

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

Speciální chemicko – biologické obory

Zdravotní laborant

Proteomická analýza bakteriálních membránových proteinů

Michaela Hurytová

Bakalářská práce

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

Special Chemical and Biological Programmes

Laboratory Assistant

Proteomic analysis of bacterial membrane proteins

Michaela Hurytová

Bachelor thesis

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Hurytová**
Osobní číslo: **C12225**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Proteomická analýza bakteriálních membránových proteinů**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na metody proteomické analýzy bakteriálních membránových proteinů.
2. Charakterizujte bakteriální membrány. Popište typy membránových proteinů a jejich funkce.
3. Uveďte a popište vhodné metody proteomické analýzy pro bakteriální membránové proteiny.
4. Uveďte konkrétní příklady proteomické analýzy bakteriálních proteinů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Sylva Janovská, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Eva Slehová**

Katedra biologických a biochemických věd

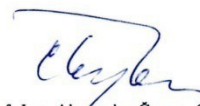
Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci 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 o 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. 6. 2017

Michaela Hurytová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce Mgr. Sylvě Janovské, Ph.D. za odborné vedení a rady, které mi poskytla pro sepsání práce.

Ráda bych také poděkovala mé rodině za podporu během studia.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá proteomickou analýzou bakteriálních membránových proteinů. V práci jsou popsány bakteriální membrány a to konkrétně cytoplasmatická membrána, bakteriální stěna a ve stručnosti je popsáno pouzdro a glykokalyx. Popis bakteriální stěny zahrnuje rozdělení bakterií na grampozitivní a gramnegativní bakterie. U gramnegativních bakterií je uveden popis vnější membrány. V další části jsou popsány membránové proteiny a následně jsou uvedeny laboratorní techniky, které se používají k analýze bakteriálních membránových proteinů. Poslední část zahrnuje konkrétní příklady analýz membránových proteinů bakterií.

Klíčová slova

Proteomická analýza, proteiny, bakterie, bakteriální stěna, elektroforéza, chromatografie, hmotnostní spektrometrie.

Annotation

This bachelor thesis is aimed at proteomic analysis of bacterial membrane proteins. The thesis includes the description of bacterial membranes, mainly the cytoplasmic membrane and bacterial wall. It also describes the capsule and glycocalyx. The description of bacterial wall involves grampositive and gramnegative bacteria with the description of outer membrane of the latter type. The following part of the thesis deals with membrane proteins. It continues with listing of laboratory techniques used for analysing bacterial membrane proteins. The last part of this thesis comprises particular examples of bacterial membrane proteins analyses.

Keywords

Proteomic analysis, proteins, bacteria, cell wall, electrophoresis, chromatography, mass spectrometry.

Obsah

Seznam zkratk	10
Seznam obrázků	12
Seznam tabulek	13
Úvod	14
1 Bakteriální membrány	15
1.1 Cytoplasmatická membrána	15
1.1.1 Struktura cytoplasmatické membrány	15
1.1.2 Funkce cytoplasmatické membrány	18
1.2 Bakteriální stěna	20
1.2.1 Složení a struktura bakteriální stěny	21
1.2.2 Buněčná stěna grampozitivních bakterií	22
1.2.3 Buněčná stěna gramnegativních bakterií	23
2 Membránové proteiny	25
2.1 Možnosti připojení membránových proteinů na membrány	26
2.2 Proteiny zajišťující adhezi k povrchům – adheziny	28
2.3 Proteiny jako receptory	28
2.4 Transportní proteiny	28
2.4.1 Pasivní transport	30
2.4.2 Aktivní transport	30
2.4.3 Poriny	30
3 Laboratorní metody proteomické analýzy	31
3.1 Gelové techniky	31
3.1.1 Jednorozměrná gelová elektroforéza	31
3.1.2 Dvourozměrná gelová elektroforéza	32
3.1.3 Modrá nativní gelová elektroforéza	34
3.2 Shotgun proteomické negelové techniky	34

3.3	Metody izotopového značení	35
3.3.1	SILAC	35
3.3.2	iTRAQ	36
3.3.3	ICAT	37
3.3.4	ICPL.....	38
3.3.5	Značení $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$	38
4	Příklady proteomické analýzy bakteriálních membránových proteinů	38
4.1	Proteomická analýza vnější membrány <i>Escherichia coli</i>	38
4.2	Proteomická analýza sarkosin-nerozpustné frakce vnější membrány kmene <i>Helicobacter pylori</i> 26695	41
4.3	Proteomická analýza membránových proteinů <i>Streptococcus pyogenes</i>	43
	Závěr	44
	Seznam literatury	45
	Přílohy.....	50

Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
1-D SDS PAGE	Jednodimenzionální gelová elektroforéza
SDS	Dodecylsulfát sodný
2-DE	Dvoudimenzionální gelová elektroforéza
pI	Isoelektrický bod
IEF	Isoelektrická fokusace
DTT	Dithiotreitol
DET	Dithioerythritol
TBP	Tributylfosfin
IEP	Isoelektrický bod
CHAPS	3-((3-chloamidopropyl) dimethylammonio)-1-propansulfonát
IPG	„Imobilized pH Gradient“
2-D DIGE	Dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza
BN-PAGE	„Blue Native“ gelová elektroforéza
LC	Kapalinová chromatografie
2-DLC	Dvourozměrná kapalinová chromatografie
GC	Plynová chromatografie
RPLC	Kapalinová chromatografie na reverzní fázi
TFA	Tetrahydrofuran
IEC	Iontově výměnná chromatografie
GPC	Gelová permeační chromatografie

MudPIT	Multidimenzionální proteinová identifikační technologie
SILAC	„Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture“
iTRAQ	„Izobaric Tags for Relative and Absolute Quantification“
AHPC	Alkylhydroperoxid reduktáza podjednotky C
ICAT	„Isotope – Coded Affinity Tag“
ICPL	„Isotope – Coded Protein Label“
PMF	„Peptide Mass Fingerprinting“
PFS	„Peptide Fragment Sequencing“
MALDI	„Martix Assisted Laser Desorption Ionization“
ESI	Electrospray Ionization
TOF	Time Of Flight
MS	Hmotnostní spektrometrie
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Struktura cytoplasmatické membrány	16
Obrázek 2 – Uspořádání fosfolipidů	17
Obrázek 3 – Molekula fosfolipidů	17
Obrázek 4 – Propustnost cytoplasmatické membrány pro vybrané molekuly.....	19
Obrázek 5 – Struktura peptidoglykanu	21
Obrázek 6 – Peptidoglykanová síť	22
Obrázek 7 – Buněčná stěna grampozitivních bakterií	23
Obrázek 8 – Buněčná stěna gramnegativních bakterií.....	24
Obrázek 9 – Typy transmembránových proteinů	26
Obrázek 10 – Vazby membránových proteinů do lipidové dvojvrstvy	27
Obrázek 11 – Třídy transportních membránových proteinů.....	29
Obrázek 12 – Možnosti transportu látek skrz cytoplasmatickou membránu.....	30
Obrázek 13 – Schéma Shotgun proteomické negelové techniky.....	35
Obrázek 14 – Struktura iTRAQ činidla	36
Obrázek 15 – Struktura ICAT afinitního činidla	37
Obrázek 16 – Uhličitanově rozpuštěné membránové proteiny Escherichia coli	39
Obrázek 17 – Proteiny identifikované po kultivaci s omezením železa	40
Obrázek 18 – Sarkosin-nerozpustná frakce Helicobacter pylori na IPG prouzcích barvených stříbrem	41
Obrázek 19 – Imunoblot 2-DE sarkosin-nerozpustné frakce Helicobacter pylori.....	42

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Integrální membránové proteiny s hodnotou pI 4 – 7.....	50
Tabulka 2 – Integrální membránové proteiny s pI > 7	51
Tabulka 3 – Membránové lipoproteiny s hodnotou pI 4 – 7	51
Tabulka 4 – Potencionální membránové lipoproteiny s pI > 7.....	51
Tabulka 5 – Membránové proteiny kmene <i>E. coli</i> identifikované PMF metodou	52
Tabulka 6 – Seznam identifikovaných proteinů sarkosin-nerozpustné frakci kmene <i>Helicobacter pylori</i>	53
Tabulka 7 – Imunoreaktivní proteiny v sarkosin-nerozpustné frakci kmene <i>Helicobacter pylori</i>	54
Tabulka 8 – Povrchové proteiny kmene <i>Streptococcus pyogenes</i>	54

Úvod

Proteomická analýza obecně se stala v posledních letech velice oblíbeným a využívaným přístupem k identifikaci a kvantifikaci proteinů. Proteomické technologie umožňují identifikovat všechny proteiny jakéhokoliv organismu, tkání nebo pouze buněk. Proteomika je široce využívána v oblastech molekulární biologie, onkologie, mikrobiologie, botaniky a dalších odvětvích.

Základ pro rozvoj proteomiky dala genomika. Prostřednictvím genomiky je možné zkoumat genom organismu. Ovšem proteomika umožňuje i zkoumání fenotypu, který určují proteiny jakožto funkční jednotky organismu. Je tedy možné identifikovat a porovnávat proteiny během životního cyklu organismu, protože se jeho proteom vlivem životního prostředí mění.

Proteomika bakteriálních membránových proteinů umožnila zkoumání bakterií na hlubší úrovni. To je důležité především pro zkoumání membránových proteinů, které fungují jako receptory pro protilátky. Na základě toho pak mohou být vyráběny vakcíny proti různým onemocněním.

1 Bakteriální membrány

Bakterie jsou prokaryotní jednobuněčné mikroorganismy, jejichž cytoplasmu a buněčné orgány odděluje od okolního prostředí cytoplasmatická membrána, na kterou nasedá buněčná stěna. Ta tvoří pevnou oporu buněčného těla a chrání tělo bakterie před vlivy vnějšího prostředí. Na povrchu bakteriální stěny mohou bakterie tvořit pouzdro nebo vrstvu slizu neboli glykokalyx. Z bakteriálního povrchu poté mohou vyrůstat bičíky a fimbrie, které bakteriím umožňují pohyb (Votava, 2005).

1.1 Cytoplasmatická membrána

Cytoplasmatická membrána je součástí bakteriálních buněk. Je pro bakterie, ale i pro všechny ostatní prokaryotické a eukaryotické buňky, životně nezbytná. Membrána obklopuje cytoplasmu a buněčné orgány a vytváří hranici mezi vnitřním prostředím buňky a vnějším prostředím, ve kterém se bakterie vyskytují (Alberts, 1994).

Cytoplasmatická membrána je jediná membrána, která se v bakteriální buňce vyskytuje na rozdíl od eukaryotních buněk, ve kterých cytoplasmatická membrána obklopuje i další buněčné orgány jako endoplasmatické retikulum, mitochondrie a Golgiho aparát. Tvoří osmotickou bariéru a je semipermeabilní pro látky rozpustné ve vodě (Horáček a kolektiv, 2000).

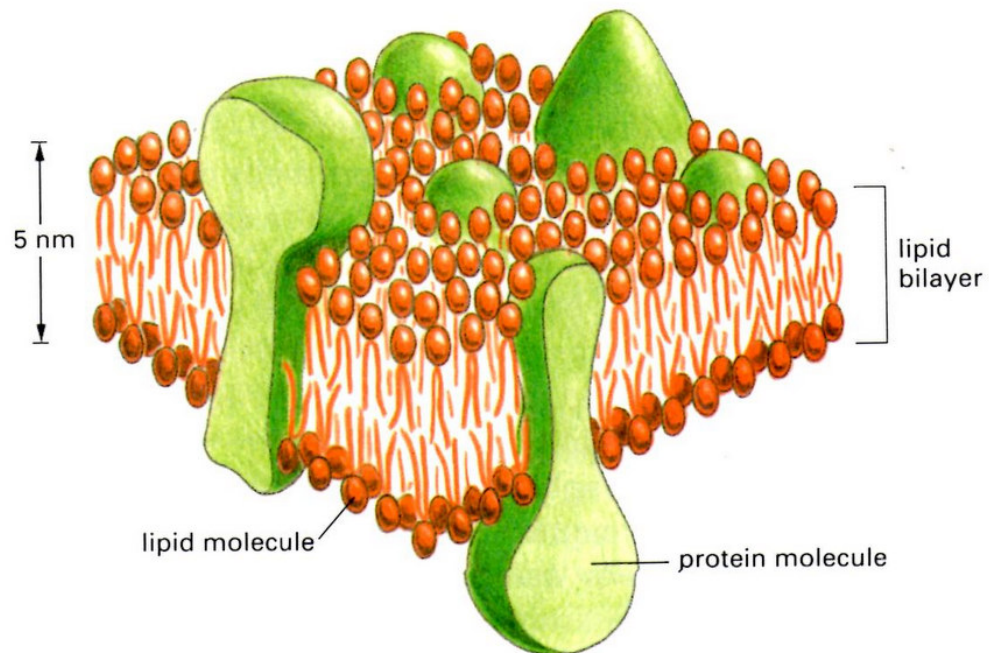
Tloušťka cytoplasmatické membrány je kolem 5 až 8 nm. Její chemické složení závisí na druhu bakterie a na jejím stáří a podmínkách, ve kterých bakterie žije, přičemž bílkoviny tvoří asi 60 – 70 % a lipidy a fosfolipidy asi 30 – 40 % celkového složení (Jungbauerová, 1998; Walker, 1998).

Pro grampozitivní a gramnegativní bakterie je struktura i složení cytoplasmatické membrány stejné. Jsou od sebe nerozeznatelné (Walker, 1998).

1.1.1 Struktura cytoplasmatické membrány

Cytoplasmatická membrána je tenkým filmem, tvořeným molekulami lipidů a proteinů, které jsou vázány nekovalentními vazbami. Struktura membrány je velice pružná (Alberts, 1994). Fosfolipidy jsou uspořádány do dvojité vrstvy, která tvoří základní strukturu cytoplasmatické membrány. Tato dvojitá vrstva fosfolipidů připomíná sendvič, do kterého jsou z vnějšího i vnitřního povrchu vnořeny molekuly globulárních bílkovin (Obrázek 1).

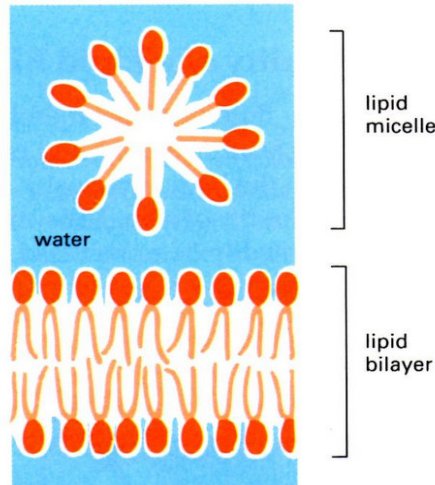
Hydrofilní konce bílkovin směřují ven z membrány do okolního prostředí a hydrofobní konce bílkovin směřují dovnitř bakteriální buňky. Membrána je stabilizována hydrofobními a elektrostatickými silami (Jungbauerová, 1998; Alberts, 1994).



Obrázek 1 – Struktura cytoplasmatické membrány
Převzato z: Alberts, 1994

1.1.1.1 Uspořádání fosfolipidů a jejich struktura

Fosfolipidy jsou látky rozpustné v organických rozpouštědlech a nerozpustné ve vodě. Ve vodě přirozeně tvoří shluky neboli micely, ve kterých jsou formovány hydrofobními konci dovnitř micely a hydrofilními hlavičkami ven tak, že jsou hlavičky ve styku s vodou. Nebo tvoří sendvič, ve kterém hlavičky fosfolipidů tvoří dva povrchy a ocásky jsou namířeny proti sobě (Obrázek 2). Obě tato uspořádání fosfolipidů mají samotěsnící schopnosti, což je ideální vlastnost pro buněčné membrány (Alberts, 1994).



Obrázek 2 – Uspořádání fosfolipidů
Převzato z: Alberts, 1994

Molekula fosfolipidů se skládá z polární a nepolární části. Polární část je hydrofilní, tedy smáčivá, a nazývá se hlavička. Nepolární část je hydrofobní, nesmáčivá, a nazývá se konec nebo ocásek. Hlavička je složena z cholinu a fosfátu. Konec fosfolipidu tvoří dva řetězce mastných kyselin, které obsahují 14 až 24 atomů uhlíku. Jeden z konců obsahuje jednu či více dvojných vazeb. Dvojná vazba způsobuje malé zakřivení ocasu (Obrázek 3).

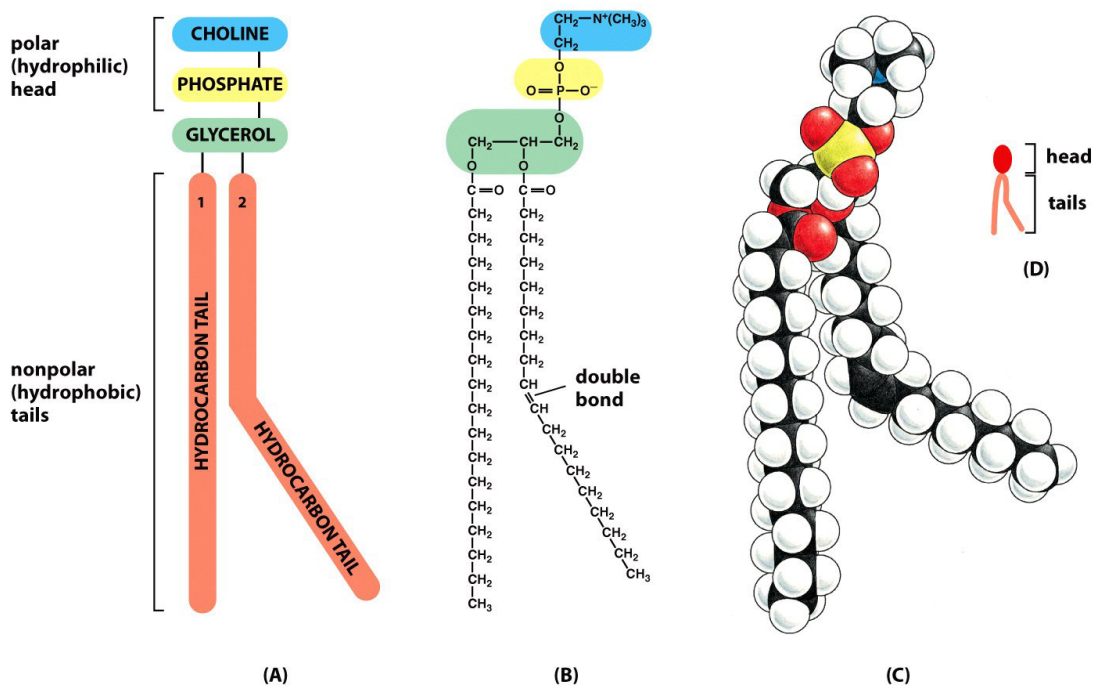


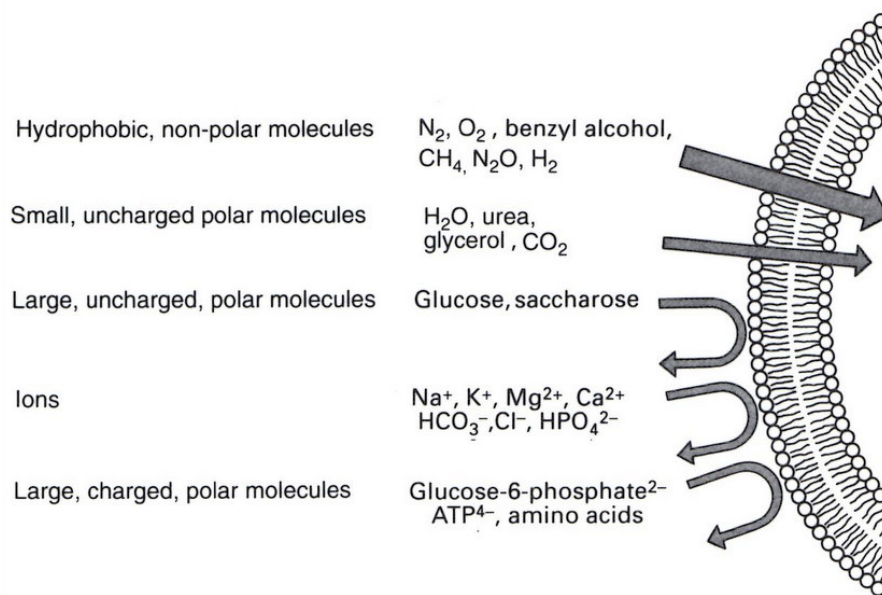
Figure 11-6 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Obrázek 3 – Molekula fosfolipidů
Převzato z: Alberts, 1994

Rozdíly v délkách a nasycenosti řetězců mastných kyselin mají vliv na schopnost fosfolipidů shlukovat se proti sobě, a to je důvod, proč je membrána fluidní. Čím jsou uhlovodíkové řetězce kratší a čím více mají dvojných vazeb, tím je membrána tekutější. Delší nenasyčené uhlovodíkové řetězce způsobují vyšší tuhost membrány. Bakterie mají tu schopnost, že si změnou počtu uhlíků a dvojných vazeb v uhlíkatém řetězci mastné kyseliny upraví fluiditu membrány v závislosti na prostředí, ve kterém se právě vyskytují (Alberts, 1994).

1.1.2 Funkce cytoplasmatické membrány

Hlavní funkcí, kterou membrána zastává je, že funguje jako osmotická bariéra. Tato funkce je zajištěna díky vnitřní hydrofobní části membrány, která je tvořena ocásky fosfolipidů. Tudíž je pro polární hydrofilní látky, které jsou rozpustné ve vodě, nepropustná a nemůže tak dojít k unikání životně důležitých látek z buňky. Tyto látky jsou do buňky a z buňky transportovány pomocí kanálů či přenašečů. Kanály a přenašeče představují integrální proteiny, které jsou specifické pro jednu nebo pro více skupin blízké příbuzných látek. Mezi tyto látky patří velké polární molekuly bez náboje, jako je glukóza nebo sacharóza. Dále velké polární molekuly s nábojem, jako je glukóza – 6 – fosfát²⁻, aminokyseliny nebo ATP⁴⁻. Kationty sodíku, draslíku, hořčíku, vápníku a molekuly chloridů, hydrogenuhličitanů a hydrogenfosforečnanů jsou transportovány prostřednictvím iontových kanálů. Membrána je volně propustná pouze pro látky, které mají molekulu menší, než je molekula glycerolu, a pro lipofilní látky. Do skupiny těchto volně difundujících látek patří například močovina, voda, glycerol, oxid uhličitý, dusík, kyslík, vodík a další (Obrázek 4). Ty mohou prostupovat přes membránu drobnými póry, které v membráně vznikají během pohybu fosfolipidů (Kaprálek, 2000; Walker, 1998; Schlegel, 1993).



Obrázek 4 – Propustnost cytoplasmatické membrány pro vybrané molekuly
Převzato z: Schlegel, 1993

V cytoplasmatické membráně jsou umístěny enzymy, které zajišťují transformaci energie. Katalyzují biosyntézu fosfolipidů, glykolipidů, podílejí se na syntéze buněčné stěny, složek membrány a spor či slizové vrstvy. Dále se membrána účastní i replikace DNA při dělení bakteriálního genomu a podílí se na sekreci toxinů a extracelulárních enzymů ven z bakteriální buňky. (Horáček, 2000; Votava, 2005).

Cytoplasmatická membrána nahrazuje bakteriím mitochondrie, které u eukaryotických buněk zajišťují respirační pochody neboli oxidativní fosforylaci. Dále umožňuje ukotvení rotorů bakteriálních bičků. (Votava, 2005).

Na povrchu membrány jsou přítomny takzvané chemosenzory, což jsou detektory, které přijímají a zpracovávají chemický signál z vnějšího prostředí. Na základě těchto signálů dochází k pozitivní či negativní chemotaxi a díky tomu jsou pohyblivé bakterie některými chemotaktickými látkami přitahovány a jinými odpuzovány. Součástí chemosenzorů jsou chemoreceptory, které se účastní transportu živin do buňky. Pokud dojde ke změně koncentrace chemotaktických látek v prostředí, v němž se bakterie vyskytuje, dojde tím k chemotaxi, neboli k pohybu bakterie do příznivějšího prostředí. Díky těmto chemosenzorům spolu bakterie mohou komunikovat (Horáček, 2000).

1.2 Bakteriální stěna

Buněčná stěna bakterií je pevný, tuhý a elastický obal bakteriální buňky. Určuje její tvar, pomáhá udržovat osmózu v buňce, a jak už bylo zmíněno výše, chrání ji před vlivy okolí. Ochrana bakterií bakteriální stěnou je velice efektivní. Aby mohla být bakteriální buňka mechanicky rozbita, je nutné dlouhodobé a radikální působení. Bakteriální stěna ovšem nechrání buňky pouze před mechanickým poškozením, ale chrání je i před chemickými vlivy, nepříznivými osmotickými podmínkami, UV zářením, vyschnutím a nepříznivými teplotami a hodnotami pH (Jungbauerová, 1998; Kaprálek, 2000).

Bakteriální stěna je semipermeabilní a na rozdíl od cytoplasmatické membrány je volně propustná pro soli a další látky o nízké molekulové hmotnosti. Propustnost těchto látek závisí na velikost pórů v buněčné stěně. Ty mají v průměru asi 1 μm a jsou proto propustné pouze pro látky, které mají malé molekuly podobné molekulám cukrů nebo aminokyselin. Nepropustná je buněčná stěna pro látky s molekulovou hmotností vyšší než 10 000 g/mol (Jungbauerová, 1998; Schlegel, 1993).

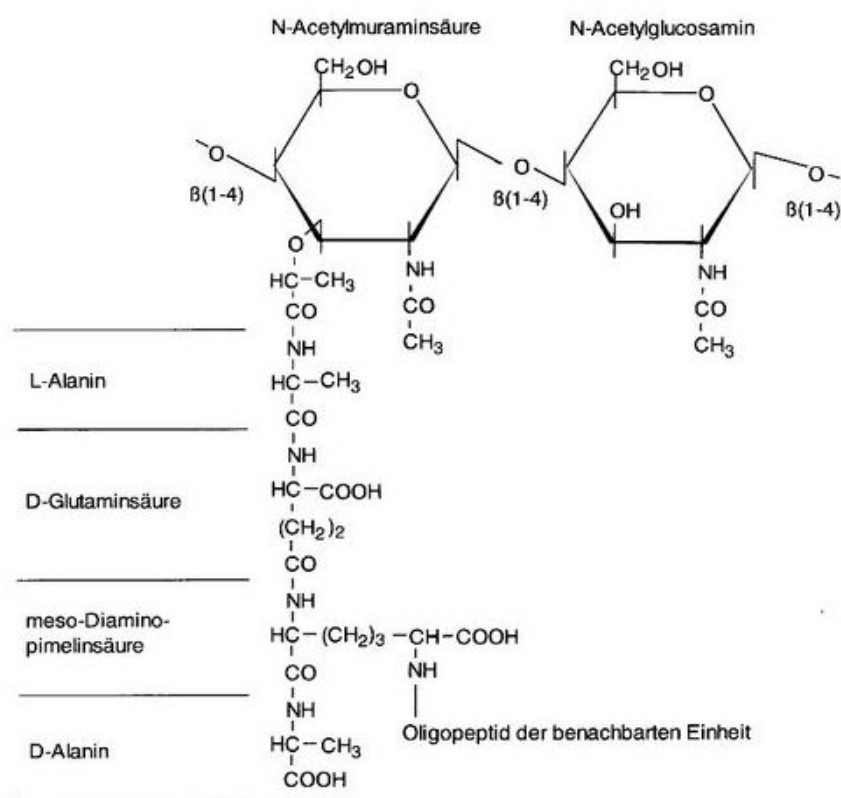
Pokud bychom chtěli bakteriální stěnu odstranit, musíme na ni působit například β -laktamovými antibiotiky nebo lysozimy. Lysozimy bakteriální stěnu hydrolyzují a peniciliny inhibují její syntézu. Po takovémto působení získáme obnažené bakteriální buňky v L-formě. Obnažené grampozitivní bakterie se nazývají protoplasty a stěnu postrádají úplně. Gramnegativní bakterie nazýváme sféroplasty, u kterých je možné nalézt zbytky stěny. Obnažené buňky mají vždy kulovitý tvar a musí být umístěny v izotonickém prostředí, aby přežily a nedošlo k jejich lýze. Izotonický roztok je roztok, který má stejný osmotický tlak jako cytoplasma bakterií. V hypotonickém nebo hypertonickém prostředí by tyto buňky přežily jen díky buněčné stěně. Důvodem k přežívání obnažených bakteriálních buněk v izotonickém roztoku je ten, že uvnitř grampozitivních bakterií je tlak okolo 2500 kPa a uvnitř gramnegativních bakterií je tlak asi 500 kPa. Tyto tlaky musí cytoplasmatická membrána obou skupin bakterií udržet a právě v izotonickém roztoku jsou si vnitřní a vnější tlaky na obou stranách membrány rovny. (Kaprálek, 2000; Horáček, 2000; Julák, 2006).

Bakteriální stěna se vyskytuje u všech bakterií kromě mykoplasm. Na jejím povrchu můžeme nalézt antigeny a receptory pro enzymy a fágy. Je unikátní strukturou, protože stejnou strukturu nenalezneme u žádných rostlinných ani živočišných buněk (Schlegel, 1993; Jungbauerová, 1998; Alcamo, 1994).

1.2.1 Složení a struktura bakteriální stěny

Základní chemickou stavební látkou buněčné stěny je peptidoglykan neboli murein či mukopeptid. Peptidoglykan je makromolekula složená ze dvou cukrů, které se mezi sebou pravidelně střídají. Jedná se o N-acetylglukosamin a N-acetylmuramovou kyselinu (Obrázek 5). Sacharidy jsou k sobě vázány β 1,4-glykosidickou vazbou, a právě tato vazba bývá hydrolyzována během působení lysozymu (Alcamo, 1994; Jungbauerová, 1998).

Molekuly N-acetylmuramové kyseliny obsahují krátké peptidové řetězce tvořené aminokyselinami, které vycházejí z jejich zbytků (Obrázek 5). Aminokyseliny, které nejčastěji tvoří peptidové řetězce, jsou L-alanin, D-alanin, D-glutamová kyselina, m-diaminopimelová kyselina, L-lysin a D-alanin. Kyselina m-diaminopimelová se typicky vyskytuje u gramnegativních bakterií jako předposlední v peptidovém řetězci N-acetylmuramové kyseliny. U grampozitivních bakterií bývá předposlední nejčastěji L-lysin, ale může to být i L-ornitin, L-glutamát, L-alanin, L-homoserin, ale i m-diaminopimelová kyselina nebo L-diaminopimelová kyselina.

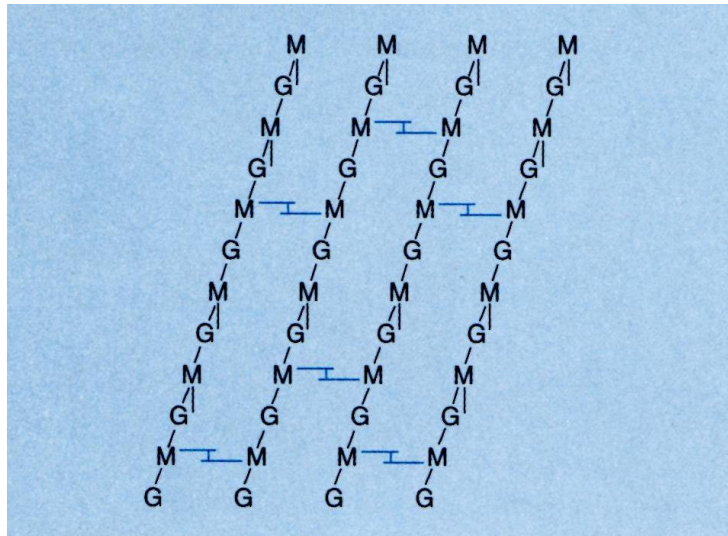


Obrázek 5 – Struktura peptidoglykanu

Převzato z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Muramin_Peptidoglykan_von_E.coli.jpg

Mezi těmito krátkými peptidovými řetězci dochází k reakci zvané transpeptidace. Vlivem této reakce se mezi sebou tetrapeptidy vážou a vznikají mezi nimi peptidické můstky,

kteře drží základní strukturu buněčné stěny pohromadě. Těto vazby se účastní pouze aminokyseliny se dvěma aminoskupinami, což je lysin a diaminopimelová kyselina. Jsou tedy nejdůležitější pro formování buněčné stěny. Volné aminoskupiny, které nejsou vázány ve svých peptidových řetězcích, se účastní peptidové vazby s peptidovým řetězcem jiné N-acetylmuramové kyseliny. Vznikne tak peptidoglykanová síť (Obrázek 6). Zesítnění dělá bakteriální stěnu silnější a tužší a umožňuje tak lepší odolávání vlivu osmotického tlaku (Votava, 2005, Schlegel, 1993; Walker, 1998).



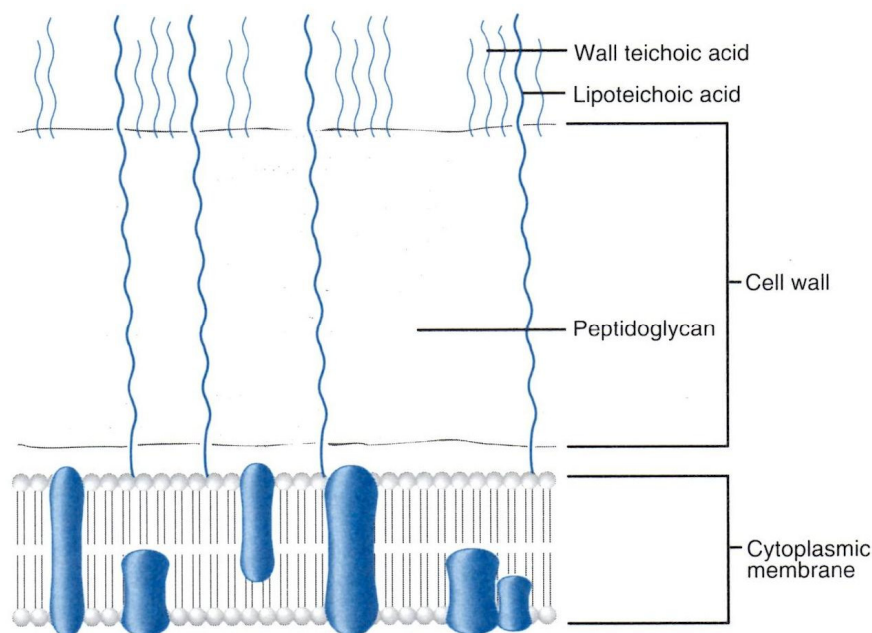
Obrázek 6 – Peptidoglykanová síť
Převzato z: Walker, 1998

1.2.2 Buněčná stěna grampozitivních bakterií

Na cytoplasmatickou membránu grampozitivních bakterií nasedá asi 25 nm tlustá, několikavrstevná a zesítněná vrstva buněčné stěny. Stěna obsahuje kromě mureinu, který ji tvoří z 30 – 70 % suché váhy, ještě kyselinu teichoovou, kyselinu lipoteichoovou, ale také polysacharidy a někdy v malém množství může obsahovat i proteiny. Murein je ve stěně navrstven asi ve 40 vrstvách (Walker 1998; Schlegel, 1993).

Přítomnost kyseliny teichoové je pro grampozitivní bakterie charakteristická. Kyselina teichoová prochází vrstvou peptidoglykanu ve formě vláknů a konce vláken vyčnívají z membrány ven do okolního prostředí (Obrázek 7). Vlákna této kyseliny jsou složena až z 30 jednotek glycerolu nebo ribitolu, které jsou vázány fosfodiesterovými vazbami. Kromě teichoové kyseliny může bakteriální stěna obsahovat i kyselinu lipoteichovou. Ta prochází úplně celou vrstvou peptidoglykanu a je vázána přes lipidy k cytoplasmatické membráně a na povrchu bakteriální stěny vyčnívá ven stejně jako vlákna kyseliny teichoové.

Vláken kyseliny lipoteichoové je ve stěně obsaženo méně. U některých bakterií představují hlavní antigenní determinantu (Schlegel, 1993; Walker, 1998).



Obrázek 7 – Buněčná stěna grampozitivních bakterií
Převzato z: Walker, 1998

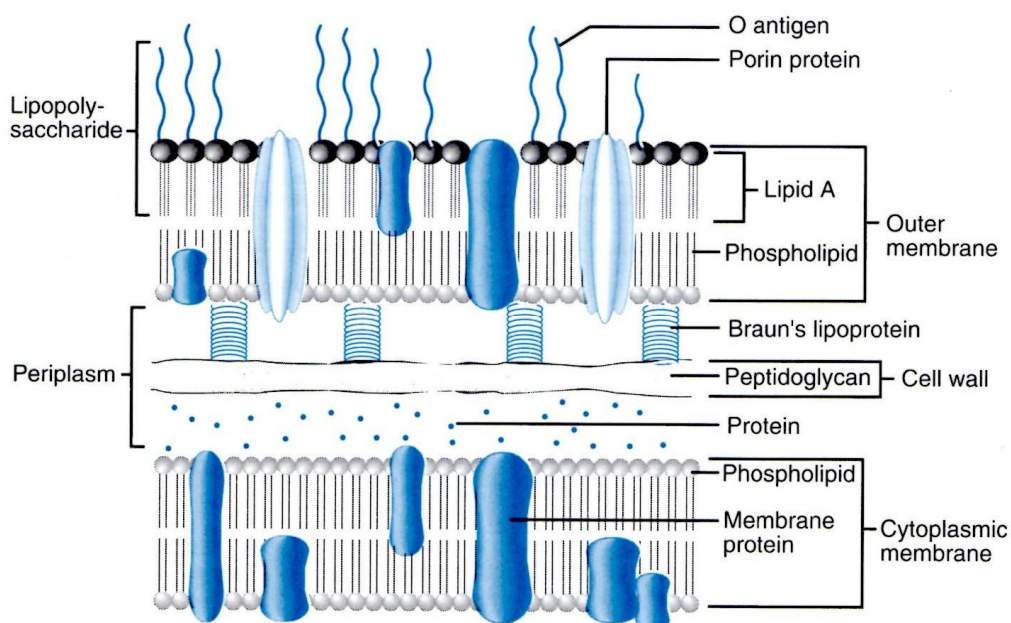
Oproti gramnegativním bakteriím jsou grampozitivní bakterie méně odolné a jsou citlivější vůči lysozymům a penicilinům, protože nemají vnější membránu, která by omezovala přístup těchto látek k buněčné stěně (Walker, 1998). Grampozitivní bakteriální stěna v sobě dokáže udržet komplex krystalové violeti a jódu, který vzniká při Gramově barvení (Alcamo, 1994).

1.2.3 Buněčná stěna gramnegativních bakterií

Gramnegativní bakterie mají ve své stěně pouze 3 nm silnou vrstvu peptidoglykanu a není zde přítomna kyselina teichoová. Tloušťka a absence kyseliny teichoové jsou hlavními strukturálními rozdíly mezi gampozitivními a gramnegativními bakteriemi. Procentuálně zastupuje peptidoglykan okolo 10 % suché váhy bakterie. Stěna gramnegativních bakterií však obsahuje různé polysacharidy, lipopolysacharidy, proteiny, lipidy a lipoproteiny, které jsou umístěny na vnějším povrchu. Díky tomu je bakteriální stěna mnohem složitější (Alcamo, 1994; Schlegel, 1993).

Gramnegativní bakterie jsou navíc ještě obklopeny vnější membránou, která zajišťuje vyšší odolnost vůči vnějším vlivům a obsahuje různé antigenní struktury jako je například

O-antigen (Obrázek8). Vnější membrána je strukturně podobná cytoplasmatické membráně. Skládá se z fosfolipidů orientovaných polárními konci ven a hydrofobními konci do středu membrány a z lipopolysacharidů, které jsou protilehlé k fosfolipidům a tvoří tak druhou vrstvu membrány. Dále z lipoproteinů, porinů a porinům podobným proteinů. Poriny a jim podobné proteiny tvoří kanálky fungující jako molekulové síto omezující nebo umožňující vstup látek do bakteriální buňky. Mezi vnější membránou a bakteriální stěnou jsou kotveny tzv. Braunovy lipoproteiny (Obrázek 8). Tyto proteiny udržují stabilitu buněčného obalu, protože jsou kovalentně vázány na peptidoglykan (Walker, 1998).



Obrázek 8 – Buněčná stěna gramnegativních bakterií
Převzato z: Walker, 1998

U gramnegativních bakterií můžeme pozorovat široký periplasmatický prostor, který se nachází mezi cytoplasmatickou membránou a vnější membránou. Konzistence periplasmatického prostoru je gelová. Obsahuje bakteriální toxiny a enzymy. Některé jsou vázány na cytoplasmatickou membránu a některé jsou volně rozptýleny v gelovém prostředí periplasmatického prostoru. Patří sem enzymy štěpící substráty, které obsahují etanol a glukózu, nebo enzymy aktivující anorganické sloučeniny jako jsou sírany nebo dusičnany. Jiné zase způsobují rezistenci na antibiotika nebo je ničí a brání tak narušení cytoplasmatické membrány. Kromě toho jsou zde obsaženy i depolymerázy, což jsou enzymy, které štěpí molekuly proteinů, polysacharidů, nukleových kyselin a dalších na základní stavební jednotky. Díky tomu si bakterie získávají živiny a látky potřebné například pro syntézu peptidoglykanu. Grampozitivní bakterie mají tento prostor pouze mezi cytoplasmatickou

membránou a bakteriální stěnou. Je značně užší a kvůli tomu musejí grampozitivní bakterie produkovat enzymy ven do okolí (Alcamo, 1994; Schlegel, 1993).

Gramnegativní bakterie jsou díky své vnější membráně daleko odolnější než grampozitivní bakterie (Walker, 1998; Alcamo, 1994).

2 Membránové proteiny

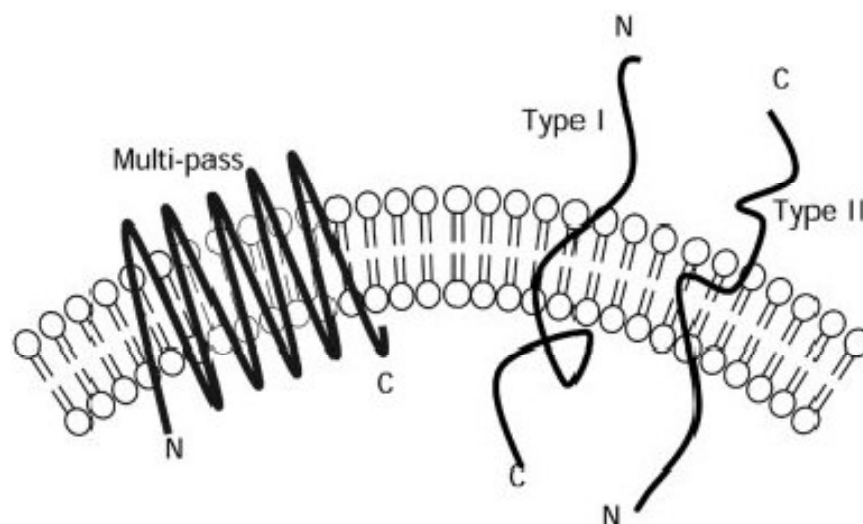
Základními stavebními látkami proteinů jsou aminokyseliny. Ty jsou pomocí kovalentních peptidových vazeb mezi karboxylovou skupinou jedné aminokyseliny a aminoskupinou aminokyseliny druhé vázány a tvoří peptidy, polypeptidy a následně proteiny. Sekvence aminokyselin je pro primární strukturu proteinů přesně určena a to předurčuje jejich funkce a tvary. Díky vodíkové vazbě mezi aminoskupinami a karbonylovými skupinami hlavních řetězců primárních struktur proteinů vzniká sekundární struktura. Tyto se mezi sebou opět vážou a tvoří terciární strukturu. Terciární struktura bílkovin je buď fibrilární neboli vláknitá, nebo globulární, která připomíná tvar klubíčka. Poslední nejsložitější strukturou je struktura kvartérní, která vzniká z proteinových podjednotek (Slabý, 2015).

Soubor proteinů daného organismu nebo v tomto případě bakteriální buňky se nazývá proteom. Vědním oborem, který se zabývá komplexním a kvantitativním popisem exprese genetické informace na úrovni proteinů je proteomika.

Membránové proteiny jsou proteiny, které zajišťují specifické funkce cytoplasmatických membrán ačkoliv jsou jejich základní stavební jednotkou fosfolipidy. Membránové proteiny představují asi 50 % suché hmotnosti cytoplasmatické membrány, ale v porovnání s velikostí fosfolipidů a proteinů jsou fosfolipidy malé molekuly a v membráně je jich podstatně více. Na jednu molekulu proteinu připadá 50 molekul fosfolipidů. Proteiny na sobě mohou mít navázány i oligosacharidové řetězce, které prezentují na svém povrchu okolnímu prostředí (Alberts, 2008; Tan et al., 2008).

Membránové proteiny se rozdělují na integrální (transmembránové) a periferní dle toho, jakým způsobem jsou vázány na cytoplasmatickou membránu. Transmembránové proteiny mohou být jednoduché nebo složené. Jednoduché proteiny mají ve své molekule pouze jednu α -šroubovici. Složené proteiny ve své molekule obsahují více šroubovic. Jednoduché transmembránové proteiny mohou být rozděleny na 2 typy, které se rozlišují na základě orientace N a C konců proteinu v membráně. První typ proteinu je orientovaný N koncem ven

z bakteriální buňky a C koncem dovnitř bakteriální buňky (Obrázek 9). Druhý typ proteinu má orientaci těchto konců opačnou, takže N konec se vynořuje uvnitř buňky a C konec vně (Obrázek9). Složené transmembránové proteiny mají oba konce orientovány dovnitř bakteriální buňky (Obrázek9). Hydrofobicita membránových proteinů se zvyšuje s počtem α -helixů (Tan et al., 2008).



Obrázek 9 – Typy transmembránových proteinů
Převzato z: Tan et al., 2008

Periferní membránové proteiny jsou proteiny, které neprostupují membránou, ale vážou se na povrch membrány. Obvykle jsou tyto proteiny vázány k membráně vazbou přes transmembránový protein nebo vazbou na polární konce lipidů (Tan et al., 2008).

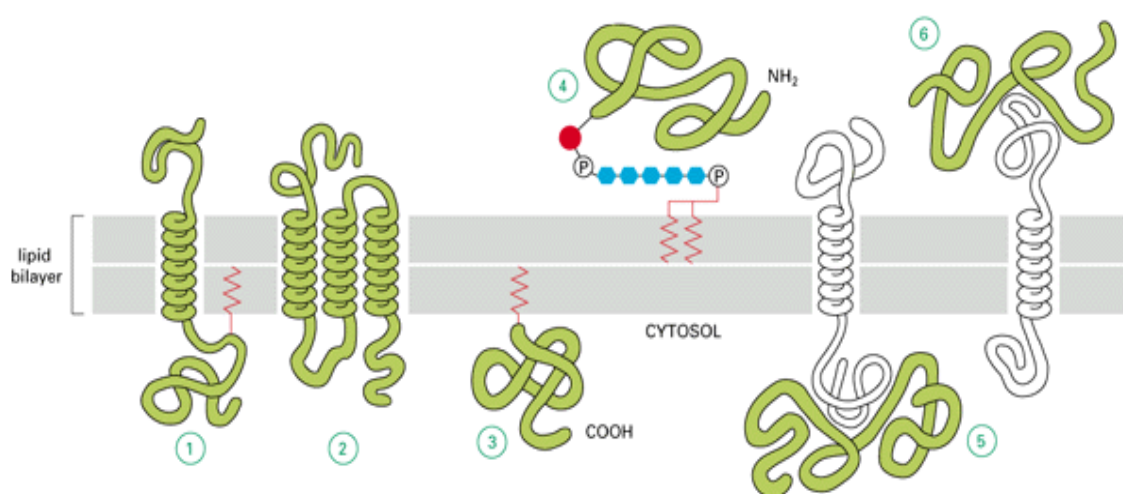
2.1 Možnosti připojení membránových proteinů na membrány

Proteiny mohou být k membráně připojeny různými způsoby. Spousta proteinů prostupuje membránu celou svou molekulou a na obou stranách membrány vyčnívají do vnitřního a vnějšího prostředí buňky. Takovéto proteiny jsou nazývány transmembránové proteiny (Obrázek 10 – 1, 2). Tyto proteiny, stejně jako molekuly fosfolipidů, mají hydrofilní a hydrofobní oblasti. Hydrofobní oblasti transmembránových proteinů jsou orientovány ve středu membrány, kde interagují s hydrofobními konci fosfolipidů. Hydrofilní oblasti jsou dvě a vyčnívají do vnitřního vodného prostředí buňky a do okolního prostředí, které je také vodné. Hydrofobicita některých proteinů může být zvýšena kovalentní vazbou na řetězce mastných kyselin (Obrázek 10 – 1), které jsou ještě navázány na lipidovou dvojvrstvu (Alberts, 2008).

Periferní membránové proteiny mohou být lokalizovány zcela v cytosolu a jsou k membráně připojeny pomocí jedné či více kovalentních vazeb přes řetězce mastných kyselin nebo přes lipidové řetězce, které jsou nazývány prenylové, farnesylové či geranylgeranylové skupiny (Obrázek 10 – 3). Tyto proteiny jsou rozpustné v cytosolu. Podobně připojené membránové proteiny jsou lokalizovány a navázány k vnějšímu povrchu membrány. Vazbu proteinu na membránu v tomto případě zprostředkovává specifický oligosacharid, který se váže na glykosyl-fosfatidylinositol, což je fosfolipid, který má ve své molekule fosfátovou skupinu (Obrázek 10 – 4). Tato fosfátová skupina je zásadní pro vznik vazby. Proteiny vázané pomocí glykosyl-fosfatidylinositolu fungují jako enzymy, adhezivní proteiny a antigeny (Alberts, 2008; Tan et al., 2008).

Transmembránové proteiny a proteiny připojené k membránám vazbou na lipidové skupiny patří mezi takzvané integrální membránové proteiny. Tyto proteiny mohou být z membrány uvolněny pouze po narušení lipidové dvojvrstvy například pomocí detergentů (Alberts, 2008).

Na povrchy vnějších i vnitřních hydrofilních oblastí transmembránových proteinů mohou být navázány již zmíněné periferní membránové proteiny (Obrázek 10 – 5, 6). Interakce mezi těmito proteiny jsou slabé a nekovalentní. K oddělení těchto periferních proteinů od membrány postačují mírné extrakční metody, které přeruší vazbu protein – protein. Jednou z extrakčních metod může být vystavení buněk působení roztoku a nízké či vysoké iontové síle nebo roztoku o extrémním pH. Ovšem lipidová dvojvrstva zůstane neporušena (Alberts, 2008).



Obrázek 10 – Vazby membránových proteinů do lipidové dvojvrstvy
Převzato z: Alberts, 2008

2.2 Proteiny zajišťující adhezi k povrchům – adheziny

Schopnost adheze bakteriálních buněk je jedním z hlavních faktorů virulence. Díky adhezínům jsou bakteriální buňky schopny nasednout na sliznice dutiny ústní, nosu nebo na sliznici močového měchýře či pochvy. Ovšem schopnost adherence nemají pouze patogenní bakterie, ale i bakterie nepatogenní, které tvoří biofilmy v přírodě.

Membránové proteiny, které zajišťují funkci adhezínů patří do selektinové a integrinové rodiny proteinů. Integriny jsou nekovalentně vázané proteiny, které se skládají z α a β řetězců. Selektiny jsou membránové glykoproteiny (Luo et al., 2007). Rodina selektinů se skládá ze tří členů C-typu lektinu a to z P-selektinu, L-selektinu a E-selektinu (Sperandio, 2006).

Příkladem může být M-protein bakterie *Streptococcus pyogenes*, což je protein zajišťující adhezi k mukózním povrchům a dále chrání bakteriální buňky před fagocytózou (Courtney et al., 2002)

Znalost struktury adhezivního proteinu dané bakterie umožňuje imunitnímu systému zabránit bakteriální adhezenci na slizniční povrchy. Adhezi k povrchům může ovšem zajistit i glykokalyx.

2.3 Proteiny jako receptory

Membránové receptorové proteiny slouží jako vazebná místa pro signální molekuly. Díky tomu dochází k přenosu signálu z vnějšího prostředí do buňky, čímž dojde ke změně chování bakteriální buňky (Tan et al., 2008). Na základě přeneseného signálu se může buňka přemístit z nepříznivého prostředí do prostředí pro ni příznivějšího.

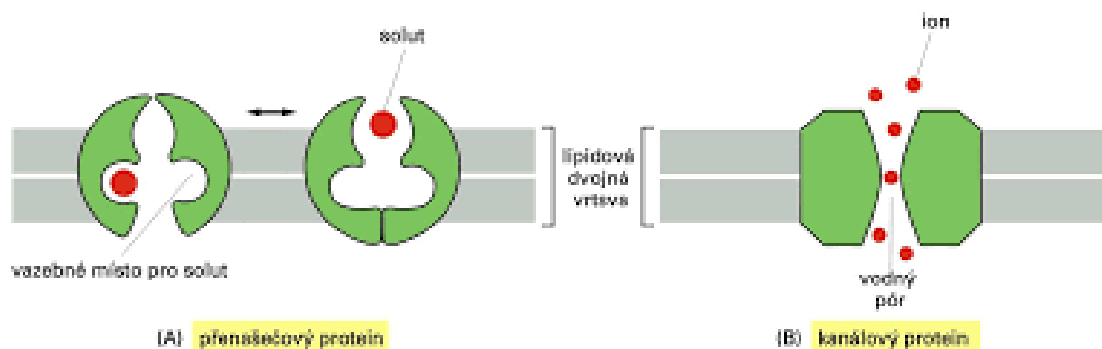
Dále tyto receptorové proteiny mohou sloužit jako vazebná místa pro opsonizující látky vytvářené hostitelem. Díky této vazbě dojde k opsonizaci neboli „zviditelnění“ bakteriální buňky pro imunitní systém a může tak dojít k její fagocytóze. Nebo dojde přímo k destrukci bakterie navázanou protilátkou. Vazba mezi protilátkou a vazebným místem receptorového proteinu je velice pevná (Alberts, 2008). Příkladem takového proteinu může být Opa – protein patogenní bakterie *Neisseria gonorrhoeae* (Hauck a Meyer, 2003).

2.4 Transportní proteiny

Dalším typem transmembránových proteinů jsou proteiny zajišťující transport látek. Tyto proteiny jsou velice důležité kvůli nepropustnosti cytoplasmatické membrány

pro většinu molekul. Jejich hlavní funkcí je přenos látek z okolního prostředí do buňky a naopak. Přenášené látky musejí být rozpustné ve vodě. Do bakteriální buňky transportní proteiny přenášejí živiny a ven z buňky poté odvádějí odpadní produkty metabolismu bakterií. Takže na rozdíl od receptorových a adhezivních proteinů, skrz ně mohou látky procházet oběma směry (Tan et al., 2008).

Transportní proteiny se dělí do dvou tříd a to na třídu přenašečových proteinů a třídu proteinových kanálů. Proteiny tvořící kanály vytvářejí v membráně póry, kterými mohou látky procházet pasivní i aktivní difúzí. Pro umožnění průchodu musejí být kanály otevřené (Obrázek 11 – B). Přenašečové proteiny na sebe nejprve musí přenášenou látku navázat a uzavřít svou část, která vyčnívá do okolního prostředí. Po otevření části, která se otevírá dovnitř bakteriální buňky, se navázaná látka uvolní z vazby na přenašečový protein a vstoupí do buňky (Obrázek 11 – A). Těmito proteiny jsou přenášeny malé molekuly organických látek (Alberts, 2008).



Obrázek 11 – Třídy transportních membránových proteinů
Převzato z: Alberts, 1998

Rozdíl mezi proteinovými kanály a přenašečovými proteiny nastává ve výběru látek, které budou přenášet. Proteiny tvořící kanály si vybírají látky, které mají velkou molekulu a vyhovující náboj. Přenašečové proteiny přenášejí pouze látky, které jsou shodné s vazebným místem proteinu (Alberts, 2008).

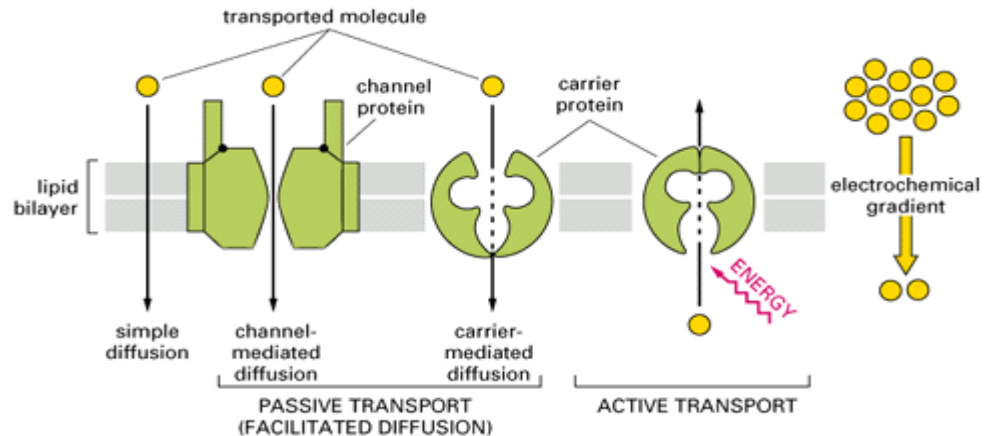
Každý z transportních proteinů je specifický pro danou látku. Některé jsou specifické pro sacharidy, jiné pro aminokyseliny nebo pro ionty. Transportní proteiny se specificitou pro ionty se nazývají iontové kanály. Díky těmto iontovým kanálům je udržován osmotický tlak na obou stranách membrány, tak aby nedocházelo k poškození cytoplasmatické membrány. V hypertonicém prostředí se pro vyrovnání tlaků buňky čerpají ionty dovnitř a vypuzuje se voda. V hypotonickém prostředí se naopak ionty vypuzují ven z buněčného těla, voda z okolního prostředí se nasává (Alberts, 2008).

2.4.1 Pasivní transport

Pasivní transport je děj, který probíhá samovolnou difúzí přes membránu nebo je umožněn kanálovými či přenašečovými proteiny (Obrázek 12). Dělí se na prostou difúzi, usnadněnou difúzi a osmózu. Prostá difúze zahrnuje pohyb molekul z prostředí o vyšší koncentraci do prostředí o nižší koncentraci. Rozdíl mezi těmito koncentracemi se nazývá koncentrační gradient. Molekuly se tedy pohybují ve směru koncentračního spádu. Prostá difúze probíhá tak dlouho, dokud nedojde k vyrovnání koncentračního rozdílu. Usnadněnou difúzi umožňují přenašečové proteiny a proteiny tvořící kanály. K transportu opět přispívá koncentrační gradient. Mezi proteiny tvořící kanály patří akvaporiny, které umožňují průchod vody přes membránu usnadněnou difúzí (Alberts, 2008; Arcizet, 2008).

2.4.2 Aktivní transport

Aktivní transport je umožněn pouze přenašečovými proteiny. Ty jsou schopné přenést danou molekulu proti koncentračnímu spádu. To znamená, že přenáší molekuly z prostředí o nižší koncentraci do prostředí o vyšší koncentraci. Většinou se jedná o transport odpadních látek ven z bakteriální buňky (Alberts, 2008).



Obrázek 12 – Možnosti transportu látek skrz cytoplasmatickou membránu
Převzato z: Alberts, 2008

2.4.3 Poriny

Poriny jsou integrální transportní membránové proteiny, které zajišťují vstup antimikrobiálních látek do bakteriálních buněk. Konkrétně jsou zodpovědné za vstup beta-laktamových, chloramfenikolových a fluorochinolonových antibiotik do gramnegativních bakterií. Rychlost difúze těchto antibiotik závisí na velikosti porinového

kanálku a na jeho selektivitě. Ztráta porinů či změna jejich konformace má za následek vznik rezistence vůči antibiotikům (Poetsch a Wolters, 2008).

3 Laboratorní metody proteomické analýzy

Proteomika je přírodní vědní obor, který vznikl na základě genomiky. Umožňuje identifikaci a kvantifikaci proteomu neboli souboru proteinů, který je vázaný na genom daného organismu, tkáň nebo samotné buňky. Proteom je na rozdíl od genomu, který je neměnný, dynamický. Jeho dynamika spočívá ve změnách spojených s časem a podmínkami pro daný organismus či buňku. Kromě identifikace a kvantifikace proteinů se určují funkční a strukturní vlastnosti proteinů, dále i jejich lokalizace v buňce, popisuje se glykosylace a fosforylace neboli posttranslační modifikace a protein – proteinové interakce (Halada, 2005).

Proteomiku je možné rozdělit z hlediska přístupu na analytickou, strukturní, funkční, diferenční, tzv. „High-throughput“ (vysoce výkonnou), tzv. „High-coverage“ (s vysokým pokrytím), tzv. Bottom-up, Shotgun a Top-down proteomiku. Proteomika bakteriálních proteinů využívá především Bottom-up a Shotgun přístupy. Během Bottom-up proteomického přístupu je bílkovina izolována ze směsi, enzymaticky rozštěpena na peptidy, které jsou identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Shotgun proteomika využívá kombinace separační metody (HPLC), při které jsou peptidy z enzymaticky rozštěpené směsi bílkovin separovány, a tandemové hmotnostní spektrometrie, kdy je určena sekvence separovaných peptidů (Chmelík, 2005).

3.1 Gelové techniky

3.1.1 Jednorozměrná gelová elektroforéza

Jednorozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (1-D SDS-PAGE) je nejjednodušší účinnou technikou při analýze membránových proteinů. Frakce, obohacená o membránové proteiny, je separována pomocí SDS-PAGE, kdy se využívá vysoce účinného aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS).

Tato technika je často kombinována s další separační metodou a to s kapalinovou chromatografií následovanou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS (Skipp et al., 2005). Výhodami této kombinace je vysoce účinná solubilizace membránových proteinů

prostřednictvím SDS a jednoduchost techniky. Nevýhodou představuje nízká rozlišovací schopnost SDS-PAGE techniky (Cordwell, 2006).

3.1.2 Dvourozměrná gelová elektroforéza

Dvourozměrná elektroforéza (2-DE) je nejčastěji používanou elektromigrační technikou v proteomice. Směs proteinů je zde rozdělena ve dvou směrech. První směr představuje izoelektrická fokusace (IEF) a druhý směr představuje polyakrylamidová elektroforéza za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Výsledkem elektroforézy je proteinová mapa s proteinovými skvrnami neboli spoty (Slabý, 2015).

Technika 2-DE není zcela vhodná pro separaci vysoce hydrofobních integrálních membránových proteinů, které mohou precipitovat během IEF (Klein et al., 2007). Integrální membránové proteiny obsahují mnoho transmembránových domén. Nicméně, je 2-DE užitečná pro analýzu méně hydrofobních proteinů obsahujících nejvýše jednu transmembránovou doménu, např. vnějších membránových proteinů (Fountoulakis et al., 2003; Xu et al., 2005; Ying et al., 2005). Výhodami metody jsou jednoduchost, možnost použití pro povrchové membránové proteiny gramnegativních bakterií a vysoká rozlišovací schopnost (Poetsch a Wolters, 2008). Nevýhodou je nedostatečná identifikace integrálních membránových proteinů z důvodu absence některých membránou asociovaných proteinů (Cordwell, 2006).

3.1.2.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku je nejdůležitějším krokem proteomické analýzy. Membrány bakteriálních buněk musí být nejprve rozrušeny, aby došlo k uvolnění membránových proteinů. Rozrušení se provádí fyzikálními nebo chemickými vlivy. Příprava vzorku zahrnuje i odstranění neproteinových komponent pomocí centrifugace. Dalším krokem přípravy vzorku je solubilizace neboli rozpuštění proteinů (Gersten, 1996). Rozpuštění probíhá v roztocích lyzačních pufrů, které mají nižší iontovou sílu (nízká koncentrace soli). Nižší iontová síla je lepší pro následnou separaci v gelu. V pufru musí být přítomen detergent, který snížením povrchového napětí proteinů zlepšuje jejich rozpouštění a udržuje proteiny rozpouštěné i při elektroforéze. Dále detergenty zamezují hydrofobním interakcím mezi proteiny. Příkladem detergentů je Triton X-100, NP-40, ASB 14, CHAPS nebo SB 3-10 (Váňa a Šmarda, 2004). Pro solubilizaci bakteriálních membránových proteinů je vhodný sulfobetainový detergent (Herick, 2005).

V lyzačním pufru jsou dále přítomny chaotropní činidla, která denaturují proteiny a přerušují vodíkové můstky. Jejich funkcí je zvýšení solubilizace proteinů a dále zlepšují rozlišení. Jako chaotropní činidla se používá močovina nebo thiomočovina. Redukční činidla v lyzačním roztoku rozbíjejí disulfidové můstky a udržují proteiny v redukovaném stavu. Díky nim dochází k rozvinutí proteinových molekul, což se projeví lepším rozdělením na polyakrylamidovém gelu. Mezi redukční činidla používaná v lyzačních roztocích patří DTT (dithiotreitol), TBP (tributylfosfin) a DET (dithioerythritol). Další součástí jsou amfolyty. V oblasti jejich isoelektrického bodu pI mají vysokou pufrující schopnost, elektrickou vodivost a rozpustnost. Jejich funkcí je omezení elektrostatických interakcí mezi proteiny, tvoří pH gradient, zabraňují agregaci a opět zvyšují solubilizaci proteinů, přispívají k lepšímu rozložení proteinů na gelu (Váňa a Šmarda, 2004).

3.1.2.2 Izelektrická fokusace

Během isoelektrické fokusace se solubilizované proteiny v stejnosměrném elektrickém poli rozdělují na základě svých isoelektrických bodů pI (Bouchal a Kučera, 2003). Isoelektrický bod představuje hodnotu pH, ve které se součet kladných a záporných nábojů na molekule proteinu rovná nule. Mezi elektrodami je pH gradient, kdy se na anodě ustanovuje kyselé pH a na katodě zásadité pH. Proteiny se při separaci pohybují vlivem elektrického proudu do místa jejich isoelektrického bodu.

Dříve byly používány trubičkové gely. V současné době jsou používány komerčně dostupné proužky gelu s imobilizovaným pH gradientem. Označují se zkratkou IPG (z anglického Immobilized pH Gradient). Oproti trubičkovým gelům je zde výhodou možnost aplikace většího množství vzorku a zvýšení reprodukovatelnosti (Slabý, 2015).

3.1.2.3 Polyakrylamidová elektroforéza

Pro rozdělení proteinů dle molekulové hmotnosti se používá polyakrylamidová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného, která probíhá ve směru kolmém na směr IEF. SDS je silným detergentem, váže se na protein a uděluje mu povrchový negativní náboj, úměrný velikosti proteinu (Slabý, 2015). Záporně nabitě molekuly proteinů putují směrem k anodě, přičemž pohyb je úměrný odporu, který klade gelová matrice.

3.1.3 Modrá nativní gelová elektroforéza

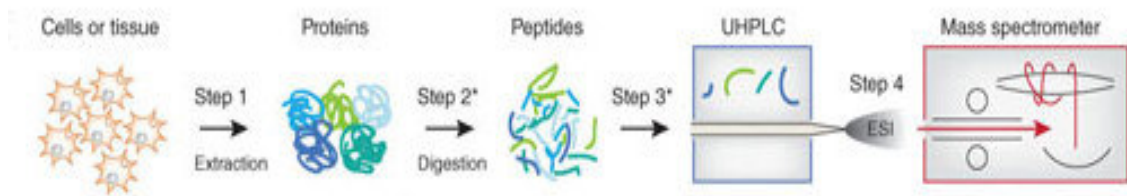
Tato separační metoda zachovává aktivitu proteinů a protein-proteinové interakce. Modrou nativní gelovou elektroforézou (BN-PAGE) je možné separovat enzymaticky aktivní proteiny a proteinové komplexy. Do elektrodového pufru je přidán mírný neionogenní detergent, např. Triton X-100, n-dodecyl- β -D-maltosid nebo digitonin (Schagger a Von Jagow, 1991). Ke vzorku se přidává negativně nabitá Coomassie briliantová modř, která se váže na hydrofobní oblasti proteinů. Negativní náboj má především prospěšný vliv na rozpustnost integrálních membránových proteinů. BN-PAGE je kombinována s druhou dimenzí, kterou představuje SDS-PAGE, výsledkem je vyšší rozlišovací schopnost techniky.

Například Stenberg et al. (2005) ve své studii určil 34 proteinových komplexů obsahujících 44 proteinů vnitřních membránových vezikul izolovaných z *Escherichia coli*.

3.2 Shotgun proteomické negelové techniky

Pro komplexní analýzu membránových proteinů je nezbytné využít přístup, který obchází gelové separační metody. Tuto možnost nabízí tzv. „shotgun“ proteomika, která sdružuje jak separační, tak identifikační metody. K separaci před identifikací dochází však až na úrovni peptidů, kdy komplexní proteinová směs je před separací nejprve štěpena trypsinem. Tato metoda používá dvourozměrnou kapalinovou chromatografii (2-DLC), v prvním směru se jedná o kation výměnnou chromatografii následovanou chromatografií na reverzní fázi. Chromatografické techniky byly do proteomiky zavedeny kvůli omezení, která s sebou nesou gelové elektromigrační techniky. Peptidy separované 2-DLC jsou poté podrobeny analýze v tandemovém hmotnostním spektrometru.

Na obrázku 13 je znázorněno schéma Shotgun proteomické negelové techniky. V prvním kroku dochází k extrakci proteinů z buněk. Druhý krok spočívá v proteolytickém štěpení proteinů na peptidy. Třetí krok představuje separaci peptidů vysoce výkonnou kapalinovou chromatografií. Posledním krokem je hmotnostní spektrometrie separovaných peptidů ionizovaných elektrosprejem (Meissner a Mann, 2014).



Obrázek 13 – Schéma Shotgun proteomické negelové techniky

Převzato z: Meissner a Mann, 2014

Analýzou bakteriálních membránových proteinů se zabýval Fisher et al. (2006), který za použití 2-DLC odhalil 326 integrálních membránových proteinů. Technika 2-DLC, ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, je užitečná zejména pro mapování exprimovaných proteinů, avšak není vhodná pro kvantitativně komparativní analýzy. Pro kvantifikační analýzy je nutné peptidy vhodným způsobem označit (Cordwell, 2006). Řešením je derivatizace látkami obsahujícími stabilní izotopy jako např. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$. Peptidy značené látkou, která má stejnou chemickou strukturu, ale rozdílnou molekulovou hmotnost, bude schopen hmotnostní spektrometr od sebe oddělit.

3.3 Metody izotopového značení

Pro diferenciální membránovou proteomiku jsou k dispozici různé metody izotopového značení, o kterých pojednávají následující kapitoly.

3.3.1 SILAC

Metoda SILAC (z angl. Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture) využívá ke značení stabilní izotopy neradioaktivních těžkých aminokyselin, které jsou v průběhu kultivace buněčných kultur inkorporovány do nově syntetizovaných proteinů. Kultivace probíhá v lehkém a těžkém kultivačním médiu, které se liší přítomností neznačených aminokyselin, např. arginin, lysin (lehké médium) a stejných značených aminokyselin (těžké médium) obsahující izotopy ^{13}C a ^{15}N .

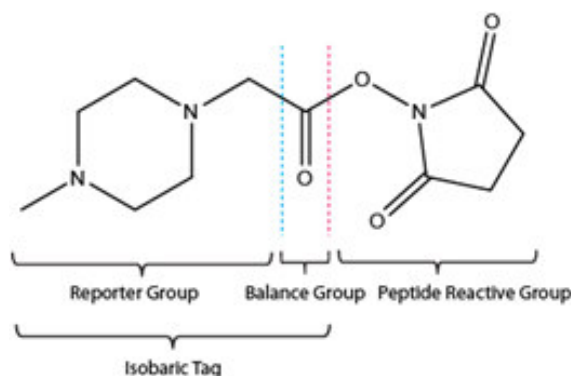
Po kultivaci se z obou buněčných kultur izolují proteiny a smíchají se v poměru 1:1. Proveďte se štěpení sekvenčně specifickou proteázou a následuje analýza tzv. shotgun postupem. Z hmotnostních spekter jsou poté identifikovány píky stejných peptidů, které se liší přesně definovaným hmotnostním posunem. Z poměru intenzit těchto píků je odečítána relativní kvantifikace (Hernychova et al., 2014).

Použití metody SILAC ve spojení s 2-DLC MS/MS (tandemová hmotnostní spektrometrie) znamená, že všechny proteiny asociované s bakteriální membránou mohou být kvantitativně porovnány při standardním experimentálním uspořádání kontrolní a ovlivněná buňka (Cordwell, 2006).

Touto metodou se zabývala Dreisbach et al. (2008). Ve své studii identifikovala u kmene *Bacillus subtilis* ve stacionární fázi růstu 456 bílkovin a dokázala, že výhodou této metody je značení proteinů již během růstu organismu. Tato metoda je kompatibilní s gelovými technikami a hmotnostní spektrometrií.

3.3.2 iTRAQ

Metoda iTRAQ (z angl. Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification) využívá čtyř izobarických značek složených z amin-specifické reaktivní skupiny, vyrovnávací skupiny a reportérové oblasti s molekulovou hmotností 114 – 117 Da (Choe et al., 2005). iTRAQ technika provádí kvantifikaci v MS/MS módu a umožňuje analyzovat čtyři, nověji až osm vzorků v jednom experimentu (Hernychová et al., 2014).



Obrázek 14 – Struktura iTRAQ činidla

Převzato z: <https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/itraq>

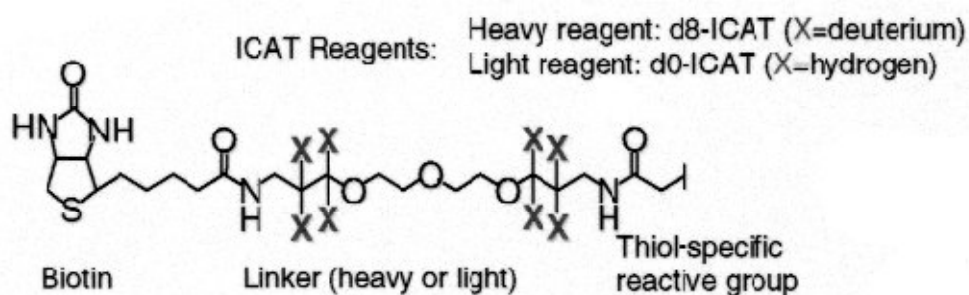
Struktura izobarických značek je znázorněna na Obrázku 14. Peptidy jsou označeny iTRAQ značkami a při fragmentaci v MS/MS módu se od modifikovaných peptidů odděluje reportérová část. Z intenzit reportérových iontů ve spektru lze vypočítat relativní koncentraci jednotlivých peptidů (Hernychová et al., 2014)

Radosevich et al. (2007) porovnal dva kmeny *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 a 187. Kmen K-10 byl laboratorně přizpůsobený a kmen 187 byl získán z krávy, která vykazovala příznaky Johnovy choroby. Pro analýzu byla použita metoda

izotopového značení iTRAQ a tandemová hmotnostní spektrometrie. Během studie bylo získáno 874 membránových a cytosolových proteinů. Například protein AHPC spolu s dalšími proteiny zapojenými do metabolismu dusíku byly nalezeny ve vyšších koncentracích u kmene K-10. Údaje získané touto studií mohou poskytnout nástroj pro lepší pochopení průběhu infekce v hostiteli a mohou být nápomocny ve vývoji vakcíny.

3.3.3 ICAT

Další kvantifikační metoda ICAT (z angl. Isotope – Coded Affinity Tag) je spojena s afinitní chromatografií modifikovaných peptidů. Ke značení dochází prostřednictvím chemické reakce, během které se váží lehké a těžké formy ICAT na proteiny obsahující cystein přes thiolovou skupinu v redukovaném stavu (Češková et al., 2006). ICAT činidlo je tedy tvořeno reaktivní skupinou, linkerem nesoucím lehké nebo těžké formy izotopů a biotinem. Jeho struktura je znázorněna na Obrázku 15. Tímto způsobem označené proteinové směsi jsou následně smíchány a podrobeny proteolýze. Značené peptidy jsou afinitně purifikovány, separovány 2-DLC a charakterizovány hmotnostní spektrometrií. Z poměrů izotopově značených peptidů pak lze kvantifikovat rozdíly v proteinové expresi (Cordwell, 2006).



Obrázek 15 – Struktura ICAT afinitního činidla
Převzato z: Gygi et al., 1999

Metoda ICAT je vhodná pro srovnávací analýzu se dvěma vzorky. Hlavní nevýhodou této metody je značení pouze těch peptidů, které obsahují cystein. Řada peptidů tak zůstává neoznačena (Cordwell, 2006).

Kvantitativní proteomickou analýzou membránových proteinů značených ICAT značkami se zabývala Guina et al. (2003) u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* izolovaných z dýchacích cest malých pacientů s cystickou fibrózou. Analýzou bylo nalezeno 1 331 proteinů, z nichž bylo 145 proteinů závislých na změně koncentrace hořčičku v médiu.

3.3.4 ICPL

Metoda ICPL (z angl. Isotope – Coded Protein Label) je založena na značení volných aminoskupin izolovaných inaktivních proteinů, které jsou následně štěpeny. Značení je zprostředkováno deriváty $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ 6-nicotinoyl-NHS-hydroxysuccinimidu (Schmidt et al., 2005).

3.3.5 Značení $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$

Další metoda značení spočívá ve výměně ^{16}O na C-konci peptidu za ^{18}O během enzymatického štěpení trypsinem v H_2^{18}O . Jeden ze vzorků je štěpen v přítomnosti lehkého izotopu H_2^{16}O a druhý je štěpen v přítomnosti těžkého izotopu H_2^{18}O (Yao et al., 2001).

Pro další analýzu se značené vzorky opět smíchají a separují se pomocí kapalinové chromatografie. Identifikace je provedena hmotnostní spektrometrií, kdy se porovnávají rozdíly v molekulových hmotnostech.

4 Příklady proteomické analýzy bakteriálních membránových proteinů

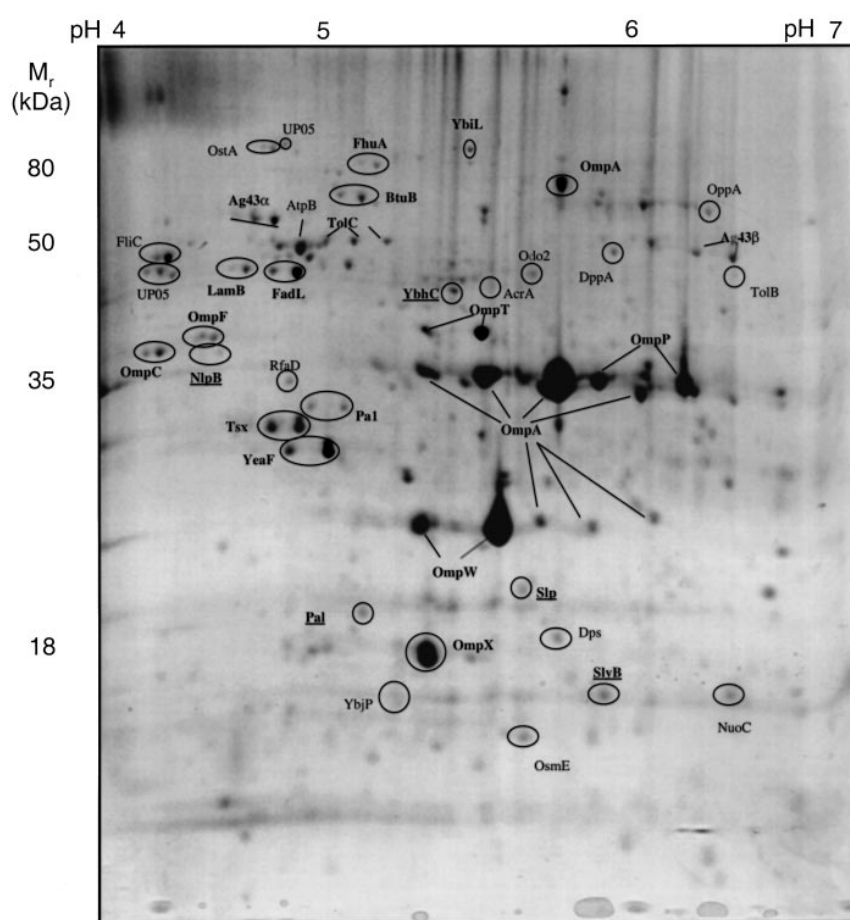
4.1 Proteomická analýza vnější membrány *Escherichia coli*

Jako první příklad proteomické analýzy bakteriálních membránových proteinů je uvedena studie prováděna Molloyem et al. (2000), který analyzoval vnější membránové proteiny *Escherichia coli*.

Pro analýzu byl kultivován kmen W3110 *Escherichia coli* K-12. Kultivace probíhala aerobně za třepání při 37°C a pH 6,6. Pomocí databáze SWISS-PROT bylo nalezeno, že vnější membrána daného kmene obsahuje 58 potencionálních proteinů rozdělených do 4 sekcí. První sekci představovalo 37 integrálních membránových proteinů s pI 4 – 7 (Přílohy – Tabulka 1). Ve druhé sekci byly nalezeny 2 integrální membránové proteiny s pI větším než 7 (Přílohy – Tabulka 2). Třetí sekci představovalo 10 membránových lipoproteinů s hodnotou pI 4 – 7 (Přílohy – Tabulka 3). Poslední čtvrtou sekci představovalo 9 membránových lipoproteinů s pI větším než 7 (Přílohy – Tabulka 4). U *Escherichia coli* není předpokládán výskyt proteinů s hodnotou isoelektrického bodu pI menším než 4.

V příloze jsou v tabulkách vypsány výše uvedené potencionální membránové proteiny, které byly popsány na základě stanovených kultivačních podmínek v databázi SWISS-PROT. Tučně zvýrazněné proteiny jsou hypotetické, známé pouze z otevřeného čtecího rámce (ORF Open-Reading Frame). Proteiny psané kurzívou byly identifikovány na základě uhličitánové extrakce, 2-DE a PMF (Peptide Mass Fingerprinting). Hodnoty GRAVY označují relativní hydrofobicitu, přičemž s její rostoucí hodnotou roste hydrofobicita. Všechny uvedené proteiny, kromě hypotetických, byly identifikovány.

Ve skutečnosti byly pro danou analýzu separovány a identifikovány tyto proteiny zobrazené na obrázku 21 a uvedené v příloze (Přílohy – Tabulka 5).



Obrázek 16 – Uhličitánově rozpuštěné membránové proteiny *Escherichia coli*
Převzato z: Molloy et al., 2000

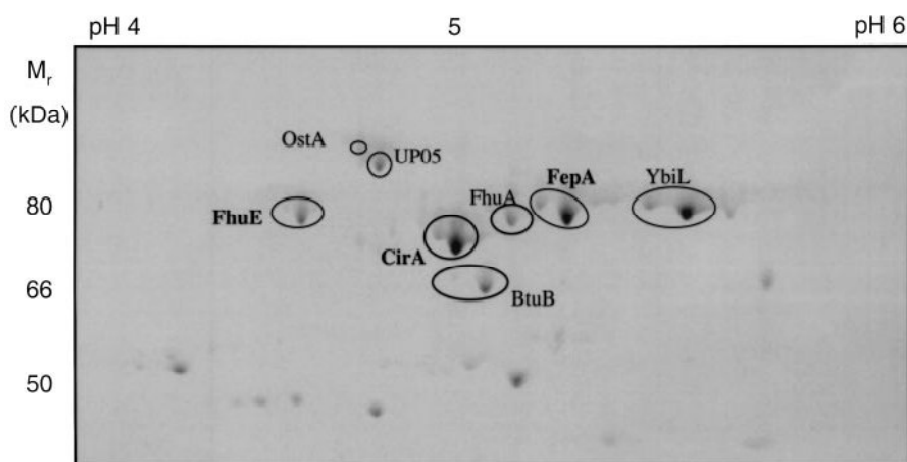
Na obrázku 16 jsou separované proteiny obarveny barvivem Coomassie Brilliant Blue. S výjimkou flagelinu byly všechny ostatní proteiny identifikovány jako proteiny vnější membrány. Bylo identifikováno i pět lipoproteinů. Poslední tři proteiny nebyly identifikovány jako membránové, ale mohou to být proteiny, které se s membránami spojují. Číslo

v závorkách udávají počet přídatných peptidů s molekulovou hmotností menší než 1000 Da nebo větší než 2200 Da (Přílohy – Tabulka 5).

Celkově bylo identifikováno 40 proteinů, z nichž je 75 % popsáno v databázi SWISS-PROT Release 37 protein database jako membránových nebo s membránou spojených. U identifikovaných 26 proteinů se předpokládá, že jejich isoelektrický bod pI je v rozmezí 4 – 7 a jejich molekulová hmotnost je v rozmezí od 10 do 80 kDa.

Mezi identifikovanými proteiny vnější membrány *Escherichia coli* byly nalezeny integrální membránové proteiny, poriny, transportní proteiny, enzymy, 2 hypotetické proteiny a 5 lipoproteinů. Dále byly identifikovány proteiny AcrA, AtpB a NuoC, které jsou spojené s cytoplasmatickou membránou.

Pro chybějící proteiny, u kterých byla předpokládána jejich detekce, byly navrženy možnosti, při kterých by byla jejich identifikace možná. Prvním návrhem byla indukovaná exprese receptorů pro železo, během které byla snížena koncentrace železa v kultivačním médiu. Separací a analýzou PMF nově vykultivovaného kmene *Escherichia coli* byly identifikovány proteiny vnější membrány CirA, FhuE a FepA fungující jako receptory pro železo (Obrázek 17). Z toho vyplývá, že absence receptorů pro železo je způsobena nízkou úrovní exprese těchto proteinů.



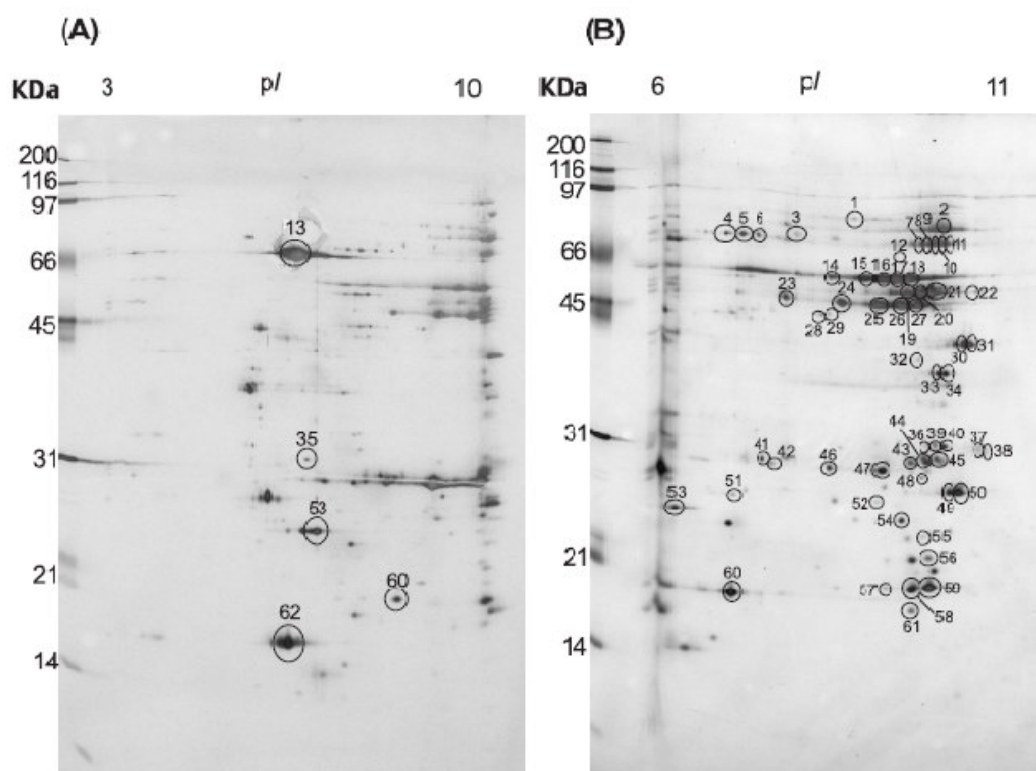
Obrázek 17 – Proteiny identifikované po kultivaci s omezením železa
Převzato z: Molloy et al., 2000

Po shrnutí těchto dvou analýz bylo identifikováno 80 % předpokládaných proteinů vnější membrány kmene *Escherichia coli* K-12, které byly nalezeny v databázi SWISS-PROT Release 37 protein database. Zbýlých 20 % neidentifikovaných proteinů nebylo identifikováno kvůli své molekulové hmotnosti, která přesahuje 80 kDa. K jejich ztrátě mohlo dojít během separace, například během isoelektrické fokusace.

4.2 Proteomická analýza sarkosin-nerozpustné frakce vnější membrány kmene *Helicobacter pylori* 26695

Studii vnějších membránových proteinů kmene *Helicobacter pylori* 26695 způsobujícího gastroduodenální vředy, chronickou gastritidu i rakovinu žaludku (Baik et al., 1996; Blaser, 1987; Forman et al., 1991; Nomura et al., 1991) se zabýval Baik et al. (2004).

Sarkosinová nerozpustná frakce byla rozdělena dvourozměrnou elektroforézou pomocí IPG proužků s imobilizovaným pH gradientem 3 až 10 (Obr. 18 A). Proteiny byly detekovány barvením stříbrem. Vzhledem k tomu, že proteinové skvrny v alkalické oblasti pI byly umístěny v těsné blízkosti, byla tato frakce umístěna na proužek s rozsahem pH gradientu 6 až 11, kde bylo vidět více než 80 stříbrem barvených proteinových skvrn (Obr. 18 B). Skvrny byly vyříznuty, odbarveny a v gelu štěpeny trypsinem. Molekulová hmotnost peptidových směsí byla měřena pomocí MALDI-TOF-MS. Molekulové hmotnosti identifikovaných proteinů jsou uvedeny v příloze.

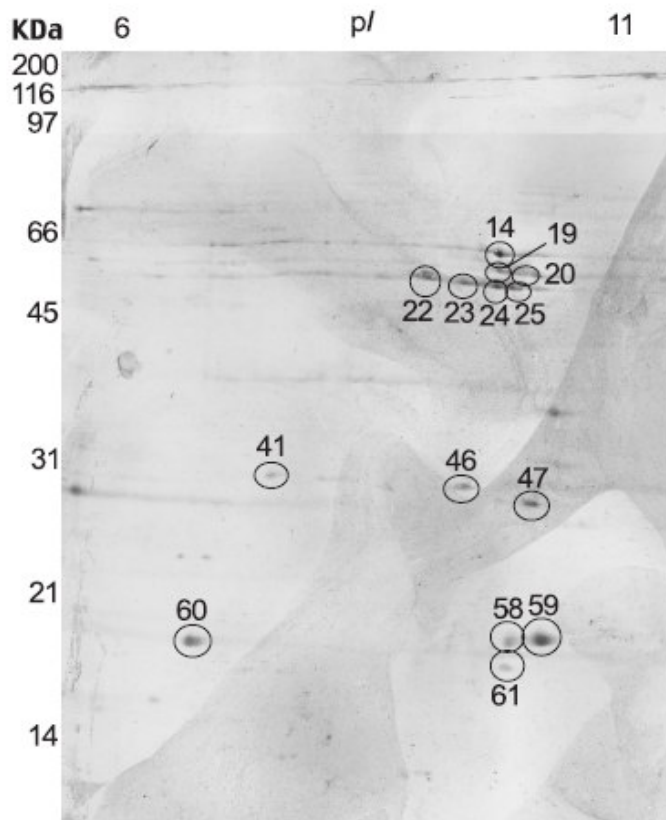


Obrázek 18 – Sarkosin-nerozpustná frakce *Helicobacter pylori* 26695 na IPG proužcích barvených stříbrem, A – IPG proužek pH 3 až 10, B – IPG proužek pH 6 až 11
Převzato z: Baik et al., 2004

Celkem bylo zpracováno 80 proteinových skvrn, z nichž 62 bylo identifikováno (Přílohy – Tabulka 6). Identifikované proteiny představovaly 35 membránových proteinů,

16 druhů vnějších membránových proteinů a 5 hypotetických proteinů, jejichž lokalizace není jasná.

Dále bylo pomocí imunoblotové analýzy identifikováno 9 imunoreaktivních proteinů: kataláza, vnější membránové proteiny 11, 14, 20 a 21, hypotetický protein 1173, ureáza, domnělý hemaglutinový neuraminyllaktózu vázající homolog a (3R)-hydroxymyristoyl-acyl vázající protein dehydratáza (Obrázek 19). Pro analýzu byla použita séra získaná od infikovaných pacientů. Všechny tyto proteiny jsou uvedené v příloze (Přílohy – Tabulka 7).



Obrázek 19 – Imunoblot 2-DE sarkosin-nerozputné frakce *Helicobacter pylori*
Převzato z: Baik et al, 2004

Studie přispěla k charakterizaci proteomu *Helicobacter pylori* 26695 a mohla dále pomoci objasnit biologickou funkci vnějších membránových proteinů a patogenezi infekce *Helicobacter pylori*. Mimoto přispěla k identifikaci nových cílových proteinů pro vývoj vakcíny.

4.3 Proteomická analýza membránových proteinů *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes je gampozitivní patogenní bakterie jejíž studii se zabýval Severin et al. (2007). Povrchové proteiny hrají zásadní roli v interakcích s hostitelskými buňkami a jejich identifikace je důležitá pro vývoj vakcín.

Získané proteiny byly proteolyticky štěpeny trypsinem a peptidová směs byla nejprve rozdělena vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a poté analyzována multidimenzionální tandemovou hmotností spektrometrií. Celkem bylo identifikováno 79 povrchových proteinů, 14 proteinů s motivy pro kotvení k buněčným stěnám, 12 lipoproteinů, 9 secernovaných proteinů, 22 s membránou asociovaných proteinů, 1 protein asociovaný s bakteriofágem a 21 cytoplasmatických proteinů. Proteiny byly během kultivace kmene sbírány v různých růstových fázích. V časně růstové fázi bylo zjištěno 12 proteinů, které se nevyskytovaly v pozdní růstové fázi. V pozdní růstové fázi bylo detekováno 17 proteinů, které nebyly nalezeny v časně fázi. Zbýlých 50 proteinů se vyskytovalo v obou růstových fázích.

Mezi 14 detekovaných proteinů kovalentně připojených k peptidoglykenům buněčné stěny patřily M protein, C5a peptidáza, protein vázající kolagen, ScIA kolagen-podobný protein, GRAB protein, pullulanáza, domnělé proteiny a hypotetické proteiny. M protein spolu s C5s peptidázou a GRAB proteinem hrají důležitou roli ve virulenci kmene. Mezi detekovanými extracelulárními proteiny byli streptolysin O, streptokokový pyrogenní exotoxin B, penicilin vázající protein. Dále byly nalezeny proteiny, které jsou lokalizovány jak v membráně, tak v cytoplasmě. Všechny detekované proteiny jsou uvedeny v příloze (Přílohy – Tabulka 8).

Závěr

V práci jsem se zabývala proteomickou analýzou bakteriálních membránových proteinů. V úvodu byla popsána funkce a struktura bakteriálních membrán, typy membránových proteinů a jejich funkce, které v bakteriálních membránách plní. Další část byla věnována proteomickým metodám následována konkrétními příklady proteomických analýz vybraných kmenů bakterií.

Studium bakteriálních membránových proteinů je ve vědecké komunitě velmi žádoucí z důvodu vysoce důležité úlohy membránových proteinů v bakteriální patogenezi. Proteiny v membráně fungují jako adheziny, poriny, receptory, pohybové a signální proteiny, enzymy. Mnohé jsou rovněž zapojeny do různých mechanismů rezistence k antibiotikům. Proteomické metody umožňují také analyzovat imunoreaktivní proteiny, které jsou klíčové pro výzkum a vývoj nových vakcín. Odvětvím proteomiky, které se zabývá imunoreaktivními proteiny, je imunoproteomika.

Zakladními laboratorními metodami, které se k identifikaci membránových proteinů používají, jsou různé typy gelových elektromigračních technik. Nejčastěji pak dvourozměrná elektroforéza, která je následována hmotnostní spektrometrií. Bohužel separace membránových proteinů technikou dvourozměrné elektroforézy má určitá omezení. Vhodnějším přístupem je tzv. „shotgun“ proteomika, která umožňuje rozdělení peptidů, získaných proteolytickým štěpením proteinových směsí. Je založena na dvourozměrné kapalinové chromatografii následovanou hmotnostní spektrometrií.

Proteomika má přínos i v jiných vědních oborech než je mikrobiologie. Uplatnit se může rovněž v lékařství, kde lze identifikovat nové markery, jenž se mohou použít v diagnostice, prevenci a prognóze různých onemocnění.

Seznam literatury

ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing, c1994. ISBN 0-8153-1619-4.

ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.

ALBERTS, Bruce. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd. Překlad Arnošt Kotyk, Bohumil Bouzek, Pavel Hozák. Ústí nad Labem: Espero, c1998. ISBN 80-902906-2-0.

ALCAMO, I. Edward. *Fundamentals of microbiology*. 4th ed. Redwood City, Calif.: Benjamin/Cummings Puč. Co., c1994. ISBN 0-8053-0325-1.

ARCIZET, Delphine, et al. Temporal analysis of active and passive transport in living cells. *Physical review letters*, 2008, 101.24: 248103.

BAIK, Seung-Chul, et al. Increased oxidative DNA damage in Helicobacter pylori-infected human gastric mucosa. *Cancer Research*, 1996, 56.6: 1279-1282.

BAIK, Seung-Chul, et al. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of Helicobacter pylori strain 26695. *Journal of bacteriology*, 2004, 186.4: 949-955.

BLASER, Martin J. Gastric Campylobacter-like organisms, gastritis, and peptic ulcer disease. *Gastroenterology*, 1987, 93.2: 371-383.

BOUCHAL, Pavel, **KUČERA**, Igor. Dvourozměrná elektroforéza v proteomice: principy a aplikace. *Chem. Listy*, 2003, 97, 29-36.

CORDWELL, Stuart J. Technologies for bacterial surface proteomics. *Current opinion in microbiology*, 2006, 9.3: 320-329.

COURTNEY, Harry S., et al. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann. Med.* 2002, 34, 77–87.

ČEŠKOVÁ, Pavla, et al. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chem. Listy*, 2006, 100, 974-979.

- DREISBACH**, Annette, et al. Monitoring of changes in the membrane proteome during stationary phase adaptation of *Bacillus subtilis* using in vivo labeling techniques. *Proteomics*, 2008, 8.10: 2062-2076.
- FISCHER**, Frank, et al. Toward the complete membrane proteome high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5.3: 444-453.
- FORMAN**, D., et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Bmj*, 1991, 302.6788: 1302-1305.
- FOUNTOULAKIS**, Michael; **JURANVILLE**, Jean-François. Enrichment of low-abundance brain proteins by preparative electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 2003, 313.2: 267-282.
- GERSTEN**, Douglas M. *Gel electrophoresis--proteins: essential techniques*. New York: John Wiley, c1996. ISBN 0471962651.
- GUINA**, Tina, et al. Quantitative proteomic analysis indicates increased synthesis of a quinolone by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis airways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100.5: 2771-2776.
- GYGI**, Steven P., et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature biotechnology*, 1999, 17.10: 994-999.
- HALADA**, Petr. Metodické přístupy současné fosfoproteomové analýzy. *Chem. Listy*, 2005, 99, 922-929.
- HAUCK**, Christof R.; **MEYER**, Thomas F. 'Small'talk: Opa proteins as mediators of *Neisseria*-host-cell communication. *Current opinion in microbiology*, 2003, 6.1: 43-49.
- HERNYCHOVÁ**, Lenka, et al. Kvantitativní hmotnostní spektrometrie a její využití v onkologii. *Klinická onkologie*, 2014, 27.3.
- HERICK**, Klaus. Integrovaná řešení pro protetické pracovní postupy – Sigma-Aldrich. *Chem. Listy*, 2005, 99, 906-914.
- HORÁČEK**, Jiří. *Základy lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-246-0006-4.
- CHMELÍK**, Josef. Proteomický průvodce. *Chem. Listy*, 2005, 99, 883-885.

- CHOE**, Leila H., et al. A comparison of the consistency of proteome quantitation using two-dimensional electrophoresis and shotgun isobaric tagging in *Escherichia coli* cells. *Electrophoresis*, 2005, 26.12: 2437-2449.
- JULÁK**, Jaroslav. *Úvod do lékařské bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
- JUNGBAUEROVÁ**, Ludmila. *Úvod do mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998. ISBN 80-7184-590-6.
- KAPRÁLEK**, František. *Základy bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2000. ISBN 80-7184-811-5.
- KLEIN**, Christian, et al. The low molecular weight proteome of *Halobacterium salinarum*. *Journal of proteome research*, 2007, 6.4: 1510-1518.
- LUO**, Bing-Hao, et al. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, 25: 619-647.
- MEISSNER**, Felix; **MANN**, Matthias. Quantitative shotgun proteomics: considerations for a high-quality workflow in immunology. *Nature immunology*, 2014, 15.2: 112-117.
- MOLLOY**, Mark P., et al. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European journal of biochemistry*, 2000, 267.10: 2871-2881.
- NOMURA**, Abraham, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New England Journal of Medicine*, 1991, 325.16: 1132-1136.
- POETSCH**, Ansgar; **WOLTERS**, Dirk. Bacterial membrane proteomics. *Proteomics*, 2008, 8.19: 4100-4122.
- RADOSEVICH**, Thomas J., et al. Proteome and differential expression analysis of membrane and cytosolic proteins from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains K-10 and 187. *Journal of bacteriology*, 2007, 189.3: 1109-1117.
- SEVERIN**, Anatoly, et al. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins. *Journal of bacteriology*, 2007, 189.5: 1514-1522.

- SCHÄGGER**, Hermann; **VON JAGOW**, Gebhard. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 1987, 166.2: 368-379.
- SCHLEGEL**, Hans Günter, **C. ZABOROSCH**. *General microbiology*. 7th ed. New York, NY, USA: Cambridge University Press, 1993. ISBN 0521439809.
- SCHMIDT**, Alexander, et al. A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics*, 2005, 5.1: 4-15.
- SKIPP**, Paul, et al. Shotgun proteomic analysis of *Chlamydia trachomatis*. *Proteomics*, 2005, 5.6: 1558-1573.
- SLABÝ**, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 978-80-7492-121-6.
- SPERANDIO**, Markus. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *The FEBS journal*, 2006, 273.19: 4377-4389.
- STENBERG**, Filippa, et al. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *Journal of biological chemistry*, 2005, 280.41: 34409-34419.
- TAN**, Sandra, et al. Membrane proteins and membrane proteomics. *Proteomics*, 2008, 8.19: 3924-3932.
- VÁŇA**, Petr, **ŠMARDA**, Jan. Optimalizace přípravy vzorku pro dvourozměrnou elektroforézu. *Chem. Listy*, 2004, 98, 1130-1134.
- VOTAVA**, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.
- WALKER**, T. Stuart. *Microbiology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., c1998. ISBN 0-7216-4641-7.
- XU**, Changxin, et al. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*, 2005, 5.12: 3142-3152.
- YAO**, Xudong, et al. Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus. *Analytical chemistry*, 2001, 73.13: 2836-2842.
- YING**, Tianyi, et al. Immunoproteomics of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Shigella flexneri* 2a 2457T. *Proteomics*, 2005, 5.18: 4777-4793.

<https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/platforms/proteomics/itraq>

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Muramin_Peptidoglykan_von_E.coli.jpg

Přílohy

Tabulka 1 – Integrované membránové proteiny s hodnotou pI 4 – 7

Název	Popis	pI	M _r [kDa]	GRAVY	Poznámka
YPJA_ECOLI	Hypothetical protein	5,40	162774	- 0,344	Hypothetical
NFRA_ECOLI	Bacteriophage N4 adsorption	6,44	108424	- 0,480	
FIMD_ECOLI	Usher protein	5,96	92090	- 0,447	
SFMD_ECOLI	Usher protein	5,29	91769	- 0,396	
YCBS_ECOLI	Hypothetical protein	5,21	91554	- 0,397	Hypothetical
YEHB_ECOLI	Hypothetical protein	5,67	89982	- 0,547	Hypothetical
YQIG_ECOLI	Hypothetical protein	5,07	89982	- 0,562	Hypothetical
YCDS_ECOLI	Hypothetical protein	5,79	89283	- 0,584	Hypothetical
YRAJ_ECOLI	Hypothetical protein	5,08	89195	- 0,607	Hypothetical
YBGQ_ECOLI	Hypothetical protein	4,99	87794	- 0,459	Hypothetical
YHCD_ECOLI	Hypothetical protein	4,74	84053	- 0,359	Hypothetical
FEPA_ECOLI	<i>Ferrienterobactin receptor</i>	5,23	79771	- 0,620	Gel ID
FHUA_ECOLI	<i>Ferrichrome-iron receptor</i>	5,13	78742	- 0,513	Gel ID
YBIL_ECOLI	<i>Hypothetical TonB dependent r.</i>	5,43	78341	- 0,535	Gel ID
FHUE_ECOLI	<i>Iron(III)-Coprogen receptor</i>	4,72	77411	- 0,572	Gel ID
CIRA_ECOLI	<i>Colicin I receptor</i>	5,03	71149	- 0,673	Gel ID
GSPD_ECOLI	<i>General secretion pathway protein D</i>	5,28	68343	- 0,230	
BTUB_ECOLI	<i>Vitamin B12 receptor</i>	5,10	66326	- 0,586	Gel ID
YIEC_ECOLI	Hypothetical protein	5,11	57939	- 0,667	Hypothetical
AG43_ECOLI (BETA)	<i>Ag 43 Fluffing protein beta chain</i>	6,01	51526	- 0,388	Gel ID
TOLC_ECOLI	<i>OMP</i>	5,23	51468	- 0,492	Gel ID
AG43_ECOLI(ALPHA)	<i>Ag 43 Fluffing protein alpha chain</i>	4,85	49787	- 0,236	Gel ID
LAMB_ECOLI	<i>Maltoporin</i>	4,72	47385	- 0,625	Gel ID
FADL_ECOLI	<i>Long-chain fatty acid transport</i>	4,99	45992	- 0,389	Gel ID
HOFQ_ECOLI	<i>General secretion pathway</i>	5,85	42738	- 0,183	
OMPN_ECOLI	<i>Porin</i>	4,35	39178	- 0,658	
OMPC_ECOLI	<i>Porin</i>	4,48	38308	- 0,660	Gel ID
OMPF_ECOLI	<i>Porin</i>	4,64	37084	- 0,505	Gel ID
OMPA_ECOLI	<i>OMP</i>	5,60	35172	- 0,444	Gel ID
OMPT_ECOLI	<i>Protease VII</i>	5,38	33477	- 0,775	Gel ID
OMPP_ECOLI	<i>Protease</i>	5,89	33110	- 0,748	Gel ID
TSX_ECOLI	<i>Nucleoside transport</i>	4,87	31413	- 0,633	Gel ID
PA1_ECOLI	<i>Phospholipase A1</i>	5,05	30843	- 0,558	Gel ID
YEAF_ECOLI	Hypothetical protein	5,03	25670	- 0,568	Gel ID
YIAT_ECOLI	Hypothetical protein	4,48	25167	- 0,361	Hypothetical
OMPW_ECOLI	<i>OMP</i>	5,58	20852	- 0,163	Gel ID
OMPX_ECOLI	<i>OMP</i>	5,30	16382	- 0,592	Gel ID

Tabulka 2 – Integrální membránové proteiny s pI > 7

Název	Popis	pI	M _r [kDa]	GRAVY	Poznámka
HLP_A_ECOLI	Histone-like protein	9,52	15692	- 0,662	
PGPB_ECOLI	Phosphatidylglycerophosphatase B	10,13	29021	0,256	

Tabulka 3 – Membránové lipoproteiny s hodnotou pI 4 – 7

Název	Popis	pI	M _r [kDa]	GRAVY	Poznámka
YLCB_ECOLI	Hypothetical protein	5,82	48523	- 0,293	Hypothetical
YBHC_ECOLI	Hypothetical protein	5,49	43917	- 0,441	Gel ID
WZA_ECOLI	Putative Polysacch. export protein	5,47	39720	- 0,281	Lipoprotein
YCCZ_ECOLI	Hypothetical polysacch. export	5,24	39534	- 0,204	Hypothetical
NLPB_ECOLI	<i>Lipoprotein 34</i>	4,96	34371	- 0,369	Gel ID
VACJ_ECOLI	VACJ Lipoprotein	4,72	26302	- 0,402	Lipoprotein
CUTF_ECOLI	Copper homeostatis	4,82	23738	- 0,491	Lipoprotein
FLGH_ECOLI	Flagellar 1-ring	6,80	22415	- 0,255	Lipoprotein
SLP_ECOLI	<i>OMP SLP</i>	6,32	19088	- 0,305	Gel ID
PAL_ECOLI	<i>Peptidoglycan-associated protein</i>	5,59	16616	- 0,705	Gel ID

Tabulka 4 – Potencionální membránové lipoproteiny s pI > 7

Název	Popis	pI	M _r [kDa]	GRAVY	Poznámka
MLTD_ECOLI	Murein transglycosylase D	9,84	47909	- 0,481	Lipoprotein
MLTC_ECOLI	Murein transglycosylase C	9,23	38372	- 0,437	Lipoprotein
MLTA_ECOLI	Murein transglycosylase A	8,46	38190	- 0,488	Lipoprotein
MLTB_ECOLI	Murein transglycosylase B	8,47	38122	- 0,412	Lipoprotein
YAEF_ECOLI	Hypothetical protein	7,84	27616	- 0,057	Hypothetical
BLC_ECOLI	<i>OMP BLC</i>	8,56	18042	- 0,468	Lipoprotein
SLYB_ECOLI	<i>OMP SLYB</i>	8,12	13818	- 0,089	Gel ID
YQHH_ECOLI	Hypothetical protein	8,58	7607	- 0,618	Hypothetical
MULI_ECOLI	Major outer membrane lipoprotein	8,12	6385	- 0,905	Lipoprotein

Tabulka 5 – Membránové proteiny kmene *E. coli* identifikované PMF metodou

Název	Popis	Umístění v membráně	Nalezené/Očekávané peptidy
FEPA_ECOLIa	Ferrienterobactin receptor	Integral OMP	11/19
FHUE_ECOLIa	Iron(III)-Coprogen receptor	Integral OMP	16/23 (3)
CIRA_ECOLIa	Colicin I receptor	Integral OMP	11/25 (2)
FHUA_ECOLI	Ferrichrome-iron receptor	Integral OMP	13/19 (1)
YBIL_ECOLI	Hypothetical TonB dependent receptor	Integral OMP	8/17 (1)
BTUB_ECOLI	Vitamin B12 receptor	Integral OMP	13/22 (4)
AG43_ECOLI (BETA)	Antigen 43 Fluffing protein beta chain	Integral OMP	11/13 (4)
TOLC_ECOLI	OMP	Integral OMP	8/14 (4)
AG43_ECOLI(ALPHA)	Antigen 43 Fluffing protein alpha chain	Integral OMP	4/15 (3)
LAMB_ECOLI	Maltoporin	Integral OMP	10/11 (5)
FADL_ECOLI	Long-chain fatty acid transport	Integral OMP	7/13
OMPC_ECOLI	Porin	Integral OMP	6/10 (2)
OMPF_ECOLI	Porin	Integral OMP	4/9 (1)
OMPA_ECOLI	OMP	Integral OMP	6/8 (4)
OMPT_ECOLI	Protease VII	Integral OMP	9/11 (3)
OMPP_ECOLI	Protease	Integral OMP	8/9 (5)
TSX_ECOLI	Nucleoside transport	Integral OMP	4/5 (4)
PA1_ECOLI	Phospholipase A1	Integral OMP	5/9 (1)
YEA_F_ECOLI	Previously hypothetical protein	Integral OMP	6/6 (4)
OMPW_ECOLI	OMP	Integral OMP	6/8
OMPX_ECOLI	OMP	Integral OMP	6/6 (1)
YBHC_ECOLI	Previously hypothetical protein	OM Lipoprotein	8/10
NLPB_ECOLI	Lipoprotein 34	OM Lipoprotein	8/12 (1)
SLP_ECOLI	OMP SLP	OM Lipoprotein	2/3 (1)
PAL_ECOLI	Peptidoglycan-associated protein	OM Lipoprotein	4/5
SLYB_ECOLI	OMP SLYB	OM Lipoprotein	2/5
UP05_ECOLI	Unknown protein from 2D gel	Probably Integral OMP	8/23 (2)
NUOC_ECOLI	NADH Dehydrogenase C chain	CM associated	4/10
ATPB_ECOLI	ATPase B chain	CM associated	8/19 (1)
ACRA_ECOLI	Acriflavin resistance	CM Lipoprotein	3/11 (1)
OSTA_ECOLI	Organic solvent tolerance protein	Periplasmic	9/31 (2)
OPPA_ECOLI	Oligopeptide binding protein	Periplasmic	4/16 (3)
DPPA_ECOLI	Dipeptide binding protein	Periplasmic	3/10 (1)
TOLB_ECOLI	TOLB protein	Periplasmic	5/11
FLIC_ECOLI	Flagellin	Flagella	4/13 (4)
ODO2_ECOLI	Dihydrolipoamide Succinyltransferase	Cytoplasmic	2/7 (3)
DPS_ECOLI	DNA protection during starvation	Cytoplasmic	5/8
RFAD_ECOLI	Glycero-d-manno-heptose-6-epimerase	Unknown	5/15
YBJP_ECOLI	Previously hypothetical protein	Unknown	5/5
OSME_ECOLI	Osmotically induced protein	Unknown lipoprotein	3/3

Tabulka 6 – Seznam identifikovaných proteinů v sarkosin-nerozpustné frakci kmene *Helicobacter pylori*

Název	TIGR lokus	M _r [kDa]	pI	Množství nalezených peptidů
Hypothetical protein	HP0205	94	8,4	7
OMP (Omp2) ^b	HP0025	77	9,2	17
OMP (Omp19)	HP0896	75	8	5
Phosphoglycerate dehydrogen. (SerA)	HP0397	70	6,5	4
Phosphoglycerate dehydrogen. (SerA)	HP0397	70	6,6	5
Phosphoglycerate dehydrogen. (SerA)	HP0397	70	6,7	4
OMP (Omp27)	HP1177	69	9	11
OMP (Omp27)	HP1177	69	9,1	4
OMP (Omp27)	HP1177	69	9,2	7
OMP (Omp27)	HP1177	69	9,3	5
OMP (Omp27)	HP1177	69	9,3	6
OMP (Omp25)	HP1177	66	9	5
Urease beta subunit (UreB)	HP0072	61	5,6	10
Catalase	HP0875	59	8,3	14
Catalase	HP0875	59	8,4	12
Catalase	HP0875	59	8,5	12
Catalase	HP0875	59	8,6	14
Catalase	HP0875	59	8,7	6
OMP (Omp20)	HP0912	55	9	8
OMP (Omp20)	HP0912	55	9,1	9
OMP (Omp20)	HP0912	55	9,2	7
OMP (Omp6)	HP0229	55	9,5	4
OMP (Omp21)	HP0913	50	8	5
OMP (Omp21)	HP0913	50	8,4	5
OMP (Omp21)	HP0913	50	8,5	4
OMP (Omp21)	HP0913	50	9	6
OMP (Omp21)	HP0913	50	9,2	6
Hypothetical protein	HP1349	44	8,3	4
Hypothetical protein	HP1349	44	8,3	4
OMP (Omp32)	HP1501	42	9,5	9
OMP (Omp32)	HP1501	42	9,5	6
Hypothetical protein	HP0052	39	9	6
Iron(III) ABC transporter,periplasmic iron-binding protein (CeueE)	HP1561	37	9,4	4
Iron(III) ABC transporter, periplasmic iron-binding protein (CeueE)	HP1561	37	9,4	4
Glutamin ABC transporter, periplasmic glutamine-binding protein	HP1172	31	6,2	4
OMP (Omp24)	HP1113	31	9,2	4
OMP (Omp4)	HP0127	31	9,5	5
OMP (Omp4)	HP0127	31	9,6	5
Amino acid ABC transporter, periplasmic binding protein (Yckk)	HP0940	30	9,3	5
Amino acid ABC transporter, periplasmicbinding protein (Yckk)	HP0940	30	9,4	4
Putative neuraminyllactose-binding hemagglutinin homolog (HpaA)	HP0410	29	7,8	5
OMP (Omp10)	HP0324	29	7,8	5
OMP (Omp15)	HP0706	29	9,1	8
OMP (Omp15)	HP0706	29	9,2	5
OMP (Omp15)	HP0706	29	9,3	8
Urease alpha subunit (UreA)	HP0073	28,5	8,3	10
Urease alpha subunit (UreA)	HP0073	28,5	8,5	6
OMP (Omp14)	HP0671	27	9,2	8
OMP (Omp31)	HP1469	26	9,4	8

OMP (Omp31)	HP1469	26	9,5	9
Conserved hypothetical secreted protein	HP0139	25,5	6,6	4
Flagellar basal-body L-ring protein (FlgH)	HP0325	25	8,5	4
Alkyl hydroperoxide reductase (TsaA)	HP1563	24,5	6,2	8
OMP (Omp23)	HP1107	22	9,1	4
Membrane fusion protein (MtrC)	HP0606	21	9,2	4
Glutamine synthetase (GlnA)	HP0512	20	9,3	4
Hypothetical protein	HP1173	20	8,5	8
Hypothetical protein	HP1173	20	9,2	4
Hypothetical protein	HP1173	20	9,3	5
(3R)-Hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein) dehydratase (FabZ)	HP1376	18	6,6	4
OMP (Omp11)	HP0472	17	9,2	6
Neutrophil-activating protein (NapA)	HP0243	16	5,5	6

Tabulka 7 – Imunoreaktivní proteiny v sarkosin-nerozpustné frakci kmene *Helicobacter pylori*

Název	TIGR locus	Mr [kDa]	pI
Catalase	HP0875	58,630	8,7
OMP (Omp20)	HP0912	55,932	9,1
OMP (Omp20)	HP0912	55,932	9,1
OMP (Omp21)	HP0913	57,063	9,2
OMP (Omp21)	HP0913	57,063	9,2
OMP (Omp21)	HP0913	57,063	9,2
OMP (Omp21)	HP0913	57,063	9,2
Putative neuraminylactose-binding hemagglutinin homolog (HpaA)	HP0410	28,349	7,9
Urease alpha subunit (UreA)	HP0073	26,540	8,5
OMP (Omp14)	HP0671	30,347	9,2
Hypothetical protein	HP1173	20,586	8,9
Hypothetical protein	HP1173	20,586	8,9
(3R)-Hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein) dehydratase (FabZ)	HP1376	18,196	6,6
OMP (Omp11)	HP0472	20,925	9,2

Tabulka 8 – Povrchové proteiny kmene *Streptococcus pyogenes*

Název	Protein	Mr [Da]
Proteiny s motivem pro kotvení v buněčné stěně		
Hypothetical protein	SPy0128	37,188
Hypothetical protein	SPy0130	24,204
Putative surface exclusion protein	SPy0269	94,697
Putative cell envelope proteinase	SPy0416	181,288
Conserved hypothetical protein	SPy0747	99,837
Hypothetical protein	SPy0843	111,504
Putative secreted 5' nucleotidase	SPy0872	73,214
Protein GRAB	SPy1357	22,836
Putative pullulanase	SPy1972	128,866
Collagen-like surface protein	SPy1983	36,2560
Hypothetical protein (fibronectin-binding protein)	SPy2009	40,352
C5a peptidase precursor	SPy2010	129,487
M protein type 1	SPy2018	54,221
Collagen-binding protein		85,143
Lipoproteiny		
Putative ABC transporter	SPy0163	36,212
Hypothetical protein	SPy0210	47,096

Conversed hypothetical protein	SPy0317	30,623
Metal-binding protein of ABC trasnporter	SPy0453	34,358
Putative cyclophilin-type protein	SPy0457	29,342
Conserved hypothetical protein	SPy1094	36,523
Putative amino acid ABC transporter, periplasmic amino acid-binding protein	SPy1274	31,712
Putative maltose/maltodextrin-binding protein	SPy1294	44,585
Putative protease maturation protein	SPy1390	38,535
Putative acid phosphatase	SPy1882	32,575
Conserved hypothetical, stative protease maturation protein	SPy2073	34,349
Putative oligopeptide permease		72,103
Sekterované proteiny		
Putative Secreted protein	SPy0019	41,900
Streptolysin O precursor	SPy0167	63,639
Penicillin-binding protein (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase)	SPy0292	45,766
Putative 42-kDa protein	SPy0469	41,084
Putative adhesion protein	SPy0714	58,520
Conserved hypothetical protein	SPy1037	34,628
Putative trascription regulator	SPy1733	45,810
Cysteine proteinase, SpeB	SPy2039	43,130
Putative dipeptidase	SPy2066	55,499
Membránově asociované proteiny		
Putative cell division protein	SPy0010	14,900
Putative acyltransferase	SPy0041	66,658
Putative penicillin-binding protein 1b	SPy0097	84,498
Putative signal peptidase I	SPy0127	14,891
Putative triosephosphate isomerase	SPy0613	26,618
Hypotetical protein	SPy0818	48,538
Conversed hypothetical protein	SPy0836	45,439
Hypothetical protein (sortase)	SPy1153	27,757
Hypothetical protein	SPy1315	78,464
Putative deacetylase	SPy1370	48,291
Putative ornithine transcarbamylase	SPy1544	37,931
Putative penicillin-binding protein 1A	SPy1649	80,207
Hypothetical protein	SPy1686	16,850
Hypothetical protein	SPy1697	25,851
Hypothetical protein sparing similarity with several eukaryotic proteins	SPy1798	142,704
Conserved hypothetical protein	SPy1892	34,845
Putative propyl-tRNA synthetase	SPy1962	68,703
Hypothetical protein	SPy2006	92,649
Putative ATP-binding cassette transporter-like protein	SPy2032	46,608
Hypothetical protein	SPy2033	14,569
Hypothetical protein	SPy2065	64,062
Putative serine protease, DegP	SPy2216	42,760
Cytoplasmatické proteiny		
Putative GAPDH	Spy0274	35,943
Putative translation elongation factor Tu	SPy0611	43,855
50S ribosomal protein L7/L12	Spy1073	12,256
Putative enolase	Spy0731	47,356
Conserved hypothetical protein	Spy1262	19,944
Putative pyruvate kinase	Spy1282	54,535
Putative NASP-dependent GAPDH	Spy1371	50,369
Putative phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase systém enzyme	Spy1372	63,136
Streptococcal antitumor protein	Spy1547	46,297

Mannose-specific phosphotransferase system component IIAB	Spy1738	35,568
Phosphoglycerate kinase	Spy1881	42,130
Putative fruktose-biphosphate aldolase	SPy1889	31,208
Transcription regulátor; trigger factor, RopA	Spy1896	47,119
Heat shock protein	Spy2070	57,096
Heat shock protein	Spy2072	10,332
50S ribosomal protein L5	Spy0063	19,815
30S ribosomal protein S8	Spy0065	14,802
50S ribosomal protein L11	Spy0460	14,801
Putative ribosomal protein S1-like DNA-binding protein	Spy0913	43,850
Putative histone-like DNA-binding protein	Spy1489	9,647
Putative pyruvate formate-lyase	Spy1849	87,528
Bakteriofágově asociovaný protein		
Putative major head protein; bacteriophage associated	Spy0688	29,190