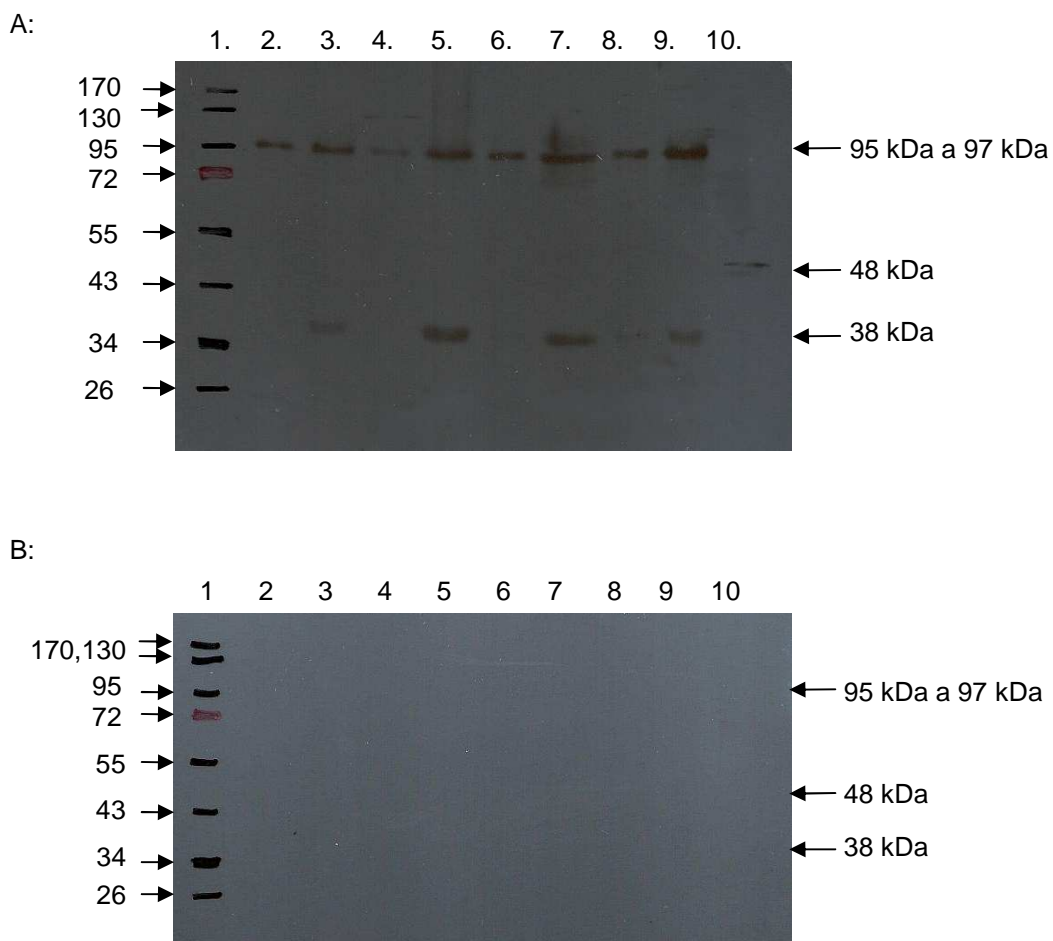
Expresi jednotlivých proteinů jsme prováděli v bakteriích obsahující námi vytvořené vektory z plazmidu pTZ19R. Expresa proteinů jsme indukovali přidávkem IPTG a potom bakterie nechali růst 3 hodiny (kap. 4.2.7). Pro následnou SDS-PAGE elektroforézu jsme použili 10 % dělicí gel. Proteiny jsme detekovali barvením SDS gelu pomocí CBB (Obr. 14) a po Western-blot také imunochemicky pomocí protilátek anti-FTT1103 a anti-PhoA (Obr. 15).

Imunochemickou detekcí monoklonální protilátkou anti-PhoA se nám nepodařilo detekovat ani PhoA (48 kDa), ani FTT1103-AD-PhoA (97 kDa), ani

FTT1103 Δ -PhoA (95 kDa). Naproti tomu imunochemická detekce polyklonální protilátkou anti-FTT1103 odhalila možnou kontaminaci bakteriálních linií. Vzhledem k výsledkům získaným na půdách s BCIP k této kontaminaci pravděpodobně došlo až během kontroly exprese proteinů. Molekulová hmotnost fúzního proteinu FTT1103-AD-PhoA je 97 kDa a FTT1103 Δ -PhoA je 95 kDa. Tyto proteiny se nám podařilo pomocí anti-FTT detekovat a také na SDS-PAGE gelu barveném CBB lze pozorovat odpovídající proužky. Teoretická molekulová hmotnost lipoproteinu FTT1103 je 38,5 kDa, avšak jeho reálná molekulová hmotnost je 49,8 kDa. Imunochemicky jsme detekovali signál odpovídající spíše teoretické molekulové hmotnosti a na SDS-PAGE gelu obarveném CBB jsme pozorovali produkci proteinu odpovídajícího jak teoretické, tak i reálné molekulové hmotnosti.



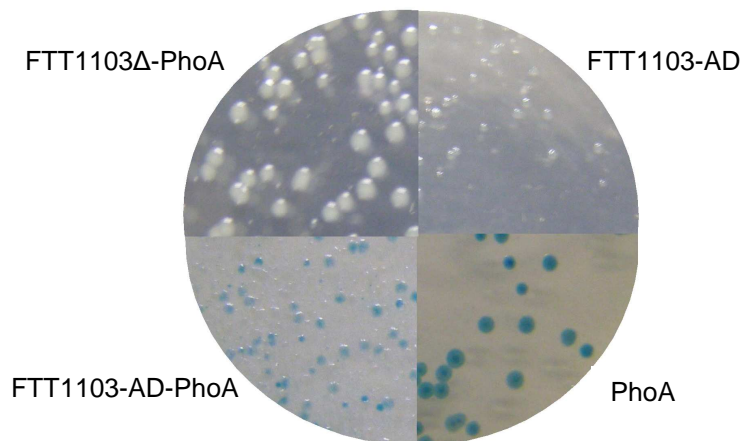
Obr. 14 **SDS-PAGE gely barvené CBB.** A: 12 % SDS-PAGE gel; 1.- standard molekulových hmotností, 2.- PhoA před indukci, 3.- PhoA po indukci, 4.- FTT1103-AD před indukci, 5.- FTT1103-AD po indukci. B: 10 % SDS-PAGE gel; 1.- standard molekulových hmotností, 2.- FTT1103-AD-PhoA před indukci, 3.- FTT1103-AD-PhoA po indukci, 4.- FTT1103 Δ -PhoA před indukci, 5.- FTT1103 Δ -PhoA po indukci. Šipkami jsou vyznačeny jednotlivé molekulové hmotnosti.



Obr. 15 **Imunochemická detekce exprimovaných proteinů v bakteriálních lyzátech pomocí polyklonální králičí protilátky anti-FTT1103entire.** 1.- standard molekulových hmotností, 2.- PhoA před indukci, 3.- PhoA po indukci, 4.- FTT1103-AD před indukci, 5.- FTT1103-AD po indukci, 6.- FTT1103-AD-PhoA před indukci, 7.- FTT1103-AD-PhoA po indukci, 8.- FTT1103 Δ -PhoA před indukci, 9.- FTT1103 Δ -PhoA po indukci, 10.- FTT1103 pozitivní kontrola. Šipkami jsou vyznačeny jednotlivé molekulové hmotnosti exprimovaných proteinů. A: detekce primární protilátkou anti-FTT1103 a sekundární protilátkou GAR_{PX}. B: Detekce primární protilátkou anti-PhoA a sekundární protilátkou GAM_{PX}.

5.3 Využití fosfatázové aktivity pro lokalizaci konservovaného hypotetického lipoproteinu

Bakterie nesoucí vytvořené vektory jsme kultivovali přes noc při 37 °C na tuhých půdách, které obsahovaly 40 µg/ml BCIP, substrát pro PhoA. Bakterie s vektorem nesoucím gen pro FTT1103-AD-PhoA rostly v modrých koloniích, což indukuje přítomnost signálního peptidu pocházející z FTT1103 stejně jako kolonie bakterií transformovaných vektorem s PhoA. Bakterie obsahující vektory pTZ19-FTT1103-AD a pTZ19R-FTT1103Δ-PhoA vykazovaly růst v bílých koloniích (Obr. 16).

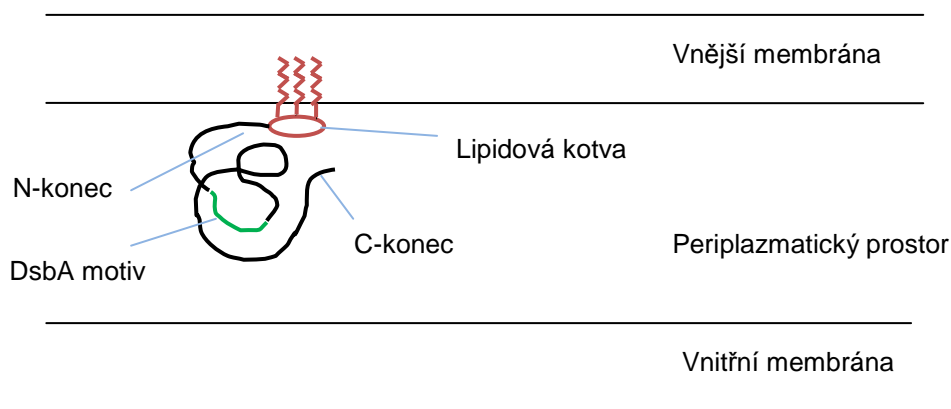


Obr. 16 **Aktivita PhoA na půdě s 40 µg/ml BCIP.** Modré zbarvení kolonií signalizuje přítomnost enzymaticky aktivní PhoA v periplazmatickém prostoru, bílé kolonie nenesou reportérový gen pro PhoA nebo neobsahují gen pro FTT1103 včetně N-terminální signální sekvence.

5.4 Diskuse

Vzhledem k rozdílným aktivitám PhoA fúzané s FTT1103 se signální sekvencí a bez této sekvence je zřejmé, že signální sekvence lipoproteinu je důležitá pro transport do periplazmatického prostoru. FTT1103 by tedy mohl být sekretovaný

protein, nebo je lokalizován do periplazmy, či vnější membrány a jeho C-konec s navázanou PhoA směřuje do periplazmy (www.sci.sdsu.edu; Prochazkova a kol., 2005; Gilmore a kol., 2004). Poslední zmíněná možnost, tedy lokalizace lipoproteinu ve vnější membráně s C-koncem orientovaným do periplazmatického prostoru, odpovídá jak výsledkům predikčního programu LipoP (Janovská a kol., 2007), tak i možnosti periplazmatické lokalizace na základě podobnosti s DsbA (Qin a kol., 2009). Podle predikčního programu LipoP je FTT1103 membránový lipoprotein, avšak podobnost s DsbA proteinem jej předurčuje k lokalizaci v periplazmě. My jsme potvrdili, že C-konec lipoproteinu FTT1103 je skutečně lokalizován v periplazmě. Možná topologie lipoproteinu FTT1103 je znázorněna na obr. 17.



Obr. 17 **Model lipoproteinu FTT1103.** C-konec a DsbA motiv jsou lokalizovány do periplazmatického prostoru. Na N-konec v místě „lipobox“ je navázána lipidová kotva, která zajišťuje interakci s vnější membránou.

Pozorovali jsme, že bakterie, které nesly vektor s fúzovanými geny pro FTT1103 a PhoA získávaly modré zbarvení daleko rychleji než bakterie, které obsahovaly vektor se samotnou PhoA. Je možné, že signální peptid FTT1103 umožňuje rychlejší transport proteinu do periplazmatického prostoru resp. vnější membrány.

V této práci se nám podařilo prokázat orientaci C-konce lipoproteinu FTT1103 do periplazmatického prostoru. Další studium tohoto lipoproteinu by se mohlo zaměřit na potvrzení nebo vyvrácení hypotézy o jeho lokalizaci ve vnější membráně.

6. Závěr

1. Z vektoru pSWFII jsme vyštěpili gen pro PhoA, vnesli jej do plazmidu pTZ19R a restrikční analýzou ověřili jeho zaklonování.
2. Na základě známé sekvence genů pro FTT1103 a PhoA jsme navrhli primery pro jejich amplifikaci a vnesení sekvencí rozeznávaných vhodnými restrikčními endonukleázami využitelnými při jejich zabudování do vektorů pET28b a pTZ19R.
3. Gen pro FTT1103 jsme zaklonovali do vektoru pET28b, kde jsme k němu přidali dvojřetězcový adaptor. Správné klony jsme ověřovali pomocí restrikční analýzy a sekvenování. Do vytvořeného vektoru jsme zaklonovali PhoA získanou PCR metodou a správné zaklonování ověřili restrikční analýzou.
4. Geny pro FTT1103-AD a FTT1103-AD-PhoA jsme přenesli do plazmidu pTZ19R a jejich správné zaklonování ověřili restrikční analýzou.
5. Navrhli jsme si primer FW-FTT1103 Δ , který jsme spolu s primerem R-PhoA použili pro amplifikaci FTT1103 Δ -PhoA. Získaný fragment jsme vnesli do plazmidu pTZ19R a správné zaklonování jsme ověřili restrikční analýzou.
6. Na pevných kultivačních mediích s BCIP jsme ověřili enzymovou aktivitu PhoA fúzovanou s FTT1103.
7. Ověřili jsme expresi proteinů, které jsme detekovali barvením SDS-PAGE gelu CBB a imunochemicky pomocí primárních protilátek anti-FTT1103 a anti-PhoA a sekundárních protilátek konjugovaných s křenovou peroxidázou.
8. Ze získaných výsledků jsme navrhli možný model topologie lipoproteinu FTT1103.

7. Literatura:

Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.: Lékařská mikrobiologie. Praha: Nakladatelství Marvil, 1996: 255-256

Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., et al.: Tularemia as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. JAMA, 2001; 285(21):2763-2773.

Ehrman, M., Boyd, D., Beckwith, J.: Genetic analysis of membrane protein topology by a sandwich gene fusion approach. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990 Oct; Vol. 87, 7574-7578.

Eliasson, H., Olcén, P., Sjöstedt, A., Jurstrand, M., Bäck, E., Andersson, S.: Kinetics of the Immune Response Associated with Tularemia: Comparison of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, a Tube Agglutination Test, and a Novel Whole-Blood Lymphocyte Stimulation Test. Clin. Vaccine Immunol., 2008; 15(8):1238-1243.

Ellis, J., Oyston, P.C.F., Green, M., Tittball, R.W.: Tularemia. Clin. Microbil. Rev. 2002 Oct; 15(4):631-646.

Gardy, J.L., Spencer, C., Wang, K., Ester, M., Tusnády, G.E., Simon, I., Hua, S., deFays, K., Lambert, Ch., Nakai, K., Brinkman, F.S.L.: PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. Nucleic Acid Research, 2003; 31(13):3613-3617.

Gilmore, R.D. Jr, Bacon, R.M., Sviat, S.L., Petersen, J.M., Bearden, S.W.: Identification of *Francisella tularensis* genes encoding exported membrane-associated proteins using *TnphoA* mutagenesis of a genomic library. Microbial Pathogenesis, 2004; 37:205-213.

Gomez, M., Johnson, S., Gennaro, M.L.: Identification of Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a Bioinformatic Approach. *Infect. Immun.*, 2000; 68(4):2323-2327.

Havlasová, J., Hernychová, L., Brychta, M., Hubálek, M., Lenco, J., Larsson, P., Lundqvist, M., Forsman, M., Kročová, Z., Stulík, J., Macela, A.: Proteomics analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antipody response in murine model of tularemia. *Proteomics*, 2005; 5:2090-2103

Hubálek, M., Hernychová, L., Brychta, M., Lenco, J., Zechovská, J., Stulík, J.: Comparative proteome analysis of cellular proteins extracted from highly virulent *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and less virulent *F. tularensis* ssp. *holarctica* and *F. tularensis* ssp. *mediaasiatica*. *Proteomics*, 2004; 4(10):3048-3060.

Huntley, J.F., Conley, P.G., Hagman, K.E., Norgard, M.V.: Charakterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.*, 2006; Vol. 189, No. 2: 561-574

Chamberlein, R.E.: Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl. Microbiol.*, 1965; 13(2):232-235.

Janovská, A., Pávková, I., Hubálek, M., Lenčo, J., Macela, A., Stulík, J.: Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, 2007; 108:151-159

Jiang, J., Parker, C.E., Fuller, J.R., Kawula, T.H., Borchers, Ch.H.: An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Analytica Chimica Acta*, 2007; 605:70-79.

Juncker, A.S., Willenbrock, H., von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H., Krogh, A.: Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Science*, 2003; 12:1652-1662.

Kamalakkannan, S., Murugan, V., Jagannadham, M.V., Nagaraj, R., Sankaran, K.: Bacterial lipid modification of proteins for novel engineering applications. *Protein Engineering, Design & Selection*, 2004; 17(10):721-729.

Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Hälltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., Karp, P.D., Larsson, E., Liu, Y., Michell, S., Prior, J., Prior, R., Malfatti, S., Sjöstedt, A., Svensson, K., Thompson, N., Vergez, L., Wagg, J.K., Wren, B.W., Lindler, L.E., Andersson, S.G., Forsman, M., Titball, R.W.: The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.*, 2005; 37(2):153-159.

Lukáš, B., Libich, J.: Modifikace jednoduché krevní agarové plotny pro kultivaci *Pasteurella tularensis*. *Čs. epidemiol. mikrobiol. imunol.*, XI, 1962: 290-297. (cit. Macela, A., Stulík, J., Trebichavský, I., Kroča, M., Janovská, S.: *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Grada Publishing, a.s., 2006: 113)

Macela, A., Stulík, J., Trebichavský, I., Kroča, M., Janovská, S.: *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. Praha: Nakladatelství Grada Publishing, a.s., 2006: 113. ISBN 80-247-0664-4

Marczak, M., Mazur, A., Król, J.E., Gruszki, W.I., Skorupska, A.: Lipoprotein PssN of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii: Subcellular Localization and Possible Involvement in Exopolysaccharide Export. *J. Bacteriol.*, 2006 Oct; 188(19):6943-6952.

Mierendorf, R.C., Percy, C., Young, R.A.: Gene Isolation by Screening λ gt11 Libraries with Antibodies. *Methods Enzymol.*, 1987; 152:458-469.

Pávková, I., Hubálek, M., Zechovská, J., Lenčo, J., Stulík, J.: *Francisella tularensis* live valine strain: Proteomic analysis of membrane enriched fraction. *Proteomics* 2005; 5:2460-2467.

Prochazkova, K., Osicka, R., Linhartova, I., Halada, P., Sulc, M., Sebo, P.: The *Neisseria meningitidis* Outer Membrane Lipoprotein FrpD Binds the RTX Protein FrpC. *J Biol Chem.*, 2005 Feb 4; 280(5):3251-3258.

Qin, A., Scott, D.W., Thompson, J.A., Mann, B.J.: Identification of an Essential *Francisella tularensis* subsp. *Tularensis* Virulence Factor. *Infect. Immun.*, 2009; 77(1):152-161.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: *Molecular cloning (A laboratory manual)*, 1989, 2.vydání

Sedlák, K., Tomšíčková, M.: *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Nakladatelství Scientia, 2006. 167 s., ISBN 80-86960-07-2.

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

Straskova, A., Pavkova, I., Forslund, A.-L., Kuoppa, K., Noppa, L., Kroca, M., Fučíková, A., Krocova, Z., Forsberg, Å, Stulik, J.: A *dsbA* mutant of *Francisella tularensis* is high attenuated in vivo and induces protective immunity. In press.

Takeda, K., Miyatake, H., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., Miki, K.: Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB. *EMBO J.*, 2003; 22(13):3199-3209.

Thakran, S., Li, H., Lavine, Ch.L., Miller, M.A., Bina, J.E., Bina, X.R., Re, F.: Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem.*, 2008 Feb 15;283(7):3751-3760. Epub 2007 Dec 13.

Internetové odkazy:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - predikční program BLAST

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=3191250&log\\$=databasead&logdbfrom=protein](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&dopt=full_report&list_uids=3191250&log$=databasead&logdbfrom=protein) – FTT1103; 20.3.2008 10:06

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/56708183?ordinalpos=1&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Sequence.Sequence_ResultsPanel.Sequence_RVDocSum – FTT1103; 1.5.2009 13:53

<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/> - predikční program LipoP

http://www.epibio.com/f5_4/f5_4pp.asp - Efficient Fractionation of Periplasmic, Cytoplasmic, and Membrane Proteins From Escherichia coli Using the Epicentre PeriPreps™ Periplasting Kit; 24.10.2007 9:07

<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/dolop> - 3.3.2009 20:01

<http://www.psort.org> – predikční program PSORT-B

<http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/regulation/fusion.html> - 24.10.2007