

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta
Katedra biologie

Charakterizace O-glykosylace Gram-negativní bakterie
Francisella tularensis* pomocí *in vitro
oligosacharyltransferázové reakce

Diplomová práce

Autor: Bc. Veronika Vlasáková

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Balonová, PhD.

Hradec Králové

Květen 2015

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor: **Bc. Veronika Vlasáková**

Studijní program: N1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Název závěrečné práce: Charakterizace O-glykosylace Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis* pomocí *in vitro* oligosacharyltransferázové reakce

Název závěrečné práce AJ: Characterization of O-glycosylation in the Gram-negative bacterium *Francisella tularensis* by means of an *in vitro* oligosaccharyltransferase reaction

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Glykosylace je jednou z nejčastějších post-translačních modifikací proteinů, o níž je známo, že se nepřímo podílí na virulenci některých patogenních bakterií. Funkční glykosylační aparát byl nedávno objeven u Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis*. V současné době jsou známy tři glykosylované proteiny této bakterie, které jsou důležité pro její virulenci. Cílem této diplomové práce je provést *in vitro* glykosylaci fluorescenčně značeného syntetického peptidu obsahujícího glykosylační místo a ověřit využitelnost této metody pro následné studium O-glykosylační dráhy *Francisella tularensis*.

Garantující pracoviště: Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Balonová, PhD.

Oponent: npor. Mgr. Klára Kubelková, Ph.D.

Datum zadání práce:

Datum odevzdání práce:

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací na téma Charakterizace O-glykosylace Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis* pomocí *in vitro* oligosacharyltransferázové reakce vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne:

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat paní Mgr. Lucii Balonové, PhD. za odborné vedení při zpracování této diplomové práce, za všechny její věnovaný čas a poskytnuté informace. Dále pak panu doc. RNDr. Františku Malířovi, PhD. za umožnění práce na výzkumu na jiné katedře a fakultě.

Anotace

Glykosylace je jednou z nejčastějších post-translačních modifikací proteinů, o níž je známo, že se nepřímo podílí na virulenci některých patogenních bakterií. Funkční glykosylační aparát byl nedávno objeven u Gram-negativní bakterie *Francisella tularensis*. V současné době jsou známy tři glykosylované proteiny této bakterie, které jsou důležité pro její virulenci. Cílem této diplomové práce je provést *in vitro* glykosylaci fluorescenčně značeného syntetického peptidu obsahujícího glykosylační místo a ověřit využitelnost této metody pro následné studium O-glykosylační dráhy *Francisella tularensis*.

Klíčová slova:

Francisella tularensis, bakterie, *in vitro* glykosylace, glykoprotein, syntetický peptid

Annotation

Glycosylation is one of the most frequent post-translational modifications of proteins, which is known to indirectly participate in the virulence of some pathogenic bacteria. A functional glycosylation apparatus has recently been discovered in a Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. Three glycosylated proteins are currently known in this bacterium, which are important for the microbe's virulence. The aim of the diploma thesis is to employ an *in vitro* glycosylation of a fluorescently labeled synthetic peptide, which contains a glycosylation site and to verify the applicability of the method for the subsequent study of the O-glycosylation pathway of *Francisella tularensis*.

Key words:

Francisella tularensis, bacterium, *in vitro* glycosylation, glycoprotein, synthetic peptide

OBSAH

ÚVOD	10
1 TEORETICKÁ ČÁST	11
1.1 <i>Francisella tularensis</i> a tularemie	11
1.1.1 Charakteristika bakterie <i>Francisella tularensis</i>	11
1.1.2 <i>Francisella tularensis</i> jako intracelulární patogen	14
1.1.3 Tularemie	16
1.1.4 <i>Francisella tularensis</i> jako biologická zbraň	19
1.1.5 Vakcíny proti tularemii	20
1.1.6 Faktory virulence	22
1.2 Glykosylace proteinů	25
1.2.1 Glykosylace proteinů u Gram-negativních bakterií	26
1.2.2 Příklady glykosylací u Gram-negativních bakterií	28
1.3 Glykosylace a <i>Francisella tularensis</i>	31
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
2.1 Materiál	32
2.1.1 Chemický materiál	32
2.1.2 Biologický materiál	35
2.2 Přístroje	36
2.3 Metody	37
2.3.1 Příprava tuhých McLeod pūd	37
2.3.2 Příprava kompletního Chamberainova média	37
2.3.3 Stanovení kinetiky růstu	39
2.3.4 Kultivace bakterie <i>F. tularensis</i>	39
2.3.5 Příprava proteinové membránové frakce <i>F. tularensis</i>	40
2.3.6 Extrakce oligosacharidů vázaných na lipidy	41
2.3.7 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA	42
2.3.8 Mini 1D SDS-PAGE	43
2.3.9 Western blot a imunodetekce	45
2.3.10 In vitro oligosacharyltransferázová reakce	47
2.3.11 Extrakce na pevné fázi C18	48
2.3.12 Ionově výměnná chromatografie	49
2.3.13 Mini 1D Tricin-SDS-PAGE	49
2.3.14 Modření gelu podle Jungbluta	52
2.3.15 Stříbření gelů EMBL	52
3 VÝSLEDKY A DISKUZE	54
3.1 Příprava bakteriální OST	55
3.1.1 Výběr kmenů vhodných jako zdroj OST pro <i>in vitro</i> glykosylaci	55
3.1.2 Stanovení kinetiky růstu mutantních kmenů	56
3.2 Ověření glykosylační aktivity mutantních kmenů	59
3.2.1 Ověření glykosylační aktivity kmene FSC200 $\Delta dsbA$	59
3.2.2 Ověření glykosylační aktivity kmene FSC200 $\Delta pilA$	62

3.3 Akceptorová molekula – fluorescenčně značený peptid.....	64
3.4 <i>In vitro</i> glykosylace peptidu	66
3.4.1 <i>In vitro</i> glykosylace bez přídavku LLO.....	67
3.4.2 <i>In vitro</i> glykosylace s přídavkem LLO.....	75
3.4.3 Ověření vzniku glykosylovaného peptidu	81
3.4.4 Testování inkubační doby	84
ZÁVĚR	86
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	88
SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	98

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ab	Protilátka
ACN	Acetonitril
AK	Aminokyselina
APS	Peroxodisíran amonný
Bac	Bacillosamin
CBB G-250	Coomassie Brilliant Blue G-250
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
DADTH	2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexóza
dd. voda	Deionizovaná voda
DDM	<i>n</i> -dodecyl- β - D-maltopyranosid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ER	Endoplazmatické retikulum
FA	Kyselina mravenčí
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
FPI	Ostrov patogenity bakterie <i>Francisella tularensis</i>
Fuc	Fukóza
FucNAc	N-acetylfukozamin
GA	Golgiho aparát
Gal	Galaktóza
GalNAc	N-acetylgalaktozamin
GIT	Gastrointestinální trakt
Glc	Glukóza
GlcNAc	N-acetylglukozamin
GTF	Glykosyltransferáza
HSA	Hovězí sérový albumin
Ch. médium	Chamberlainovo médium
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulin
IL	Interleukin
LLO	Oligosacharidy vázané na lipidy
LPS	Lipopolysacharid
LT	Laboratorní teplota

LVS	Živý vakcinační kmen
Man	Manóza
NeuAc	N-acetylneuraminová kyselina
O.D.	Optická denzita
ORF	Otevřený čtecí rámec
OST	Oligosacharyltransferáza
PAGE	Polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PTM	Post-translační modifikace
PP	Undekaprenyl pyroforforečnan
RNA	Ribonukleová kyselina
RTG film	Rentgenový film
SDS	Dodecylsulfát sodný
TAMRA	Karboxytetrametylrodamin
TEMED	N,N,N,N –tetramethylendiamin
TFA	Trifluoroctová kyselina
Tfp	Pily typu IV
TNF	Faktor nádorové nekrózy
TX-100	Triton X-100
UMP	Uridin monofosfát
USA	Spojené státy americké
WB	Western blot
WHO	Světová zdravotnická organizace
Xyl	Xylóza
β-ME	β-merkaproetanol

ÚVOD

Francisella tularensis je Gram-negativní intracelulární bakterie, která se vyskytuje v několika druzích a poddruzích a každý se liší svojí virulencí. Způsobuje závažné onemocnění zvané tularemie, neboli zaječí nemoc. Proti tomuto onemocnění v současné době není vyvinuta žádná schválená vakcína a probíhá tak soustavný výzkum tohoto patogenu.

U zmíněné bakterie byl objeven glykosylační aparát, tudíž zde dochází ke glykosylaci. Je to jedna z nejčastějších post-translačních modifikací proteinů, v níž jsou enzymaticky připojovány glykany na proteiny za vzniku glykoproteinu. V současnosti jsou známy tři glykosylované proteiny, a to DsbA, PilA a hypotetický membránový lipoprotein kódovaný genem *FTH0069*. Jelikož jsou všechny tyto glykoproteiny zcela nezbytné pro patogenitu této bakterie, spekuluje se o možné účasti jejich glykanové složky post-translační modifikace ve virulenci bakterie.

Předmětem této diplomové práce je využití metody *in vitro* oligosacharyltransferázové reakce, v níž je stěžejní enzym oligosacharyltransferáza, který katalyzuje právě přenos glykanu na cílový protein nebo peptid. Tato metoda byla využita již při studiu glykosylačních drah jiných Gram-negativních bakterií. Hlavním cílem je tedy ověřit, zda se tato metoda dá aplikovat i pro studium glykosylace u bakterie *Francisella tularensis*. Při kladném zjištění by pak bylo možno určit funkci konkrétních genů hypotetické glykosylační dráhy na základě využití nedávno zkonstruovaných mutantních kmenů odvozených od virulentního kmene FSC200 bakterie *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, které mají tyto geny inaktivovány.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 *Francisella tularensis* a tularemie

Francisella tularensis (*F. tularensis*) je původce zoonotického onemocnění lidí a zvířat zvaného tularemie. Onemocnění se přezdívá jako zajetí nemoc, jelikož přirozeným rezervoárem jsou hlavně zajícovci a hlodavci. Tularemie se však týká i dalších zvířat, mezi něž patří domácí zvířata, suchozemští a vodní savci, ale i ryby, obojživelníci a ptáci. Přenos z člověka na člověka nebyl nikdy prokázán, teoreticky však není vyloučen (Huntley, Conley, Hagman, Norgard, 2007; Larsen, Pogliano, 2011; lekarske.slovníky.cz).

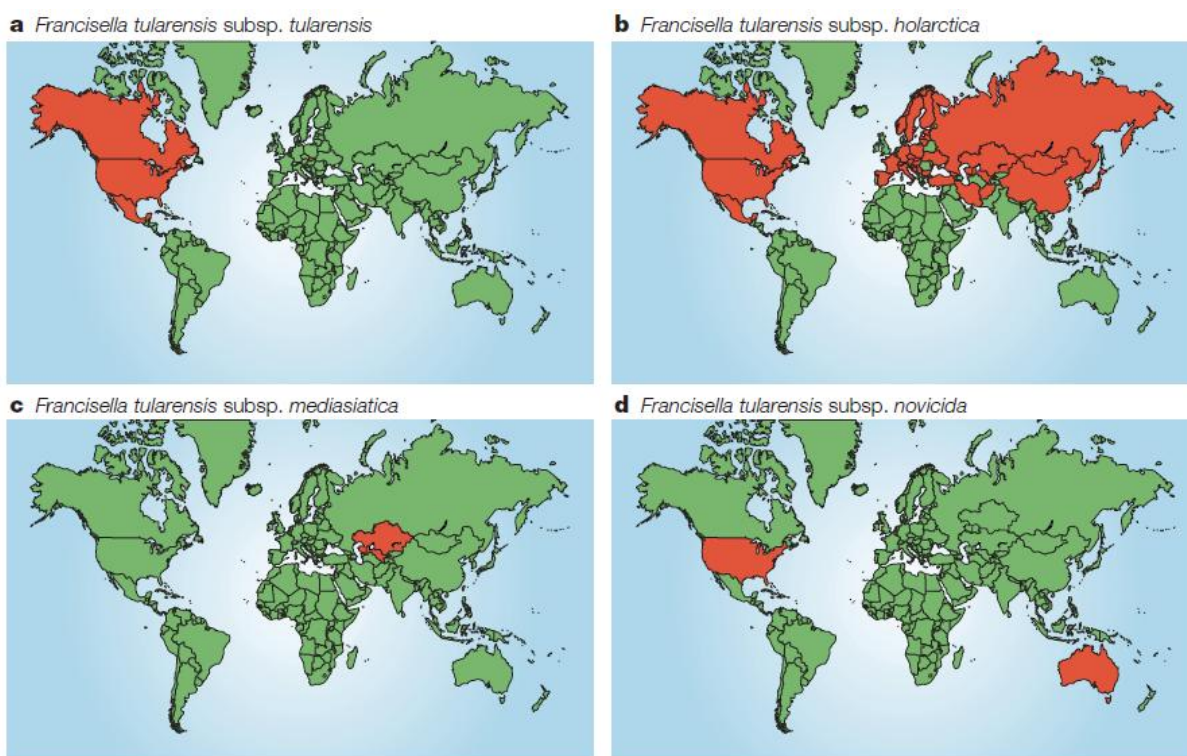
1.1.1 Charakteristika bakterie *Francisella tularensis*

1.1.1.1 Taxonomie

F. tularensis je prokaryotický organismus a podle systematického zařazení patří do domény *Bacteria*, kmene *Proteobacteria*, třídy *Gamaproteobacteria* a řádu *Thiotrichales*. Dříve byla řazená mezi rody *Pasteurella* a *Brucella* do čeledi *Brucellaceae*. V roce 1947 byla však na základě biochemických testů přeřazena do samostatné čeledi *Francisellaceae* (Kvasil, 1985; Larsen, Pogliano, 2011; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

V současnosti existuje šest druhů bakterie rodu *Francisella*, a to *Francisella tularensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella piscidida*, *Francisella noatunensis*, *Francisella hispaniensis* a *Francisella guangzhouensis*. Řazena sem byla i *Francisella novicida*, která byla však překlasifikována, jako poddruh *Francisella tularensis*. *F. tularensis* má tak čtyři různé poddruhy. Typ A, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, typ B, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, dále *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* a *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* pochází ze Severní Ameriky a je spjata s letálním onemocněním člověka, je tedy nejvíce virulentní. *F. tularensis* subsp. *holarctica* má kořeny v Evropě. Je méně virulentní, ale onemocnění člověka způsobuje také. Poddruhy *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*, pocházející z centrální Asie a *F. tularensis* subsp. *novicida*, virulentní téměř nejsou. Způsobují infekci pouze u jedinců s oslabenou imunitou (Gürcan, 2014; Huntley, Conley, Hagman, Norgard, 2007; Larsen, Pogliano, 2011; Oyston, 2008; Steiner, Furuya, Metzger, 2014).

V České republice se tedy vyskytuje *F. tularensis* subsp. *holarctica*. K první prokázané epidemii tularemie na území našeho státu došlo na podzim roku 1936 na jižní Moravě v okolí Břeclavi a Valtic. Aktivní přírodní ohniska jsou zejména na jižní Moravě a v Polabí. Epidemie se u nás vyskytují nejčastěji na podzim v souvislosti s loveckou sezónou a hospodářskými pracemi. Letní epidemie podmíněné zvýšením počtu klíšťat, která přenášejí tularemii (u nás převážně *Dermacentor reticulatus*), se na našem území na rozdíl od USA i některých evropských států zatím neobjevily (Beneš, 2009).



Obrázek 1: Mapa celosvětového výskytu čtyř hlavních poddruhů rodu *Francisella* (Převzato z: Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

1.1.1.2 Morfologie

Tak jako všechny bakterie i *F. tularensis* nemá pravé jádro, ale nukleoid – kruhovou DNA (chromozom), který není ohraničen jadernou membránou. V cytoplazmě se nachází i extrachromozomální DNA ve formě plazmidů. V genomu *F. tularensis* je 32,16% guaninu a cytosinu a obsahuje 52 RNA genů, z nichž jich je 79% funkčních. Genom byl sekvenován u typu A i B, ale byly zjištěny rozdíly v genomovém přeskupení. U typu A se přeskupení našla, zatímco u typu B nikoliv. Toto pravděpodobně zapříčiňuje rozdílnou virulenci mezi oběma poddruhy (Buchta, Jílek, Horáček, Horák, 1998; Larsen, Pogliano, 2011; Larsson, Oyston, Chain, 2005; Pechous, McCarthy, Zahrt, 2009; Petrosino, Xiang, Karpathy, 2006).

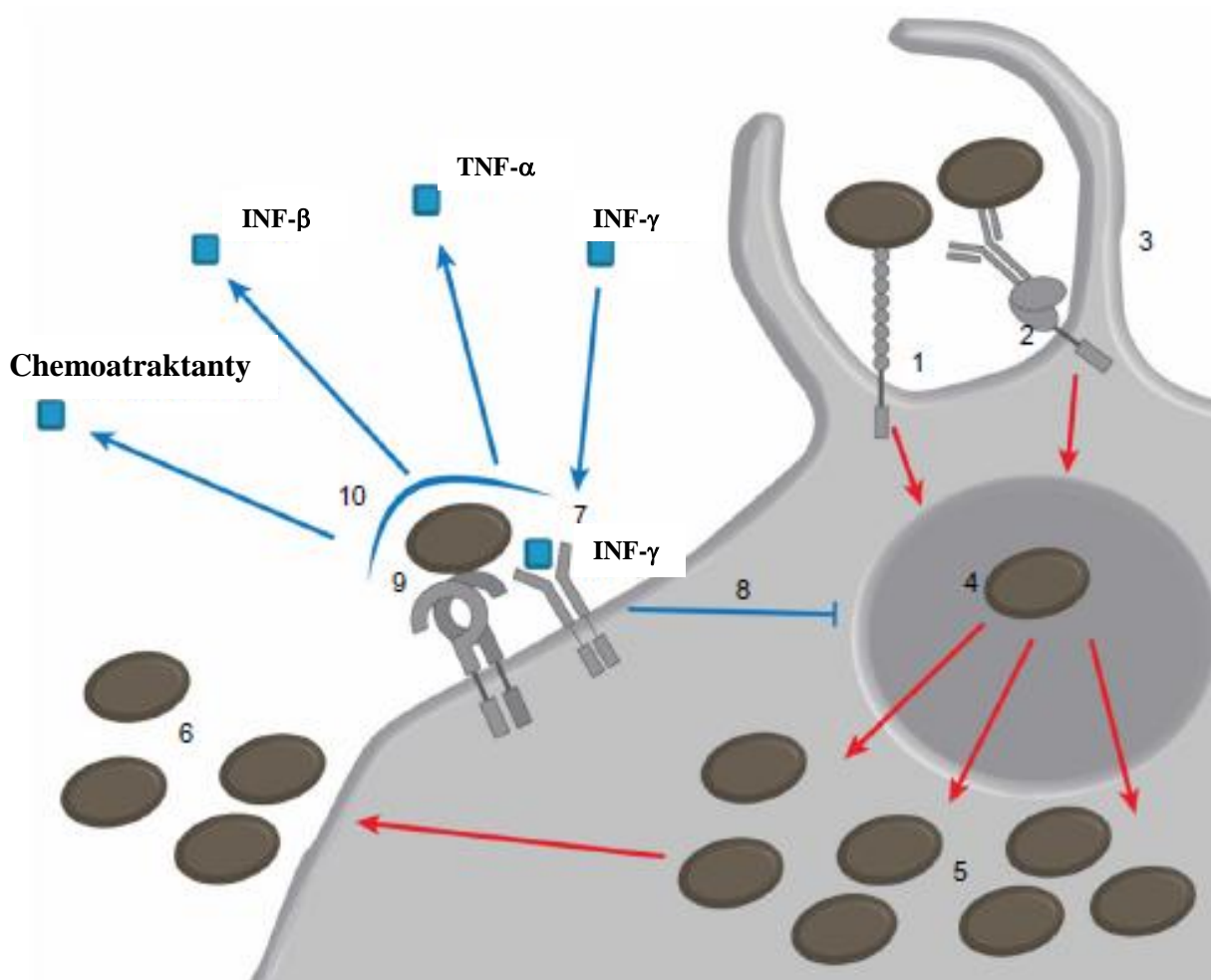
Bakterii *F. tularensis* chybí většina buněčných organel jako mitochondrie, plastidy, vakuoly, Golgiho aparát (GA), endoplazmatické retikulum (ER), cytoskelet, s výjimkou ribozomů, kde probíhá proteosyntéza. Plazmatická membrána je semipermeabilní a úzce svázána s energetickým metabolizmem. Buněčná stěna má vnější a vnitřní část a je složena z peptidoglykanu (mureinu), polymeru tvořeného střídajícími se jednotkami N-acetylglukosaminu a N-acetylmurámové kyseliny, spojenými tetrapeptidovými řetězci (Buchta, Jílek, Horáček, Horák, 1998).

Jednotlivé bakterie *F. tularensis* mají homogenní tvar a velikost. Jsou pokryty kapsulovým obalem, který je u virulentnějších kmenů silnější (0,12 – 0,35 μm) a u méně virulentních kmenů tenčí (0,06 – 0,12 μm). Bakterie *F. tularensis* se vyskytují v jediném antigenním typu. Jsou částečně antigenně příbuzné s brucelami a s *Yersinia pestis*. Ve vnější buněčné membráně se nachází lipopolysacharid (LPS), neboli endotoxin, který je 1000 krát méně účinný, než LPS u střevních bakterií. Působením na makrofágy a endoteliální buňky LPS aktivuje signální kaskádu, která vede k uvolňování protizánětlivých cytokinů. Pomáhají bakterii odolávat antibiotikům a dalším okolním stresům. Antigen LPS *F. tularensis* subsp. *tularensis* a *F. tularensis* subsp. *holarctica* je totožný, zatímco antigen *F. tularensis* subsp. *novicida* se liší. Kmeny, které jsou virulentní, mají povrchový antigenní komplex, označovaná jako faktor Vi. Bakterie mají i své imunogenní proteiny. Byly identifikovány různé imunogenní proteiny u různých kmenů *F. tularensis*. Patří mezi ně například lipoproteiny kódované geny *FTT1103* a *FTT1676* (Bednář a kol., 1996; Gerasimov, Dolotov, Stepanov, Urakov, 1997; Janovská, Pávková, Hubálek, 2007; Janovská et al., 2007; Larsen, Pogliano, 2011; McLendon, Apicella, Allen, 2006; Raetz, Whitfield, 2002).

Některé bakterie jsou schopné produkovat na vnější membráně výrůstky, zvané pily neboli pilusy. *F. tularensis* má na svém povrchu tzv. "pily typu IV" (tfp), což jsou dlouhá, tenká vlákna, používaná gram-negativními patogenními bakteriemi k adhezi na hostitelskou tkáň a k výměně DNA. Dále *F. tularensis* může tvořit tzv. siderofory, malé molekuly, které se mohou vázat na železo z anorganických a hostitelských zdrojů. Děje se tomu tak za podmínek s nedostatkem železa. Tato vlastnost je pro *Francisella* velice důležitá, protože na ní závisí její intracelulární replikace a dokonce i virulence (Egge-Jacobsen et al., 2011; Forslund et al., 2006; Gil, Benach, Thanassi, 2004; Larsen, Pogliano, 2011; Sullivan, Jeffery, Shannon, Ramakrishnan, 2006).

1.1.2 *Francisella tularensis* jako intracelulární patogen

F. tularensis napadá různé typy savčích buněk, primárně fagocytárních, ale i endoteliálních a hepatocytárních, přežívá v nich a replikuje se. Tato schopnost hraje roli v její virulenci a má velký význam. Důležitým cílem jsou právě makrofágy, které jsou významnou nikou pro bakterii. *F. tularensis* má schopnost se v makrofázích ve velkém rozmnožovat a napadat tak hostitelské tkáně a orgány. Tím narušuje jejich normální funkci a je vyvolána zánětlivá odezva, která přispívá k onemocnění. Bakterie se naváže na buněčný povrch pomocí receptorů, makrofág pak pohltí bakterii a vytvoří se fagozom, který nejprve prochází procesem zrání. Ve zralém fagozomu jsou antioxidanty, kationové antimikrobiální peptidy a lysozomální hydrolázové kyseliny, které se snaží degradovat a usmrtit pohlcenou bakterii. Bakterie se proto snaží zabránit zrání fagozomu a vydržet v tomto nepřátelském prostředí. Vydrží-li, za 15-30 minut dojde k okyselení prostředí uvnitř fagozomu a díky tomu se bakterie za 2-4 hodiny začíná dostávat ven a po 4-8 hodinách je její velká část volně v cytoplazmě, kde se může replikovat. Nakonec vyvolá apoptózu buňky, opustí ji a šíří se do dalších hostitelských částí. V cytoplazmě však mohou některé bakterie znovu vstupovat do endocytických drah a je vyvolán proces autofagie. Není jisté, zda je tento proces adaptivní strategie bakterie nebo zda je to jakási buněčná obrana proti infekci. Protože některý typ autofagozomu bakterii pravděpodobně poskytuje živiny, uhlík a energii, potřebné k její replikaci, jiný zase může inhibovat její růst a usmrcovat ji. Makrofágy mohou být i v některých případech stimulovány interferony různých typů a zabránit tak intracelulární replikaci bakterie. Pokud je bakterie v neaktivních buňkách, nemůže růst a hostitelské buňky jsou pak do 24-48 hodin zabity apoptózou zprostředkovanou prostřednictvím vnitřních drah, čímž dojde k usmrcení bakterie (Checroun, Wehrly, 2006; Chu, Cunningham, Yu et al.; 2014; McLendon, Apicella, Allen, 2006; Oyston, 2008; Santic, Al-Khodor, Kwaik, 2010; Sjöstedt, 2005; Steele et al., 2013; Steiner, Furuya, Metzger, 2014).



Obrázek 2: *F. tularensis* jako intracelulární patogen. *F. tularensis* (hnědá) se váže na buněčný povrch prostřednictvím receptorů (1, 2). Do buňky vstupuje pomocí fagocytózy (3) a přežívá tím, že brání dozrávání fagozomu (4). Poté uniká z fagozomu a replikuje se v cytoplazmě (5), nakonec vyvolává apoptózu a uniká z pryč z buňky (6). Pokud jsou ale makrofágy stimulovány interferony (7), mohou omezit intracelulární replikaci (8). Tato stimulace (9) pak může vést k sekreci zánětlivých cytokinů a chemoatraktantů (10). Vysvětlivky: IFN – interferon, TNF – faktor nádorové nekrózy (Převzato z: Steiner, Furuya, Metzger, 2014).

1.1.3 Tularemie

1.1.3.1 Historie

Poprvé byla tularemie popsána v 16. století v Norsku jako nemoc skupiny hlodavců – lumíků. Tularemie se však objevovala po celém světě, a to hlavně na severní polokouli. Roku 1800 byla zaznamenána v Japonsku a Rusku, Severní Americe a Skandinávii. Infekční agens způsobující toto onemocnění bylo izolováno v roce 1911 v Kalifornském Tulare v USA MacCoyem a Chapinen. V této době byla bakterie označována podle oblasti svého objevení jako *Bacterium tularense*. Edward Francis byl první člověk, který studoval epidemiologii této nemoci u lidí, morčat a králíků a popsal klinické příznaky u lidí. Uvedl, že mnoho lidí s odlišnými klinickými příznaky trpí stejnou chorobou, a onemocnění pojmenoval jako tularemii. Zjistil, že k přenosu dochází kontaktem s infikovaným masem králíků a hlodavců a pomocí sérologických testů přišel na to, že vektorem pro přenos jsou krev sající mouchy. Tak vznikl rod *Francisella* - byl pojmenován na počest Edwarda Francise, který významně přispěl k výzkumu tularemie. Druhé jméno, *tularensis*, bakterie získala podle názvu místa (Tulare), kde byla poprvé pozorována (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Gürcan, 2014; Tärnvik, Berglund, 2003).

1.1.3.2 Výskyt a formy

Tularemie se u některých skupin lidí vyskytuje častěji. K těmto skupinám patří lesníci, turisté, myslivci, lidé v kontaktu s masem a zvířaty, lidé žijící na venkově, zemědělci, pracovníci v laboratořích a veterináři. Zajímavé je, že ohniska nákazy lidské tularemie jsou paralelní s ohnisky výskytu zvířat, jako jsou veverky, králíci, zajáci, hraboši, ondatry, vodní krysy a další hlodavci. Na tato zvířata se onemocnění přenáší sáním infikovaného klíštěte, komára či blechy. Tito členovci tedy zastávají roli vektoru při přenosu infekce mezi savčími hostiteli. Člověk se kromě zmíněného vektoru může dále nakazit přímým kontaktem, či požitím kontaminované vody, či masa infikovaného zvířete, kontaktem s kontaminovanou půdou nebo vdechnutím aerosolové infekce. Právě tento způsob přenosu tularemie činí bakterii *F. tularensis* tak nebezpečnou (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010; Gürcan, 2014; Hightower et al., 2014; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

V závislosti na místě vstupu bakterie do těla se onemocnění vyskytuje v několika různých formách, a to ulceroglandulární, okuloglandulární, orofaryngeální, gastrointestinální, plicní a tyfoidální. Závažnost onemocnění je pak dána typem bakteriálního kmene. Po inkubační době přibližně 3-5 dnů (1-21) je nástup onemocnění často poměrně náhlý. Vyznačuje se vysokou horečkou, zimnicí, nevolností, malátností a únavou, bolestí v krku, suchým kašlem a bolestí hlavy (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004; Tärnvik, Berglund, 2003).

Ulceroglandulární forma je nejčastější (vyskytuje se u cca 80% případů). Obvykle vznikne v důsledku malého poranění při manipulaci s mrtvým zajícem nebo hlodavcem nebo pouhým dotykem. Je charakterizována drobnou hnisající ulcerací, nejčastěji na ruce. V místě napadení vzniká vřed, který je zpočátku naplněn nažloutlým výměškem a má ostré hranice, později začíná černat. V rozpětí 3-6 (1-14) dní po expozici se vyznačuje zimnicí, horečkou, bolestí hlavy a svalů a vysílením. Tato forma vzniká i při přenosu infekčního agens klíšťaty nebo bodavým hmyzem, který se dříve živil na nemocném zvířeti, přičemž lokalizace primárního komplexu je dána místem napadení (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010; Tärnvik, Berglund, 2003).

Okuloglandulární forma vzniká po zanesení mikrobů do spojivkového vaku při manipulaci s tularemickými zvířaty, při umývání kontaminovanou vodou nebo při přenosu bakterií pomocí konečků prstů. Projevuje se hnisavým zánětem spojivek, periorbitálním edémem, perforací rohovky nebo výhřezem duhovky. Bez léčby se může šířit do lymfatických uzlin (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010).

Orofaryngeální a gastrointestinální formy jsou následkem nedostatečně zpracovaného masa z tularemického zvířete nebo požití sekundárně kontaminovaného pokrmu či nápoje. Primární vřed je lokalizován tedy v ústech a v případě střevní formy na střevní sliznici v místě Payerových plaků. Léze se vyskytují na mandlích, které jsou pokryty žlutobílým povlakem, nebo na hltanu či v celém gastrointestinálním traktu (GIT). Pacienti si stěžují na bolest v krku a/nebo bolesti břicha. Problémy jsou doprovázeny otoky krčních lymfatických uzlin. Příležitostně se může objevit zvracení a průjem nebo dokonce krvácení v GIT, což způsobuje ulcerace střev a je pro pacienty fatální (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010; Tärnvik, Berglund, 2003).

Plicní forma vzniká po vdechnutí kontaminovaného prachu nebo aerosolu. Probíhá jako chřipka nebo jako pneumonie, může však připomínat až tuberkulózu. Vyvíjí se po inhalaci *F. tularensis* subsp. *tularensis* nebo *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Tento typ tularemie je typický pro pracovníky v laboratorním prostředí a pro zemědělce, kteří pracují v místech, kde se vyskytovali nakažení hlodavci. Pacienti trpí suchým kašlem, dušností, bolestmi hrudníku a komplikací může být až syndrom respirační tísně. Úmrtnost je přibližně 40% (Beneš, 2009; Ellis, Oyston, Green, Titball, 2002; Foley, Nieto, 2010).

Forma tyfoidální tularemie je sekundární formou plicní tularemie, méně často ulceroglandulární. Hlavním projevem je vysoká horečka, celková slabost a oblužení. Představuje asi 10% všech případů (Beneš, 2009; Foley, Nieto, 2010).

Mohou vznikat i kombinované formy všech výše popsaných typů, a to tehdy, když infekční agens pronikne do těla hostitele současně více cestami (Beneš, 2009).

1.1.3.3 Laboratorní diagnostika

V přírodě může *F. tularensis* přežívat až několik týdnů a to ve vodě, půdě a v tělech uhynulých zvířat. V laboratorním prostředí se jí daří nejlépe při 35-37 stupních Celsia. Je růstově neobyčejně náročná. Vyrůstá na krevním agaru s glukózou a cysteinem, který je pro ni důležitým růstovým faktorem. Vhodným prostředím je pro ni i půda z koagulovaných vaječných žloutků. Kolonie jsou zpočátku drobné a průsvitné, později se mléčně kalí a jejich konzistence je mukózní. Dalšími důležitými růstovými faktory jsou glutamin, cystein, histidin a thiamin (Bednář a kol., 1996; Larsen, Pogliano, 2011).

Rozpoznání tularemie je u zevních forem poměrně snadné již z klinického obrazu, který závisí na virulenci mikroba, odolnosti napadeného jedince a způsobu proniknutí infekce do organismu. K ověřování příčin se používá aglutinační reakce, která je průkazná na počátku 3. týdne a vrcholí ve 4. - 5. týdnu onemocnění. Lze použít i citlivější mikroaglutinaci, imunoesej (přímé testy ELISA), která rozlišuje IgA, IgG a IgM protilátky, imunofluorescenci nebo je možná zkřížená reaktivita sérologických reakcí *F. tularensis* s antigeny *Brucella* spp. a *Yersinia* spp. Důležitou metodou je PCR. Kožní testy se běžně neprovádějí, protože interpretace jejich výsledků je často problematická. Mikroskopický průkaz infekčního agens

je velmi obtížný, jelikož se *F. tularensis* špatně zobrazují v Gramově barvení (Bednář a kol., 1996; Beneš, 2009; Foley, Nieto, 2010).

Na kultivační vyšetření se zasílá materiál z primární léze, sputum, případně vzorek z uzlin. Dále je možný záchyt mikroba z krve. Izolace se pak nejlépe daří na vnímavých laboratorních hlodavcích (myš, křeček, morče). Po smrti zvířete se materiál izolovaný z lézí kultivuje na speciálních půdách z krevního agaru s glukózou a cysteinem. Vhodná je i inokulace materiálu do žloutkového vaku kuřecího embrya. Při odběru materiálu a při jeho zpracování je třeba postupovat podle zásad platných pro práci s vysoce virulentními nálezami (Bednář a kol., 1996; Beneš, 2009).

1.1.4 *Francisella tularensis* jako biologická zbraň

Francisella tularensis subsp. *tularensis* je extrémně virulentní. Je potřeba malá infekční dávka, její aerosoly se snadno šíří vzduchem a může způsobit těžké onemocnění a smrt. Inhalace méně než 10 jednotek tvořících kolonie stačí k nákaze člověka. 30% – 60% neléčených případů může být fatální. Infekčnost *F. tularensis* je srovnatelná s vysokou infekčností bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, původcem plicní tuberkulózy. Americké Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) klasifikovalo *F. tularensis* na seznamu potenciální bioteroristické hrozby, jako zástupce kategorie A, právě kvůli její vysoké nebezpečnosti. Proto také byla tato bakterie zkoumána a používána za druhé světové války a ještě dvě desetiletí poté jako potenciální biologická zbraň. Tento výzkum provádělo na bakterii Japonsko, později bývalý Sovětský svaz a Spojené státy (Darling et al., 2002; Dennis et al., 2001; Larsen, Pogliano, 2011; Larsson, Oyston, Chain et al., 2005; McLendon, Apicella, Allen, 2006; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

V letech 1932-1945 byla *F. tularensis* subsp. *tularensis* použita Japonskými válečnými výzkumnými jednotkami proti čínským civilistům, ruskému vojsku a proti americkým válečným zajatcům. Kromě toho se tularemie vyskytovala mezi tisíci ruských a německých vojáků při obléhání Stalingradu a to bylo možná výsledkem úmyslného zneužití Sověty. Příčina epidemie vzniklá v přírodních podmínkách nebyla odstraněna a tak mohli vojenští pracovníci chytit tularemii i od myši a krys, jejichž počet prudce vzrůstal kvůli rozsáhlému narušení kanalizace a špatné hygieně během bitvy. Během Studené války Sovětský svaz i

Spojené státy připravovali a skladovali tuny infekčních agens pro možné využití proti civilnímu obyvatelstvu svých nepřátel (McLendon, Apicella, Allen, 2006; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

V roce 1969 odborná komise ze Světové zdravotnické organizace (WHO) odhadla, že by rozptýlení aerosolu virulentní bakterie *F. tularensis* o hmotnosti 50 kg nad metropolitní oblastí s pěti miliony obyvatel mělo za následek 250 000 obětí vyžadujících rozsáhlou lékařskou péči a 19 000 úmrtí. Proto Spojené státy následně v roce 1972 podepsaly Úmluvu o zákazu vývoje, výroby a hromadění zásob bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o jejich zničení (Dennis et al., 2001; Larsen, Pogliano, 2011; McLendon, Apicella, Allen, 2006; Oyston, Sjostedt, Titball, 2004).

1.1.5 Vakcíny proti tularemii

F. tularensis je intracelulární patogen a je tedy zřejmé, že v ochraně před tímto infekčním agens bude zapotřebí buněčná odpověď. Nicméně bylo prokázáno, že po prodělané infekci rovněž dochází k tvorbě protilátek, a tudíž k imunospecifické ochraně proti opětovné infekci. Tyto protilátky mohou chránit proti méně virulentním kmenům. Proti vysoce virulentním kmenům je však důležitá reakce paměťových T-buněk. Připravená vakcína by tak měla vyvolávat jak humorální, tak buňkami zprostředkovanou imunitu. V roce 1946 byl v bývalém Sovětském svazu vyvinut a použit jako očkovací vakcína tzv. živý vakcinační kmen LVS. Užití LVS jako vakcíny však stále zůstává v běžné populaci neoprávněné, a to z několika důvodů. Vakcína jen částečně chrání proti nejvíce virulentnímu kmeni typu A a také molekulární mechanismus účinku vakcíny není znám. Je zde také riziko propuknutí onemocnění u jedinců s oslabenou imunitou, poněvadž se jedná o živý, byť oslabený, bakteriální kmen. Proto je zde snaha o vývoj vakcíny, jakožto nebuněčné podjednotky či celé usmrcené buňky, kde toto riziko odpadá (Barry, Cole, Santiago, 2009; Mann, Ark, 2009; Oyston, 2009; Pascalis, Chou, Ryden et al., 2014).

Nebuněčné podjednotkové vakcíny jsou vakcíny bez buněk, které se připravují ze syntetických nebo purifikovaných složek mikroorganismů. Jejich hlavní výhodou je, že nejsou infekční. U infikovaných jedinců či jedinců imunizovaných živým oslabeným kmenem dochází do dvou týdnů od přenosu infekce k rozvoji silné imunitní odpovědi, která je v první

řadě mířená proti LPS. Proto je LPS zkoumán jako potenciální kandidát k výrobě podjednotkové vakcíny. Imunizace purifikovaným LPS vede především k rozvoji humorální, ale do jisté míry i buněčné B-lymfocytární imunitní odpovědi. Myši imunizované LPS, který byl izolován z kmene LVS, jsou chráněny proti následné infekci divokým kmenem LVS. Polysacharidová část LPS, tzv. O-antigen, je sice silně imunogenní, ale dokáže navodit pouze krátkodobou imunitní odpověď nezávislou na T-buňkách. Některé studie se proto zabývají vývojem konjugované podjednotkové vakcíny, kde je O-antigen konjugován s proteinovým nosičem, který je schopen navodit na T-buňkách závislou, a tudíž dlouhodobou imunitní odpověď (Barry, Cole, Santiago, 2009; Cole et al., 2009; Conlan, Shen, Webb, Perry, 2002; Cuccui, 2013; Fulop, Manchee, Titball, 1995; Fulop, Mastroeni, Green, Titball, 2001; Prior et al., 2003; Weintraub, 2003).

Vakcíny z celých usmrcených buněk jsou biologické komplexy a jsou neinfekční. Přípravují se z infekčních agens, které jsou schopny vyvolat ochrannou imunitní odpověď. Lee Foshay v roce 1950 vyvinul takovouto vakcínu fenolizací nebo acetonovou extrakcí. Imunizaci pak zkoušel na primátech a dalších zvířatech, ale prokázaly se nežádoucí účinky (Barry, Cole, Santiago, 2009; Foshay, 1950; Mann, Ark, 2009).

Živé oslabené vakcíny jsou obecně definovány jako vakcíny z živých organismů, které mají oslabenou virulenci, ale jsou stále imunogenní. Nejvíce testovanou živou vakcínou proti tularemii je již zmíněný živý vakcinační kmen LVS. LVS byl vytvořen opakovaným pasážováním bakterie poddruhu typu B na pepton-cysteinovém agaru, což vedlo ke dvěma fenotypovým variantám kolonií odlišné barvy – šedé a modré. Modrá varianta měla schopnost vyvolat ochrannou imunitní odpověď u myši, zatímco šedá varianta byla příliš oslabená a nenavodila žádnou odolnost. Modrá varianta byla po další manipulaci zahrnující lyofilizaci a sériové pasážování označena za živý vakcinační kmen LVS. Modrá varianta však mohla během sériové výroby vakcíny dát vznik i šedé variantě, která pak možná představovala až 20% některých přípravků. LVS kmen byl testován na lidských dobrovolnících v tzv. „Operation Whitecoat“ a následně použit u laboratorních pracovníků, u nichž došlo k výslednému snížení laboratorně získané tularemické infekce. Četné studie u primátů i lidí prokázaly účinnost očkování LVS, který chrání před infekcí kmene typu B, ale jen částečně chrání proti virulentním poddruhům typu A. Primáti i lidé vykazovali specifickou imunitní odpověď, u lidí může tato odpověď přetrvávat i po mnoho let. Výzkum je proto dále zaměřen na zlepšení ochranných schopností vakcíny proti kmeni typu A, a to tvorbou plně

definovaných, stabilních, oslabených mutantních kmenů. Většina z cílených mutací byla poprvé provedena v kmeni LVS nebo na bakterii *Francisella novicida* kvůli lepší manipulaci s těmito kmeny. Testování virulence těchto mutantních kmenů in-vivo umožnilo identifikovat slíbené cílené geny pro mutaci v kmenech typu A. Geny cílené pro mutaci lze zařadit do tří skupin: metabolické enzymy, faktory virulence a regulační proteiny. (Barry, Cole, Santiago, 2009; Larsen, Pogliano, 2011; Larsson, Oyston, Chain et al., 2005; Oyston, Sjøstedt, Titball, 2004; Oyston, 2009).

1.1.6 Faktory virulence

Patogenita bakterie je způsobena faktory, které se souhrnně nazývají faktory virulence. Úlohou těchto faktorů je zabezpečit bakteriím adhezi na hostitelské buňky a průnik do těchto buněk, proliferaci v intracelulárním prostoru, únik před obrannými mechanismy imunitního systému a zabezpečit další pochody životního cyklu (Udržalová, 2009).

Jedním z faktorů virulence *F. tularensis* je LPS. LPS je hlavní složkou zevní membrány všech Gram-negativních bakterií. Je to struktura s neobvyklými biologickými a strukturními vlastnostmi a je to potenciální součást vakcín proti tularemii. LPS je glykolipid s hydrofilní i hydrofobní vrstvou a skládá se z jádrové oblasti centrálního sacharidu, lipidu A a kovalentně připojeného polysacharidového O-antigenu, určujícího antigenní strukturu bakterie. Do membrány je pak LPS ukotven pomocí lipidu A a jeho zbytek vyčnívá vně z povrchu buňky. LPS *F. tularensis* se vyznačuje nízkou toxicitou *in vitro* i *in vivo* a vytváří nízkou protizánětlivou odezvu ve srovnání s LPS jiných bakterií. Jeho schopnost indukovat tvorbu interleukinu 1 (IL-1) a faktoru nádorové nekrózy α (TNF- α) je také velice nízká. Bylo zjištěno, že poskytuje částečnou ochranu proti problémům s poddruhem *holarctica*, nikoliv však proti problémům s poddruhem *tularensis*. Bylo také objeveno, že existuje antigenní shift (zásadní změna v antigenní struktuře) LPS *F. tularensis*, který ovlivňuje účinnost imunitní reakce hostitele. Regulace délky řetězce O-antigenu je nezbytná při růstu bakterie v makrofázích a také ovlivňuje rezistenci bakterie vůči sérovému komplementu. Tyto vlastnosti se však liší u jednotlivých kmenů (Cowley, Gray, Nano, 2000; Gil, Benach, Thanassi, 2004; Sjøstedt, 2003; Udržalová, 2009).

Dalšími faktory virulence jsou bakteriální pily, u *F. tularensis* tfp. Tfp jsou složité vláknité přívěšky podílející se na interakcích hostitelských buněk. Vyskytují se nejen u bakterie *F. tularensis*, ale i u dalších patogenů, jako jsou *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Vibrio cholerae*. Mají společné strukturální, biochemické, antigenní a morfologické znaky a hrají roli v expresi mnoha fenotypů, tvorbě biofilmů, buněčné signalizaci, pohyblivosti a přilnavosti k hostitelské buňce. Pilusové vlákno se skládá z hlavní pilinové podjednotky zvané PilA. Je syntetizováno jako membránově asociovaný prepilin, který je proteolyticky štěpen prepilinovou peptidázou PilD. Dalším možnou podjednotkou pilových vláken je PilE. Pokud dojde k nějaké poruše tfp, dochází k redukci a útlumu virulence (Egge-Jacobsen et al., 2011; Forslund et al., 2006; Gil, Benach, Thanassi, 2004; Salomonsson et al., 2009).

Mezi faktory virulence se řadí i ostrov patogenity – FPI (*Francisella* Pathogenic Island). Tento ostrov obsahuje 4 velké otevřené čtecí rámce ORF (open reading frame) o 2,5 – 3,9 kb a 13 ORF o 1,5 kb a méně a patří do sekrečního systému VI. Na FPI se nachází klastr 17 genů včetně *iglABCD* a *pdpABCD*, u kterých bylo prokázáno, že se podílejí právě na virulenci bakterie. Jedná se o geny pro transportní systém a virulenční faktory. Geny *igl* (Intracellular Growth Locus) jsou důležité pro vnitrobuněčný růst a geny *pdp* (Pathogenicity Determinant Proteins) ovlivňují patogenezí. Tyto geny kódují stejnojmenné proteiny. IglA a IglB proteiny se sdružují v bakteriální cytoplazmě, podílejí se na sekreci a mají určitou homologii s proteiny *Rhizobium leguminosarum*. Protein IglC indukuje apoptózu. Zatímco *F. novicida* obsahuje pouze jednu kopii FPI, poddruhy *tularensis* a *holarctica* mají dvě kopie. To může být jedním z důvodů, proč má *F. novicida* nižší virulenci. FPI hrají důležitou roli v raných fázích biogeneze fagozomu a bakteriálním útěku do cytosolu, přičemž maximální exprese genů dosahují na konci replikace. Toto může naznačovat určitou roli genů FPI během pozdní fáze infekce nebo se může jednat o adaptivní mechanismus bakterie být připravena napadnout budoucí hostitelskou buňku (Lindgren et al., 2013; Nano et al., 2004; Oyston, 2008; Santic, Al-Khodir, Kwaik, 2010; Wehrly et al., 2009).

Roli ve virulenci *F. tularensis* hrají i proteiny mimo FPI, které mají také význam pro růst bakterie uvnitř makrofágů. Bakterie jsou oslabené a mají sníženou schopnost úniku z fagozomu. Mnoho z těchto proteinů bylo charakterizováno, ale jen několik z nich bylo zkoumáno jako potenciální kandidát na vakcínu proti tularemii. Mezi tyto proteiny se řadí např. protein kódovaný genem *FTT_1103*, který má podobnost s proteiny DsbA z rodiny

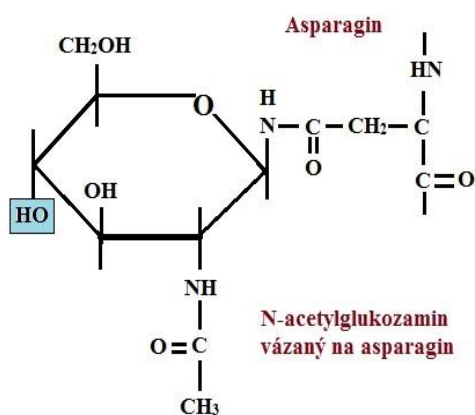
disulfidických oxidoreduktáz. Hypotetický lipoprotein *FTT_1103* byl vyizolován transpozonovou inzertní mutací z bakteriálního kmene *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4. Mutantní bakterie byly na myším modelu maximálně oslabené a myši přežily bez viditelných známek nemoci. Imunizace myši tímto kmenem poskytovala i ochranu proti infekci způsobené divokým kmenem *F. tularensis*. Výsledky tedy ukázaly, že i přes vysokou virulenci kmene typu A je možné mutací tohoto lokusu zmírnit stupeň infekčnosti bakterie a chránit tak imunitu (Oyston, 2008; Qin et al., 2009; Sjöstedt, 2003; Strašková et al., 2009).

1.2 Glykosylace proteinů

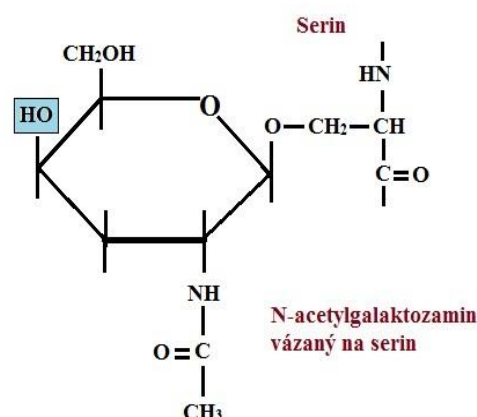
Glykosylace, enzymatické připevnění cukerných jednotek na proteiny, je posttranslační modifikace (PTM), která poskytuje větší proteomickou diverzitu než jiné PTM a je nejsložitější. Je důležitá pro široké spektrum biologických procesů, včetně připevňování buněk k extracelulární matrix a interakcí protein-ligand v buňce. Zdá se, že hraje i důležitou roli v patogenitě bakterií a v jejich hostitelské invazi. Glykosylace proteinů byla dlouhou dobu považována za děj probíhající výhradně v eukaryotních buňkách, avšak dnes je již známo, že je rozšířená i u prokaryotických domén Archea a Eubacteria. Na rozdíl od jiných buněčných procesů, jako transkripce nebo translace, je glykosylace netemplátová, a proto k ní nemusí pokaždé vůbec dojít. Buňky používají celou řadu enzymů, které přidávají nebo odebírají cukry z jedné molekuly na druhou. Enzymová aktivita jednotlivých enzymů je závislá na dokončení předchozí enzymatické reakce a liší se podle typu buněk. Jednotlivé buňky mohou syntetizovat glykoproteiny, které však mají odlišnou glykanovou strukturu (Aas et al., 2007; piercenet.com; Weerapana, Imperiali, 2006; Young et al., 2002).

Cukerné jednotky, sacharidy, jsou ve svých nejjednodušších formách brány jako primární zdroje energie a jsou tak nezbytné pro život. Sacharidy existují nejen jako jednoduché cukry, ale také jako komplexní molekulární struktury, tzv. glykany. Tyto složené cukry existují v mnoha tvarech a velikostech, od lineárních po vysoce rozvětvené molekuly. Mohou být připojeny k proteinům nebo lipidům, čímž pak vzniká glykoprotein, proteoglykan nebo glykolipid. Glykany jsou složeny z monosacharidových jednotek jako je glukóza (Glc), galaktóza (Gal), manóza (Man), N-acetylglukozamin (GlcNAc), N-acetylgalaktozamin (GalNAc), fukóza (Fuc) a N-acetylneuraminová kyselina (NeuAc, kyselina sialová), vzájemně vázaných glykosidovou vazbou. Existují dva hlavní typy glykanů podle místa jejich uchycení na bílkovinnou část. Ty, které jsou připojeny amidovou vazbou na zbytek aminokyseliny (AK) asparagin, se nazývají N-vázané glykany a ty, které jsou připojeny hydroxylovou skupinou buď na zbytek AK serin nebo treonin, se nazývají O-vázané glykany (obrázek 3). Díky těmto rozdílným typům glykosidických vazeb se odlišují tedy i typy glykosylací – N- a O-glykosylace. Glykany ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti proteinů, jako stabilitu a rozpustnost a hrají důležitou roli ve zprostředkování a modulaci adheze a signalizace buněk. Vedou jakousi buněčnou komunikaci, která je zásadní pro normální vývoj tkání a buněk. Hydrolýzou se glykany rozkládají opět na své cukerné složky (Balonová, 2011; Říman et al., 1986).

N-vázaná glykosylace



O-vázaná glykosylace

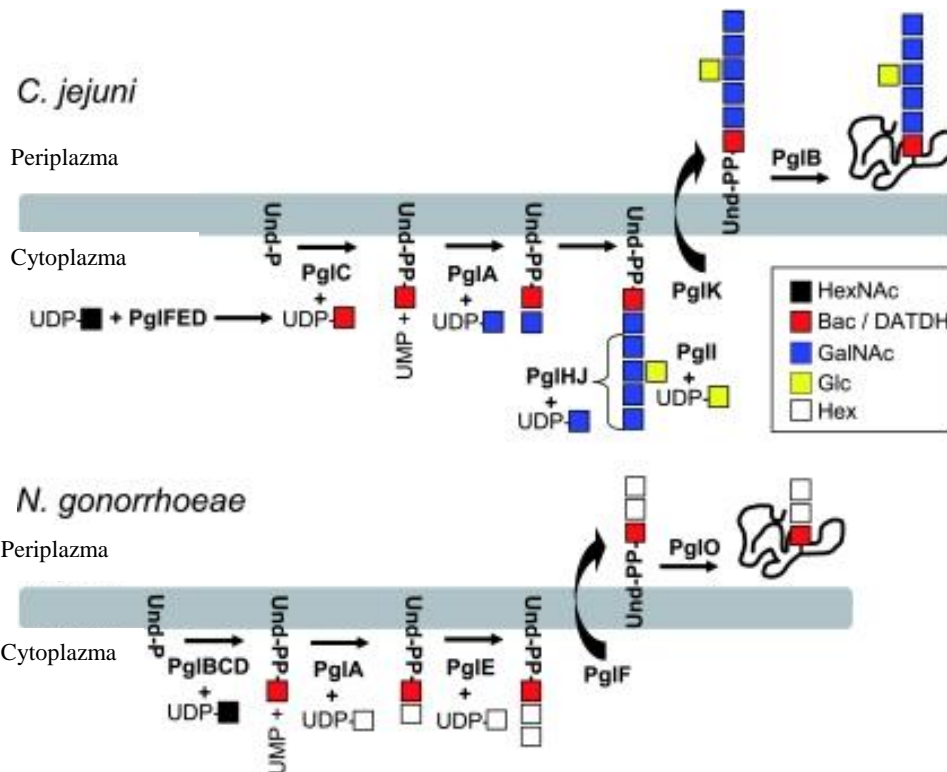


Obrázek 3: N-vázaný glykan připojený amidovou vazbou k asparaginu a O-vázaný glykan připojený hydroxylovou skupinou k serinu.

1.2.1 Glykosylace proteinů u Gram-negativních bakterií

U Gram-negativních bakterií se proces glykosylace zpravidla odehrává na cytosolické straně vnitřní membrány bakteriální buňky, kde probíhá biosyntéza glykanu, a je dokončen v periplazmatickém prostoru přenosem glykanu z lipidového nosiče na cílový protein. Lipidy tvoří základní vnější vrstvu Gram-negativních bakterií a slouží jako nosiče oligosacharidových zbytků. Jednotlivé kroky glykosylace jsou katalyzovány enzymy různé specifity, které se obecně označují zkratkou Pgl (z angl. protein glycosylation locus). Syntéza glykanu je zahájena připojením monosacharidové jednotky na lipidový nosič (tzv. dolicholpyrofosfát) zakotvený v membráně. Enzymy, které přenášejí mono-sacharidy z dárcovských molekul do rostoucích oligosacharidových řetězců, se nazývají glykosyltransferázy (GTF). Každá GTF má určitou specifitu pro spojování dárcovských molekul na substrát a působí nezávisle na ostatní GTF. Jakmile je syntéza glykanu na cytosolické straně membrány dokončena, je glykan vázaný na lipidový nosič transportován do periplazmatického prostoru. Tento transport je zajištěn enzymy, které jsou schopné přemisťovat fosfolipidy s navázanými glykany z jedné strany membrány na druhou i proti koncentračnímu gradientu, a nazývají se flipázy. Glykosylace proteinů je dokončena pomocí oligosacharyltransferázy (OST). OST jsou podjednotkové membránové enzymy, které katalyzují přenos oligosacharidů vázaných na lipidy (LLO) na cílový polypeptid za vzniku

glykoproteinu. Výše popsaným procesem probíhají oba typy glykosylací, liší se jen specifita oligosacharyltransferáz, které se tak rozlišují na N-OST či O-OST (Balonová, 2011; Delake, 2006; Devaux et al., 2008; Matsumoto et al., 2013; Li et al., 2008; piercenet.com; Qutyan, Paliotti, Castric, 2007).



Obrázek 4: Ukázka glykosylace u Gram-negativních bakterií. HexNAc: N acetylovaná hexóza; Bac: bacillosamin; Glc: glukóza; Hex: hexóza; UMP: uridin monofosfát; PP: undekaprenyl pyrofosforečnan (Převzato z: http://www.antibodyreview.com/protein_image_annot.php?article_pmcid=1976384&pmcid_imgid=106658&image=article_images%2F17608667%2FMol+Microbiol%2F1-03-27%2Fp607-1976384%2Fmmi0065-0607-f10.jpg).

1.2.2 Příklady glykosylací u Gram-negativních bakterií

1.2.2.1 *Campylobacter* species

Campylobacter jejuni je patogen, který způsobuje lidské gastroenteritidy, kolonizuje GIT a invaduje buňky střevního epitelu. Způsobuje akutní bolesti břicha a zánětlivé průjmy. Glykosylace u Gram-negativních bakterií byla poprvé objevena právě u této bakterie. Glykany jsou zde vázány na zbytek AK asparagin, jedná se tedy o N-glykosylaci. Struktura glykanu byla určena jako heptasacharid GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-[Glc β 1,3]-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,4-GalNAc- α 1,3-Bac, kde Bac, značí bacillosamin, 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyglucopyranózu. Modifikace proteinů tímto heptasacharidem je dána *pgl* genovým lokusem, který je zodpovědný za glykosylaci alespoň 30 různých proteinů, např. vysoce imunogenních glykoproteinů PEB3 a CgpA včetně flagelinu. To svědčí o roli glykoproteinů nebo flagelinu v interakcích *C. jejuni* s hostitelem. Mutagenese tohoto místa a ztráta cukerných složek má za následek ztrátu imunogenity a snížení adheze a invaze *in vitro* a je tím snížena virulence. To je důkaz toho, že glykosylace je v bakteriální virulenci důležitá. Mezi enzymy podílející se na glykosylaci se řadí PglE, PglF a PglD, které katalyzují biosyntézu Bac z N-GlcNAc. Bac je přenesen na lipidový nosič pomocí PglC a poté prodloužen o 5 jednotek GalNAc působením PglA, PglJ a PglH. PglI následně připojuje Glcna čtvrtou jednotku GalNAc za vzniku větveného glykanu. Vzniklý heptasacharid je působením PglK přenesen z cytosolu do periplazmy a připojen na zbytek asparaginu cílového proteinu pomocí OST PglB. Glykosylační aparát byl objeven i u dalších druhů rodu *Campylobacter*, jako je *C. lari* či *C. coli* (Linton et al., 2002; Linton et al., 2005; Power, Jennings, 2003; Scott et al., 2011; Szymanski et al., 1999; Weerapana, Imperiali, 2006; Young et al., 2002).

1.2.2.2 *Neisseria* species

O-glykosylace byla poprvé popsána u bakterie *Neisseria meningitidis*, původce meningokokových nákaz. Dochází k ní přes O-vázané cukry na pilinové podjednotky pomocí OST PglL, která je homologní s ligázou katalyzující přidání O-antigenu na LPS. U *N. meningitidis* bylo prokázáno, že pilin je glykosylován na serinu s neobvyklou trisacharidovou molekulou Gal- β 1-4-Gal α 1-3-DADTH, kde DADTH značí 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexózou. Glykosylace rovněž probíhá u *N. gonorrhoeae*, zástupce pohlavně přenosné choroby kapavka, u níž je pilin glykosylován stejným způsobem a ve stejné oblasti pilinové

molekuly, ale O-glykan je převážně disacharid se strukturou Gal- α 1,3-GlcNAc. Pilinový protein této bakterie však není jediný, který je modifikován O-glykosylací. V dnešní době je známá celá řada membránových glykoproteinů různých funkcí, mezi nimi například nitrát reduktáza AniA. Bylo pozorováno osm genů zapojených do glykosylace a prvním z nich byl u *N. meningitidis pglA*. Ke glykosylaci proteinů dochází obdobně jako u bakterie *C. jejuni*, za katalýzy enzymu PglA (Anonsen et al., 2012; Hartley et al., 2011; Ku, Schulz, Power, Jennings, 2009; Power, Jennings, 2003; Power, Seib, Jennings, 2006; Vik et al., 2009).

1.2.2.3 *Pseudomonas* species

Další bakterií s O-glykosylací je *Pseudomonas aeruginosa*, oportunistický patogen schopný způsobovat závažné infekce u jedinců s narušenými obrannými mechanismy. Kmen, který byl zkoumán, nese název 1244. Glykan je trisacharid vázaný na serin se strukturou α -5N β OHC₄7NFmPse-(2-4)- β -Xyl-(1-3)- β -FucNAc, kde α -5N β OHC₄7NFmPse značí 5-N- β -hydroxybutyryl-N-formyl-pseudaminovou kyselinu, Xyl značí xylózu a FucNAc odpovídá N-acetylfukozaminu. Struktura glykanu je totožná se strukturou O-antigenní jednotky, což naznačuje, že se O-glykosylační dráha prolíná s biosyntetickou dráhou LPS. OST katalyzující přenos glykanu na cílový protein se nazývá PilO a studie prokázaly, že tato OST je podobná OST bakterie *F. tularensis*. Genom bakterie *P. aeruginosa* obsahuje *pgl* složený ze 14 genů, které jsou zapojeny do glykosylace. Součástí tohoto genového lokusu je i gen kódující samotný pilinový protein PilA, který je glykosylován. Žádný další glykoprotein nesoucí uvedený trisacharid nebyl v tomto kmeni dosud identifikován (Castric, 1995; Castric, Cassels, Carlson, 2001; Qutyan et al., 2010; Power, Jennings, 2003).

V následující tabulce č. 1 je uveden stručný přehled dosud popsaných Gram-negativních bakterií s funkčním glykosylačním aparátem.

Tabulka 1: G- bakterie s glykosylačním aparátem (Balonová et al., 2012; Hanuszkiewicz et al. 2014; Jervis et al., 2010; Lees-Miller et al., 2013; Lithgow et al., 2014; Power, Jennings, 2003).

Název bakterie	Typ glykosylace	Geny zapojené do glykosylace
<i>Campylobacter jejuni</i>	N-glykosylace	<i>pgl</i>
<i>Neisseria meningitidis</i>	O-glykosylace	<i>pgl</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	O-glykosylace	<i>pilO, pgl</i>
<i>Caulobacter crescentus</i>	O-glykosylace	<i>flmA - H</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	N-glykosylace	<i>neuA, flmD a H, flaA1</i>
<i>Aeromonas caviae</i>	O-glykosylace	<i>flmA,B a D, neuA a B</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	O-glykosylace	<i>bcal0960</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	O-glykosylace	<i>hasB, pgi</i>
<i>Francisella tularensis</i>	O-glykosylace	<i>FTT_0905,FTL_0425,FTT_0791 ,FTT_0798</i>

1.3 Glykosylace a *Francisella tularensis*

F. tularensis má v současné době nejméně tři známé glykosylované proteiny. Jedná se o PilA, DsbA a hypotetický membránový protein FTH_0069. PilA byl objeven u *F. tularensis* supsp. *tularensis* v divokém kmeni FCS200. Glykan je zde ve formě pentasacharidu se strukturou HexNac-Hex-Hex-HexNac-HexNac a geny zapojené do glykosylace jsou například FTT_0905 nebo FTL_0425. Řada studií naznačuje, že PilA protein hraje velmi důležitou roli v patogenezi nemoci způsobené touto bakterií. Do glykosylace proteinu DsbA jsou zapojeny geny FTT_0791 a FTT_0798 a cukr má formu hexasacharidu složeného z N-acetylhexozaminu, hexózy a neznámého monosacharidu o molekulové hmotnosti 242.08 *m/z*. Struktura glykanu tedy vypadá asi takto HexNac-neznámý monosacharid (X)-HexNac-Hex-Hex-HexNac. FTH_0069 je silně imunoreaktivní lipoprotein, který je pravděpodobně také zařazen mezi faktory virulence *F. tularensis* a byl objeven v kmeni Schu S4. Glykan má totožné složení jako glykan proteinu DsbA, je to tedy také hexasacharid obsahující N-acetylhexozamin, hexózu a neznámý monosacharid. Detekovány byly i další předpokládané proteiny, které by mohly být glykosylovány. V předešlých studiích byly vytipovány další kandidátní proteiny, které by mohly být glykosylované. Patří sem například FTH_0414, FTH_1830, FTH_0159, FTH_1855, FTH_0539, FTH_1112, FTH_0311 nebo FTH_1167 (Balonová et al., 2010; Balonová et al., 2012; Egge-Jacobsen et al., 2011; Thomas et al., 2011).

Nezbytnou součástí ke glykosylaci proteinů je enzym OST, který je pravděpodobně společný pro všechny druhy rodu *Francisella* a katalyzuje přenos glykanu z lipidového nosiče na cílový protein. Studie glykosylace proteinů u *N. gonorrhoeae* a u vybraných kmenů *P. aeruginosa* odhalily společné dráhy, ve kterých jsou oligosacharidy syntetizovány na lipidové nosiče v cytoplazmě. Glykan je k cílovému proteinu připojen pouze tehdy, obsahuje-li protein ve své aminokyselinové sekvenci tzv. glykosylační místo, což bývá sekvence 3-5 aminokyselin (Egge-Jacobsen et al., 2011).

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál

2.1.1 Chemický materiál

2.1.1.1 Chemikálie

- Deionizovaná voda (dd.)
- GC agar base (Becton Dickinson, France S.A.S., Le Pont de Claix, Francie)
- Hemoglobin (Becton Dickinson, France S.A.S., Le Pont de Claix, Francie)
- IsoVitaleX (Becton Dickinson, France S.A.S., Le Pont de Claix, Francie)
- L-arginin-HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- L-cystein-HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- L-histidin-HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- L-isoleucin (Sigma, St. Louis, MO)
- L-leucin (Sigma, St. Louis, MO)
- L-lysin-HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- DL-prolin (Sigma, St. Louis, MO)
- DL-serin (Sigma, St. Louis, MO)
- DL-treonin (Sigma, St. Louis, MO)
- DL-valin (Fluka, St. Louis, MO)
- DL-metionin (Sigma, St. Louis, MO)
- Glukóza (Sigma, St. Louis, MO)
- NaCl (Sigma, St. Louis, MO)
- KH_2PO_4 (Sigma, St. Louis, MO)
- K_2HPO_4 (Sigma, St. Louis, MO)
- L-aspartová kyselina (Sigma, St. Louis, MO)
- L-tyrosin (Sigma, St. Louis, MO)
- Tiamin-HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- Spermin tetrahydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO)
- Pantotenát vápenatý (Sigma, St. Louis, MO)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, Neratovice, Česká Republika)
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Biochemicals, Eschwege, Německo)

- NaOH (MERCK, Darmstadt, Německo)
- HCl (Sigma, St. Louis, MO)
- Tris (Sigma, St. Louis, MO)
- Glycerol (Sigma, St. Louis, MO)
- Inhibitory proteáz EDTA free (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Benzonáza (Sigma, St. Louis, MO)
- Triton X-100 (Pharmacia LKB, Uppsala, Švédsko)
- *n*-dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM) (Sigma, St. Louis, MO)
- Kyselina bicincholinová - Pierce™ BCA Protein Assay Kit činidlo A (Sigma, St. Louis, MO)
- CuSO₄·5H₂O - Pierce™ BCA Protein Assay Kit činidlo B (Sigma, St. Louis, MO)
- Proteinový standard Hovězí sérový albumin (HSA), koncentrace 1mg/ml, Pierce™ BCA Protein Assay Kit ampule albumínového standardu (Sigma, St. Louis, MO)
- Akrylamid (Bio-Rad, Hercules, CA)
- 1,4-bis(akryloyl) piperazin (Sigma, St. Louis, MO)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, MO)
- Peroxodisíran amonný (APS) (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Bromfenolová modř (LKB-Producter AB, Bromma, Švédsko)
- β -merkptoetanol (β -ME) (SERVA, Heidelberg, Německo)
- Glycin (Sigma, St. Louis, MO)
- N,N,N,N-tetramethylendiamin (TEMED) (Sigma, St. Louis, MO)
- Metanol (Fluka, St. Louis, MO)
- Netučné sušené mléko (Bio-Rad, Hercules, CA)
- TWEEN 20 (Sigma, St. Louis, MO)
- Etanol (Fluka, St. Louis, MO)
- Chemiluminiscenční kit Pierce™ ECL Plus Western Blotting substrát 1 a 2 (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo)
- Chloroform (Sigma, St. Louis, MO)
- 5,6-karboxyfluorescein peptid (JPT Peptide Technologies, Berlín, Německo)
- Acetonitril (ACN) (MERCK, Darmstadt, Německo)
- CaCl₂ (Sigma, St. Louis, MO)
- MgCl₂·6H₂O (MERCK, Darmstadt, Německo)
- MnCl₂·4H₂O (Sigma, St. Louis, MO)
- Aceton (Fluka, St. Louis, MO)

- Trifluoroctová kyselina (TFA) (Sigma, St. Louis, MO)
- Kyselina mravenčí (FA) (Sigma, St. Louis, MO)
- C18 reverzní fáze (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)
- PolySULFOETHYL A 20 μm , 300 Å (PolyLC, Columbia, MD, USA)
- Propanol (Fluka, St. Louis, MO)
- KCl (Sigma, St. Louis, MO)
- Bisakrylamid (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Tricin (Sigma, St. Louis, MO)
- Butanol (Sigma, St. Louis, MO)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (SERVA, Heidelberg, Německo)
- Kyselina octová (Sigma, St. Louis, MO)
- Formaldehyd (Sigma, St. Louis, MO)
- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sigma, St. Louis, MO)
- Na_2CO_3 (Lachema, Neratovice, Česká Republika)
- AgNO_3 (Sigma, St. Louis, MO)
- Koncentrát A na bázi hydrochinonu (Agfa Healthcare, Mortsel, Belgie)
- Koncentrát B na bázi kyseliny octové a etylenglykolu (Agfa Healthcare, Mortsel, Belgie)
- Koncentrát fixačního roztoku (Agfa Healthcare, Mortsel, Belgie)

2.1.1.2 Protilátky

- Polyklonální králičí anti-FTT1103 protilátka proti proteinu DsbA (R074, APRONEX, Vestec u Prahy, Česká republika)
- Polyklonální králičí anti-PilA sérum proti proteinu PilA (Sweden Defense Research Agency, Umea, Švédsko)
- Monoklonální myší anti-LPS [FB11] protilátka proti lipopolysacharidu (Abcam, Cambridge, UK)
- Polyklonální prasečí protilátka proti králičím imunoglobulinům, značená křenovou peroxidázou HRP (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)
- Polyklonální kozí protilátka proti anti-myším imunoglobulinům značená peroxidázou HRP (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dánsko)

2.1.2 Biologický materiál

2.1.2.1 Bakteriální kmeny

- *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* divoký kmen FSC200 (klinický izolát, Švédsko)
- *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC679 (FSC200/ Δ FTS0416 neboli Δ pgIA mutantní kmen, delece kodonů 10-469) (Egge-Jacobsen et al., 2011)
- *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC354 (FSC074/ Δ FTS0381 neboli Δ pilA mutantní kmen, delece dvou 120 nukleotidových přímých repetice) (Forslund et al., 2006)
- *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200/ Δ FTS1067 neboli Δ DsbA mutantní kmen, delece kodonů 4-369 (Straskova et al., 2009)

2.2 Přístroje

- Laminární box BSL2 (BIOAIR Instruments, Siziano, Itálie)
- SI6 Orbital třepací inkubátor (Sheldon manufacturing, Inc., Cornelius, OR)
- Ultracentrifuga Optima Max (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA)
- Centrifuga Sorvall Evolution RC (Thermo Scientific, Rockford, IL)
- Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- French Press (Thermo Electron Corporation, Needham Heights, MA)
- Ultrazvuková lázeň Manufacture expert (SHARPERTEK, Pontiac, USA)
- Centrifuga Eppendorf Mini spin Plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Stolní Cell denzitometr WPA BIOWAVE C08000 (Biochrom, Cambridge, Anglie)
- Třepačka MS2 (IKA Works, Inc., Wilmington, NC)
- NanoPhotometer UV/VIS spektrofotometr (Implen GmbH, Mnichov, Německo)
- Ohřívač a magnetické míchadlo Jenway 1000 (Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK)
- pH-metr InoLab pH Level 1 (WTW, Weilheim, Německo)
- Termoblok Grant (Tectra a.s., Praha, Česká Republika)
- FLUOStar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Německo)
- Rotátor MACSmix™ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo)
- Vyvolávací aparatura Curix 60/CP1000 (AGFA, Mortsels, Belgie)
- Autokláv SANYO MLS-3020U (Panasonic Healthcare Co., Gunma, Japonsko)
- Termomixér (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Vakuová odparka Jouan RC10 09 s centrifugou RCT60 (Jouan SA, Saint Herblain, Francie)
- UV transiluminátor VILBER TCX-20.M (ETS Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Francie)
- Analytické váhy Mettler Toledo AG (Laboratory & Weighing Technologies, Greifensee, Švýcarsko) a předvážky EK-200 G (Schoeller instruments, s.r.o. Praha, ČR)
- Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN^(R) System s příslušenstvím (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Blotovací aparatura Trans-blot^(R) SD Semi-dry transfer cell (Bio-Rad, Hercules, CA)

2.3 Metody

2.3.1 Příprava tuhých McLeod půd

2.3.1.1 Roztoky

- Roztok 1

Do dvoulitrové lahve bylo naváženo 72 g GC agaru base a rozpuštěno v 1 L dd. vody. Roztok se nechal zahřát a povařit 1 minutu.

- Roztok 2

Bylo naváženo 20 g hemoglobinu a rozpuštěno v 1 L dd. vody. Přes noc se nechal roztok nabobtnat, nejprve pár hodin na míchačce, poté se nechal stát při laboratorní teplotě (LT).

- Růstový doplněk

Byly rozpuštěny 2 lahvičky IsoVitaleXu, každá v 10 ml ředícího roztoku.

2.3.1.2 Postup

Připravené roztoky 1 a 2 byly vyautoklávovány (121°C, 20 min) a zchlazeny na 50°C. Roztoky pak byly sterilně smíseny v 5 L Erlenmeyerově baňce. Poté bylo asepticky přidáno 20 ml růstového doplňku a vzniklé médium bylo dobře promícháno. Médium bylo postupně rozléváno do Petriho misek a případné bubliny byly ihned odstraněny krátkým ožehnutím plamenem. Po zatuhnutí byly McLeod plotny uskladněny v lednici při 4°C.

2.3.2 Příprava kompletního Chamberainova média

2.3.2.1 Roztoky

- 3M NaOH

Bylo naváženo 24 g NaOH a rozpuštěno ve 20 ml dd. vody.

Tabulka 2: Příprava kompletního Chamberlainova média.

Roztok 1			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g] na 2 litry média	
L-arginin-HCl	0,04	0,80	
L-cystein-HCl	0,02	0,40	
L-histidin-HCl	0,02	0,40	
L-isoleucin	0,04	0,80	
L-leucin	0,04	0,80	
L-lysin-HCl	0,04	0,80	
DL-prolin	0,20	4,00	
DL-serin	0,04	0,80	
DL-treonin	0,20	4,00	
DL-valin	0,04	0,80	
DL-metionin	0,04	0,80	
Roztok 2			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g] na 2 litry média	
Glukóza	0,40	8,00	
Roztok 3			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g] na 2 litry média	
NaCl	1,00	20,00	
KH ₂ PO ₄	0,10	2,00	
K ₂ HPO ₄	0,10	2,00	
Roztok 4			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g] na 2 litry média	
L-asparťová kyselina	0,04	0,80	
L-tyrozin	0,04	0,80	
Doplňky roztoku 1			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g]	Do 2 litrů média přidat x [ml]
Tiamin-HCl	0,0004	0,02	4
Spermin tetrahydrochlorid	0,004	0,08	10
Pantotenát vápenatý	0,0002	0,01	4
Doplňky roztoku 2			
Chemikálie	Koncentrace [%]	Navážka [g]	Do 2 litrů média přidat x [ml]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,0135	0,675	4
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,0002	0,010	4

2.3.2.2 Postup

Chemikálie pro přípravu roztoků 1-4 byly naváženy v množstvích odpovídajících jejich požadované finální koncentraci ve dvou litrech média (viz tabulka 2) a rozpuštěny v cca 200 ml dd. vody. Rozpuštěnost chemikálií v roztoku 4 byla dosažena přidávkem 3M roztoku NaOH. Všechny chemikálie pro přípravu doplňků byly nejprve rozpuštěny v 10 ml dd. vody a

jednotlivé doplňky pak byly v množstvích (viz tabulka 2) přidány k odpovídajícím roztokům 1 či 2. Roztoky se svými doplňky byly smíchány dohromady, poté byly přidány roztoky 3 a 4, objem byl doplněn do 2 L a pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,3. Chamberlainovo médium (Ch. médium) bylo asepticky přefiltrováno přes sterilní 0,22 µm filtr do označených sterilních lahví a skladováno při 4°C.

2.3.3 Stanovení kinetiky růstu

2.3.3.1 Roztoky

- Chamberlainovo médium

2.3.3.2 Postup

Na McLeod plotny byla vyseta bakteriální kultura *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* wild-type kmene FSC200 nebo některého z mutantních kmenů. Plotny pak byly kultivovány 24 hod v termostatu při 37°C. Druhý den byl naočkován do předehřátého Ch. média vždy jeden malý stěr z čerstvě nakultivované plotny na optickou denzitu (O.D.) cca 0,1 a suspenze byla kultivována při 36,8 °C, 200 rpm přes noc. Další den byla změřena O.D. narostlých suspenzí, které byly naředěny předehřátým médiem na O.D. 0,1. Připravené suspenze a Ch. médium, které sloužilo jako blank, byly pipetovány do jamek mikrotitrační destičky po 200 µl v hexaplikátu. Pro zabránění odpařování během měření bylo do sousedních jamek napipetováno 350 µl Ch. média. Takto připravená destička byla vložena do přístroje FLUOStar Optima předem vytemperovaného na teplotu 36,8°C. Růst bakterií byl podpořen třepáním destičky v pravidelných 5-ti minutových intervalech. Hodnoty O.D. bakteriálních suspenzí a samotného Ch. média byly zaznamenávány v 10-ti minutových intervalech po dobu 24 hod při vlnové délce 562 nm.

2.3.4 Kultivace bakterie *F. tularensis*

2.3.4.1 Roztoky

- Chamberlainovo médium

- 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl

V 1 L dd. vody bylo rozpuštěno 6,057 g Tris a 14,61 g NaCl, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 8,0.

- 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem

K 95 ml roztoku 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl bylo přidáno 5 ml glycerolu.

2.3.4.2 Postup

Na McLeod plotny byla den před kultivací vyseta bakteriální kultura *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* divokého kmene FSC200 nebo některého z mutantních kmenů. Kultura z plotny byla zaočkována do předehřátého Ch. média a poté kultivována v třepacím inkubátoru při 36,8 °C a 200 rpm cca 12 hodin. Následující den byla změřena O.D. narostlé bakteriální suspenze. Suspenze byla zaočkována do 750 ml čerstvého předehřátého Ch. média v Erlenmayerově baňce, a to na O.D. 0,1 a inkubována při 36,8 °C a 200 rpm do pozdní logaritmické fáze růstu. Poté byla suspenze stočena na 7300 rpm, při 4 °C po dobu 15 minut. Po odstranění supernatantu byl sediment dvakrát promyt 50 mM roztokem Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl. Získaný pelet byl resuspendován v 9 ml 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem. Pro zabránění proteolýzy byly k bakteriální suspenzi přidány 50x koncentrované inhibitory proteáz.

2.3.5 Příprava proteinové membránové frakce *F. tularensis*

2.3.5.1 Roztoky

- 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl

V 1 L dd. vody bylo rozpuštěno 6,057 g Tris a 14,61 g NaCl, pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 7,0.

- 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem

K 95 ml roztoku 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl bylo přidáno 5 ml glycerolu.

- Solubilizační pufr 1A: 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl, 5% (v/v) glycerolem a 1% (v/v) Tritonem X-100

K 99 ml 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem byl přidán 1 ml Tritonu X-100.

- Solubilizační pufr 2A: 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl, 5% (v/v) glycerolem a 1% (v/v) Tritonem X-100

K 99 ml 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem byl přidán 1 ml Tritonu X-100.

- Solubilizační pufr 1B: 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl, 5% (v/v) glycerolem a 1% (w/v) DDM

V 99 ml 50 mM Tris–HCl (pH 8,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem byl rozpuštěn 1 g DDM.

- Solubilizační pufr 2B: 50 mM Tris–HCl (pH 1,0) s 0,25 M NaCl, 5% (v/v) glycerolem a 1% (w/v) DDM

V 99 ml 50 mM Tris–HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl a 5% (v/v) glycerolem byl rozpuštěn 1 g DDM.

2.3.5.2 Postup

Bakteriální suspenze byla lyzována přístrojem French Press (16000 psi, 2 průchody), k lyzátu bylo přidáno 150 U benzonázy/ml suspenze a proběhla inkubace 15 min na ledu. Nerozbité buňky byly odstraněny stočením (10 000 rpm, 4°C, 30 minut). Supernatant byl rozpipetován do ultracentrifugačních zkumavek a stočen na ultracentrifuze Beckman Max při 100 000g, 4°C na 1 hod. Supernatanty obsahující cytosolické proteiny byly vyhozeny. Sedimenty obohacené převážně o membránové proteiny byly resuspendovány v příslušném solubilizačním pufru 1A, 2A, 1B nebo 2B (v množství 2 ml pufru na gram původního peletu) a rozpouštěny přes noc při 4°C za mírného otáčení v rotátoru. Nerozpuštěné zbytky membrán byly odstraněny ultracentrifugací. Solubilizované supernatanty obohacené o membránové proteiny byly uschovány ve 400 µl-alikvotech při -80°C.

2.3.6 Extrakce oligosacharidů vázaných na lipidy

2.3.6.1 Roztoky

- Chamberlainovo médium
- Extrakční činidlo

Byl smíchán chloroform, metanol a dd. voda v objemovém poměru 10:20:3.

2.3.6.2 Postup

Na McLeod plotny byla den před kultivací vyseta bakteriální kultura *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* divokého kmene FSC200. Kultura z plotny byla zaočkována do předeřátého Ch. média a poté kultivována v třepacím inkubátoru při 36,8 °C a 200 rpm cca 12 hodin přes noc. Následující den byla změřena O.D. narostlé bakteriální suspenze. Suspenze byla zaočkována do 750 ml čerstvého předeřátého Ch. média v Erlenmayerově baňce, a to na O.D. 0,1 a inkubována při 36,8 °C a 200 rpm do pozdní logaritmické fáze růstu. Suspenze pak byla stočena na 7300 rpm, při 4 °C po dobu 15 minut. Supernatanty byly slity a sedimenty byly dvakrát promyty v dd. vodě. Promyté pelety byly následně resuspendovány v 15 ml extrakčního činidla a oligosacharidy vázané na lipidy (LLO) byly extrahovány z povrchu bakteriálních buněk mírným „omíláním“ při LT po dobu 30 minut. Extrahované LLO byly odděleny od bakterií centrifugací na 10 000g, při 4°C na 10 minut. Supernatant byl posbírán a extrakce LLO byla zopakována opětovným přidáním 15 ml extrakčního činidla k sedimentovaným bakteriím. Po odstranění bakterií stočením suspenze byly oba supernatanty spojeny a následně zakoncentrovány ve vakuové odparce a odparek pak rozpuštěn v 500 µl dd. vody. Nerozpustné agregáty byly odstraněny stočením (10 000 rpm, 10 min, 4°C) a roztok obsahující LLO byl uskladněn při 4°C v lednici.

2.3.7 Stanovení koncentrace proteinů metodou BCA

2.3.7.1 Roztoky

- Pracovní roztok

50 dílů roztoku kyseliny bicincholinové bylo smícháno s 1 dílem 4% roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v množství podle počtu standardů a vzorků.

- Roztoky kalibrační řady

Tabulka 3: Roztoky kalibrační řady.

Standard č.	Dd.voda [μ l]	Standard HSA [μ l]	HSA koncentrace [mg/ml]
1	50	0	0
2	40	10	0,2
3	30	20	0,4
4	20	30	0,6
5	10	40	0,8
6	0	50	1

2.3.7.2 Postup

Do 1,5 ml mikrozkušavek Eppendorf byla ředěním roztoku standardu HSA o koncentraci 1 mg/ml připravena kalibrační řada v rozmezí 0,2 – 1 mg/ml dle tabulky 3. Vzorky byly naředěny na koncentraci proteinů v rozmezí kalibrační řady, a to ve stejném celkovém objemu jako roztoky kalibrační řady, tedy 50 μ l. K naředěným standardům a vzorkům byl přidán 1 ml pracovního roztoku v pořadí měření, tj. od standardu 1 až 6 ke vzorkům a vše bylo důkladně promícháno. Následně proběhla inkubace v termostatu při 37°C po dobu 30 minut, po které byly vzorky ochlazeny, promíchány a během 20 minut byla změřena jejich absorbance na spektrofotometru NanoPhotometer UV/VIS při vlnové délce 562 nm.

2.3.8 Mini 1D SDS–PAGE

2.3.8.1 Roztoky

- Akrylamidová směs

Bylo naváženo 4,5 g akrylamidu a 0,12 g 1,4-bis(akryloyl) piperazinu a rozpuštěno v dd. vodě na finální objem 15 ml.

- 10 % SDS

0,1 g SDS bylo rozpuštěno v 1 ml dd. vody.

- 3x SDS vzorkový pufr s β -ME

Bylo smícháno 1,875 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,69 g SDS, 3 ml glycerolu, 0,3 ml 0,1 % bromfenolové modře a roztok byl doplněn do 5 ml dd. vodou. K 85 μ l 3x SDS vzorkového pufru bylo přidáno 15 μ l β -ME do finální koncentrace 15%.

▪ Elektrodový pufr

6 g Tris, 28,8 g glycinu a 1 g SDS byly rozpuštěny v 1 litru dd. vody, pH bylo upraveno přidavkem HCl na hodnotu 8,5.

Tabulka 4: Mini 1D SDS-PAGE.

	4 % zaostřovací gel	10 % separační gel	15 % separační gel
Akrylamidová směs	1,3 ml	5,01 ml	7 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	3,75 ml	3,48 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml	-	-
Dd. voda	6,1 ml	6,0 ml	3,32 ml
	odvzdušnit		
10 % SDS	100 µl	150 µl	140 µl
10% APS	50 µl	37,5 µl	35,2 µl
TEMED	10 µl	3,75 µl	3,52 µl
Doba polymerace	50 min	1 hod 10 min	1 hod

2.3.8.2 Postup

Polymerační směsi pro přípravu gelů byly připraveny smícháním roztoků dle tabulky 4. Porozita separačního gelu a nanášené množství vzorků byly zvoleny dle typu a molekulové hmotnosti sledovaného proteinu (viz tabulka 5). Nejprve byly připraveny 10% a 15% separační gely smícháním všech roztoků včetně dd. vody, poté byly směsi odvzdušněny a polymerace byla zahájena po přidavku SDS, APS a TEMED. Poté byly tyto gely převrstveny 4% zaostřovacím gelem, do kterého byl ihned vložen hřebínek pro tvorbu jamek, a nechaly se opět polymerovat. Po polymeraci byly hřebínky opatrně vyjmuty a vzniklé jamky byly propláchnuty destilovanou vodou. Gely byly vloženy do elektroforetické aparatury a zality elektrodoým pufrem. Analyzované vzorky byly rozpuštěny v SDS-vzorkovém pufru do finální koncentrace β -ME 5% a následně povařeny 5 min při 95°C. Poté byly napipetovány do jamek. Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického napětí a byla zahájena separace při konstantním napětí 200 V a proudu 60 mA/gel. Elektroforéza byla ukončena tehdy, když čelo bromfenolové modře doputovalo ke spodnímu okraji gelu.

Tabulka 5: Molekulové hmotnosti proteinů.

Název proteinu, sacharidu	Molekulová hmotnost [kDa]	Porozita gelu [%]	Nanášené množství [μg]
DsbA	39,5	10	30
PilA	13,5	15	0,5
LPS	2-250	15	0,5

2.3.9 Western blot a imunodetekce

2.3.9.1 Roztoky

- Transfer pufr

Bylo smícháno 15,15 g Tris, 72 g glycinu, 1 L metanolu a 4 L dd. vody.

- 10x TBS

24,4 g Tris a 80 g NaCl bylo rozpuštěno v 1 L dd. vody.

- TBS

200 ml 10x TBS bylo smícháno s 1,8 litry dd. vody.

- TBS-T 0,1%

Ke 2 litrům TBS byly přidány 2 ml Tween 20.

- Blokační roztok

Do 100 ml TBS-T 0,1% bylo naváženo 5 g sušeného mléka.

- Ředění primární protilátky

- Polyklonální králičí anti-FTT1103 protilátka byla naředěna v poměru 1:1000 v 5 % mléku v TBS-T 0,1 %.
- Polyklonální králičí anti-PilA sérum bylo naředěno v poměru 1:3000 v 5 % mléku v TBS-T 0,1 %.
- Monoklonální myší anti-LPS protilátka byla připravena v ředění 1:1500 v 5 % mléku v TBS-T 0,1 %.

- Ředěné sekundární protilátky

- Polyklonální prasečí Anti-králičí ředění 1:1000 v 5 % mléku v TBS s 0,1 % TWEEN 20.
- polyklonální kozí Anti-myši ředění 1:1000 v 5 % mléku v TBS s 0,05 % TWEEN 20.

- Chemiluminiscenční roztok

Bylo smícháno 100 dílů roztoku 1 z chemiluminiscenčního kitu ECL s 1 dílem roztoku 2 z chemiluminiscenčního kitu ECL.

- Vývojka

Do 1,25 litrů dd. vody byl vmíchán 1 litr koncentrátu A na bázi hydrochinonu a po promíchání bylo vmícháno 0,25 litru koncentrátu B na bázi kyseliny octové a etylenglykolu.

- Fixační roztok

Do 2 litrů dd. vody bylo vmícháno 0,5 litru koncentrátu fixačního roztoku.

2.3.9.2 Postup

PVDF membrána byla nejprve aktivována smočením na 1 minutu v metanolu a poté promývána 20 minut v transfer pufu. V transfer pufu byl dále smočen tlustý blotovací papír (Extra thick blot paper), pět filtračních papírů a rovněž gel po elektroforéze. Přenos proteinů/LPS z gelu na membránu byl uskutečněn polosuchou cestou v tzv. transfer cele. Na anodu (spodní díl transfer cely) byl položen tlustý blotovací papír, na něj membrána, gel a nakonec pět filtračních papírů a byly odstraněny případné bubliny bránící přenosu. Vzniklý sendvič byl přiklopen katodou (horní díl transfer cely) a přenos proteinů z gelu na membránu byl zahájen při konstantním proudu 170 mA a maximálním napětí 25 V Po ukončení přenosu byla membrána s navázanými proteiny/LPS 10 minut promývána v TBS při laboratorní teplotě. Pro zabránění nespecifické vazby primární protilátky byla membrána inkubována v blokačním roztoku po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě a poté se nechala inkubovat přes noc s ředěnou primární protilátkou na parafilmu nebo v rotátoru při + 4 °C. Druhý den byla nezreagovaná primární protilátka odstraněna opakovaným promýváním membrány v roztoku TBS-T 0,1%. Poté byla membrána inkubována se zředěnou sekundární protilátkou zvířecího druhu dle typu použité primární protilátky, a to po dobu 1 hodiny. Nenavázaná sekundární protilátka byla odstraněna několikerým promýváním membrány v TBS-T 0,1%. Na závěr byla membrána promyta v TBS. Všechny zmíněné promývací a inkubační kroky byly provedeny v rotátoru při LT a to za podmínek dle typu detekované látky (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Promývací a inkubační kroky při WB a imunodetekci.

		DsbA	PilA	LPS
Primární Ab	Zvířecí druh	Králíčí	Králíčí	Myší
	Ředění	1:1000	1:3000	1:1500
	Inkubace	Na parafilmu	V rotátoru	Na parafilmu
TBS-T		6x 5 min	8x 5 min	6x 5 min
Sekundární Ab	Zvířecí druh	Prasečí (proti králíčím Ig)	Prasečí (proti králíčím Ig)	Kozí (proti myším Ig)
	Ředění	1:1000	1:1000	1:1000
TBS-T		6x 9 min	8x 9 min	6x 9 min
TBS		1x 5 min	1x 5 min	1x 5 min

Po promytí byla membrána na 1 minutu smočena v chemiluminiscenčním roztoku připraveném dle pokynů výrobce a poté vložena do kazety. Následná detekce byla provedena v temné komoře při červeném světle, kde byl na membránu přiložen RTG film na různě dlouhou dobu expozice. Exponovaný film byl vyvolán s použitím vývojky a fixačního roztoku v přístroji Curix 60/CP1000.

2.3.10 In vitro oligosacharyltransferázová reakce

2.3.10.1 Roztoky

- 5,6-karboxyfluorescein peptid

Byl připraven 30 µmol/l roztok peptidu, ze kterého byly dále připraveny alikvoty po 600 ng a odpařeny.

- 0,5 M Tris-HCl pH 6,5

V 50 ml dd. vody byly rozpuštěny 3 g Tris, pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,5.

- 10x Reakční pufr 1: 0,5 M Tris–HCl pH 6,5 s 100 mM CaCl₂, 100 mM MgCl₂ a 100 mM MnCl₂

V 5 ml 0,5 M Tris–HCl pH 6,5 bylo rozpuštěno 55,5 mg CaCl₂, 101,65 mg MgCl₂ a 98,95 mg MnCl₂.

- 10x Reakční pufr 2: 0,5 M Tris–HCl pH 6,5 + 100 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂

V 5 ml 0,5 M Tris–HCl pH 6,5 bylo rozpuštěno 55,5 mg CaCl₂ a 9,895 mg MnCl₂.

2.3.10.2 Postup

600 ng 5,6-karboxyfluorescein peptidu bylo rozpuštěno v 10x Reakčním pufru 1 nebo 2 do výsledné koncentrace 30 µmol/l. Enzymatická reakce byla provedena smícháním 120 pmol fluorescenčně značeného peptidu, solubilizované membránové frakce jednotlivých bakteriálních kmenů *F. tularensis* v různých testovaných množstvích a případně s přidavkem 10 µl LLO frakce. Obsah zkumavek byl promíchán a inkubován po dobu 18 hodin při 30°C nebo 37°C za mírného třepání při 300 rpm v termomixéru. Enzymatická reakce byla zastavena precipitací vzorků přidavkem acetonu do výsledné koncentrace 80% s následnou 1-hodinovou inkubací při -20°C. Poté byly precipitáty stočeny, supernatanty odsáty a pelety vysušeny od zbytkového acetonu.

2.3.11 Extrakce na pevné fázi C18

2.3.11.1 Roztoky

- 0,1% TFA s 5% ACN

Bylo smícháno 50 µl TFA a 2,5 ml ACN se 47,5 ml dd. vody.

- 0,1% TFA s 80% ACN

Bylo smícháno 50 µl TFA a 40 ml ACN s 10 ml dd. vody.

- 0,1% FA s 5% ACN

Bylo smícháno 50 µl FA a 2,5 ml ACN se 47,5 ml dd. vody.

- 0,1% FA s 60% ACN

Bylo smícháno 50 µl FA a 30 ml ACN s 20 ml dd. vody.

2.3.11.2 Postup

Reverzní fáze C18 naplněná v mikrokolonkách byla nejprve aktivována metanolem a následně postupně ekvilibrována roztoky 0,1% TFA s 80% ACN a poté 0,1% TFA s 5% ACN. Na ekvilibrovanou fázi byl nanesen vzorek po enzymatické reakci, který byl resuspendován v 0,1% roztoku TFA s 5% ACN. Proteiny a fluorescenční peptid, které byly tímto zachyceny na reverzní fázi, byly důkladným promytím roztokem 0,1% FA s 5% ACN zbaveny solí a následně uvolněny z fáze roztokem 0,1% FA s 60% ACN.

2.3.12 Iontově výměnná chromatografie

2.3.12.1 Roztoky

- 0,1% FA s 60% ACN

Bylo smícháno 50 ml FA a 30 ml ACN s 20 ml dd. vody.

- 0,05% FA s 30% ACN

Roztok 0,1% FA s 60% ACN byl naředěn dd. vodou v poměru 1:1.

- 0,05% FA a 30% ACN s 1M KCl

372,75 mg KCl bylo rozpuštěno v 5 ml 0,05% FA s 30% ACN.

2.3.12.2 Postup

Prázdné kolonky byly naplněny 10-15 mg PolySULFOETHYL A fáze na bázi katexu. Následně byly ekvilibrovány 100% roztokem ACN, dále 0,05% FA a 30% ACN s 1M KCl a dvakrát 0,05% FA s 30% ACN. Proteiny a fluorescenční peptid v roztoku 0,1% FA s 60% ACN byly naředěny vodou v poměru 1:1, nanесeny na připravené kolonky a byla sbírána proteklá frakce obsahující fluorescenční peptid. Frakce byla odpařena na vakuové odparce.

2.3.13 Mini 1D Tricin-SDS-PAGE

2.3.13.1 Roztoky

- Roztok AB-3: 49,5% T, 3% C

24 g akrylamidu a 0,75 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno v dd. vodě na finální objem 50 ml.

- Roztok AB-6: 49,5% T, 6% C

23,25 g akrylamidu a 1,5 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno v dd. vodě na finální objem 50 ml.

- 3,0 M Tris-HCl pH 8,45

18,17 g Tris bylo rozpuštěno v 50 ml dd. vodoy, pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na požadovanou hodnotu.

- 3x gelový pufr: 3,0 M Tris-HCl pH 8,45 s 0,3% SDS

0,15 g SDS bylo rozpuštěno v 3,0 M Tris-HCl pH 8,45.

- 10% APS

100 mg APS bylo rozpuštěno v 1 ml dd. vody.

- Tricinový elektrodový pufr: 0,1 M Tris, 0,1 M tricín, 0,1% SDS, pH 8,25

Bylo naváženo 6,057g Tris, 8,95 g tricínu a 0,5 g SDS a rozpuštěno v 0,5 L dd. vody.

- 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

Byly naváženy 3 g Tris a rozpuštěny v 50 ml dd. vody, pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,8.

- Příprava 4x Tricinového vzorkového pufru

Bylo smícháno 0,15 g SDS, 1,5 ml glycerolu, 1,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,5 ml Coomassie Brilliant Blue G-250 a 1,2 ml dd. vody.

- Příprava 1x Tricinového vzorkového pufru s β -ME

Do 188 μ l 4x Tricin vzorkového pufru bylo přidáno 12 μ l β -ME a zředěno 600 μ l dd. vody.

- Příprava roztoků na tricínové gely

Tabulka 7: Příprava roztoků na tricínové gely.

Roztok	Zaostřovací 4% gel	Spacer 10% gel	Separáčnický 16% gel
AB-3	0,333 ml	0,6 ml	-
AB-6	-	-	3,33 ml
3x gelový pufr	1 ml	1 ml	3,33 ml
Urea	-	-	3,6 g
Dd. voda do finálního objemu	4 ml	3 ml	10 ml
10% APS	30 μ l	15 μ l	33,3 μ l
TEMED	3 μ l	1,5 μ l	3,3 μ l

2.3.13.2 Postup

Polymerační směsi pro přípravu gelů byly připraveny smícháním roztoků dle tabulky 7. Nejdříve byly napipetovány všechny roztoky až včetně dd. vody a polymerace byla zahájena přidáním roztoků 10 % APS a TEMED. Nejprve byl připraven 16 % separáčnický gel, který byl ihned opatrně převrstven 1-cm vrstvou 10 % gelu, a oba gely se nechaly současně polymerovat. Poté byl 10% gel převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl ihned vložen hřebínek pro tvorbu jamek a gel se nechal opět polymerovat. Po polymeraci byl hřebínek opatrně vyjmut a vzniklé jamky byly propláchnuty dd. vodou. Gely byly vloženy do elektroforetické aparatury a zality tricínovým elektrodočným pufrům. Do jamek byly poté napipetovány vzorky rozpuštěné v tricínovém vzorkovém pufru a povařené 5 min při 95°C. Aparatura byla zapojena do zdroje elektrického napětí, umístěna na led a byla zahájena separace za měnícího se konstantního napětí dle tabulky 8. Elektroforéza byla ukončena tehdy, když čelo barvičky Coomassie Brilliant Blue G-250 doputovalo ke spodnímu okraji gelu. Fluorescenční peptid byl vizualizován pod UV transiluminátorem při vlnové délce excitace 494 nm a emise 520 nm.

Tabulka 8: Mění se konstantní napětí.

Elektrický proud [mA]/gel	Napětí [V]	Doba separace [min]
60	30	30
60	100	60
60	200	~130

2.3.14 Modření gelu podle Jungbluta

2.3.14.1 Roztoky

- Fixační/Barvicí roztok

Metanol s kyselinou octovou a dd. vodou byly smíchány v poměru 50:10:40. V připraveném roztoku pak byla rozpuštěna CBB G-250 do finální koncentrace 0,05%.

- Odbarvovací roztok

Metanol, kyselina octová a dd. voda byly smíchány v poměru 5:12,5:82,5.

2.3.14.2 Postup

Gel po elektroforéze byl krátce opláchnut dd. vodou a poté ponořen do fixačního/barvicího roztoku a inkubován přes noc na třepačce. Druhý den bylo barevné pozadí gelu odbarveno promytím gelu odbarvovacím roztokem dvakrát po 30 minutách a poté 7 % kyselinou octovou až do úplného odbarvení pozadí.

2.3.15 Stříbření gelů EMBL

2.3.15.1 Roztoky

- EMBL1

Metanol, kyselina octová a dd. voda byly smíchány v poměru 50:10:40.

- EMBL2

50% methanol ve vodě.

- 0,0315% Na₂S₂O₃

Do 600 ml dd. vody vychlazené na 4°C bylo naváženo 189 mg Na₂S₂O₃.

- 0,1% AgNO₃

Do 500 ml dd. vody o 4°C bylo naváženo 0,5 g AgNO₃.

- Vyvíjecí roztok

Do 1 L vychlazené dd. vody bylo naváženo 20 g Na₂CO₃. Těsně před použitím bylo přidáno 550 ul 37% formaldehydu.

- Stop lázeň

5 % kyselina octová.

2.3.15.2 Postup

Pro stříbření gelů byl použit protokol dle Shevchenka s modifikacemi (Shevchenko et al., 1996). Gel byl opláchnut krátce dd. vodou. Proteiny byly v gelu zafixovány inkubací gelu 20 minut s roztokem EMBL1. Poté byla kyselina octová z EMBL1 odstraněna promytím gelu 10 minut v EMBL2 roztoku a nakonec s dd. vodou přes noc. Druhý den byl gel promýván 1 minutu v $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a opláchnut v dd. vodě dvakrát 1 minutu. Stříbření bylo započato inkubací gelu v roztoku AgNO_3 na 20 minut gel byl dvakrát 1 minutu opláchnut dd. vodou a detekce proteinů provedena inkubací s vyvíjecím roztokem dvakrát po dobu 1 minuty. Vyvíjení bylo zastaveno promytím gelu třikrát 5 minut ve stop lázni.

3 Výsledky a diskuze

Výzkumy, které byly prováděny, prokázaly, že glykosylace probíhá i u bakterie *F. tularensis*. Jsou známy nejméně tři glykosylované proteiny – PilA (Egge-Jacobsen et al., 2011; Forslund et al., 2006), DsbA (Thomas et al., 2011) a hypotetický imunoreaktivní protein FTH_0069 (Balonová et al., 2012). U jiných bakterií – např. *C. jejuni* nebo *H. pullorum*, byla glykosylace prováděna *in vitro* pomocí OST enzymu v připravené membránové frakci. Jelikož má *F. tularensis* funkční glykosylační aparát a OST enzym obsahuje, cílem práce je zjistit, zda lze i u této bakterie glykosylaci provést *in vitro* z připravené membránové frakce. *In vitro* glykosylace se účastní tři složky – protein či peptid, který má být glykosylován, glykan, který má být připojen na cílovou molekulu a enzym OST, který má toto připojení realizovat. Enzym vykonávající funkci OST ve *F. tularensis* se nazývá PglA. Tento enzym tedy katalyzuje přenos glykanu z lipidového nosiče na cílový protein/peptid. K cílovému proteinu/peptidu jsou glykany připojeny pouze tehdy, obsahuje-li protein/peptid glykosylační místo AK, které může být součástí krátké aminokyselinové sekvence zvané glykosylační motiv. Úkolem této diplomové práce bylo zjistit, zda *in vitro* glykosylace proběhne na přidaném fluorescenčně značeném peptidu.

Řada proteinů používaných v medicíně či pro jiné nemedicínské účely je připravována rekombinantní cestou v bakterii *E. coli*. Vzhledem k tomu, že *E. coli* nemá glykosylační aparát, jsou připravené rekombinantní proteiny bez této post-translační modifikace. Neglykosylované proteiny tak mohou mít do jisté míry odlišné vlastnosti, například imunogenitu, než jejich glykosylované varianty. Glykosylace nemodifikovaných rekombinantních proteinů provedená *in vitro* tak představuje nové možnosti přípravy glykoproteinů, které bývají silně imunogenní a které by mohly být použity jako podjednotkové vakcíny.

3.1 Příprava bakteriální OST

3.1.1 Výběr kmenů vhodných jako zdroj OST pro *in vitro* glykosylaci

OST patří do rodiny glykosyltransferáz, které katalyzují přenos oligosacharidů vázaných na lipidy na vznikající polypeptidový řetězec. U *F. tularensis* byl protein zastávající funkci OST objeven teprve nedávno, a to jako první enzym glykosylační dráhy, a proto byl pojmenován PglA. Podle predikčních programů PSORTb a TMHMM je protein lokalizován v cytoplazmatické membráně a je tvořen 13 transmembránovými helixy. Velikost PglA v kmeni FSC200 je 55 kDa a délka je 480 AA. Sekvence proteinu obsahuje funkční doménu Wzy_C, což je O-antigen ligáza, která se podílí na syntéze LPS. PglA vykazuje 40% homologii s OST enzymem bakterie *P. aeruginosa* (Balonová et al., 2010; Egge-Jacobsen et al., 2011; Mohorko, Glockshuber, Aebi, 2011; uniprot.org).

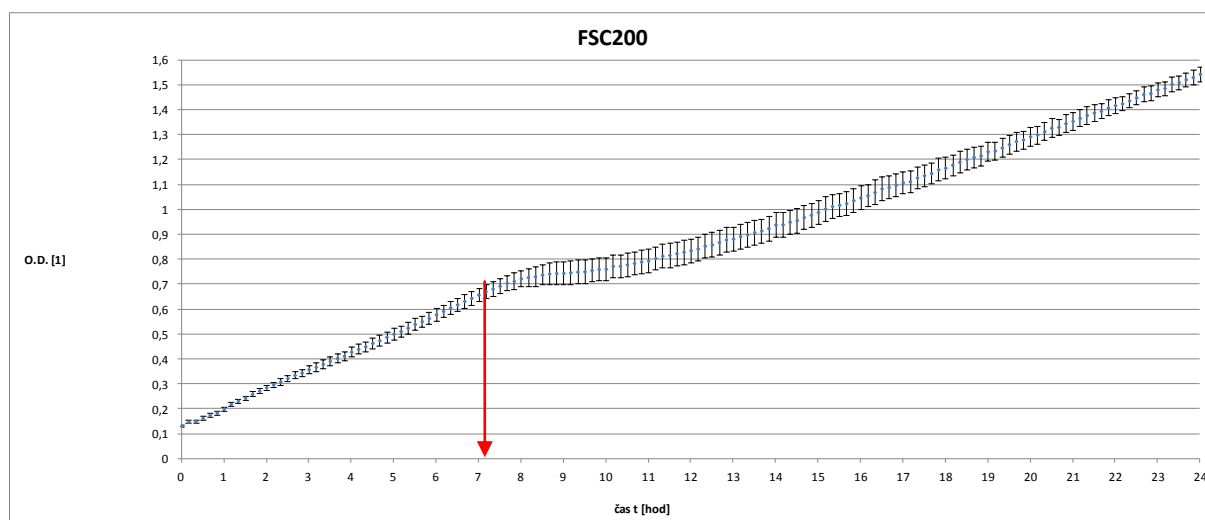
Pro *in vitro* glykosylaci je ideální použít OST jako samostatný purifikovaný protein dostatečné čistoty. Jednou z možností je připravit rekombinantní OST. OST je možné rovněž vyizolovat v nativní formě z příslušného bakteriálního kmene. Použití těchto přístupů závisí na vlastnostech konkrétní OST. Obecně lze říci, že oba přístupy bývají problematické vzhledem k membránové lokalizaci enzymu a z toho vyplývající snížené rozpustnosti. V případě izolace nativního OST hraje roli i to, že protein často není produkován v množstvích výrazně převyšujících produkci ostatních bakteriálních proteinů a tak může dojít k jeho ztrátě při následných purifikačních krocích. Z těchto důvodů se alternativně může použít frakce obohacená o membránové proteiny izolovaná z bakteriálního lyzátu, ve které by se měl OST vyskytovat. Vzhledem k tomu, že se PglA z bakterie *F. tularensis* zatím nepodařilo vyizolovat, bylo v této studii zvoleno použití membránové frakce. Úspěšnost použití membránové frakce, jako zdroj OST pro *in vitro* glykosylaci byla demonstrována již v předešlých studiích (Jervis et al., 2010; Kohda et al., 2007).

Jako zdroj OST bylo v této diplomové práci zvoleno několik bakteriálních kmenů. Jako první byl vybrán *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* divoký kmen FSC200. Tento kmen obsahuje všechny potřebné složky ke glykosylaci, včetně OST PglA. V tomto kmeni dochází ke glykosylaci proteinů glykanem - hexasacharidem. Lze předpokládat, že množství všech složek je v optimálním poměru. Naproti tomu *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC679 (Egge-Jacobsen et al., 2011) je Δ *pglA* mutantní kmen, který neobsahuje OST

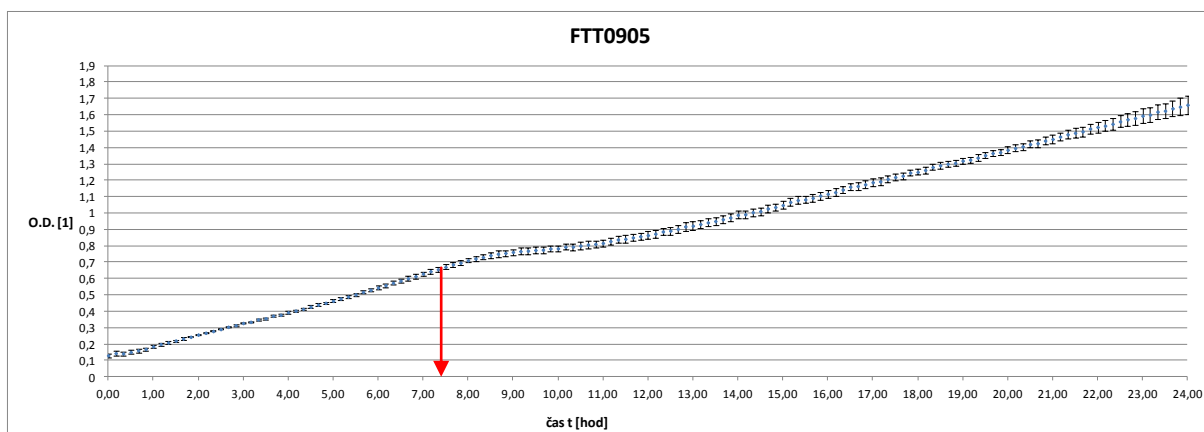
PglA, a tudíž v něm glykosylace neprobíhá. Syntéza glykanů je nicméně zachována a jelikož nemohou být připojeny na cílové proteiny, jsou glykany v tomto kmeni v nadbytku. Pro zvýšení účinnosti *in vitro* glykosylace byl tedy zvolen takový postup přípravy OST, kdy kmen FSC200 byl smíchán s kmenem FSC679. Divoký kmen tak sloužil jako zdroj OST a $\Delta pglA$ mutantní kmen jako zdroj nadbytku glykanů. Použití směsi divokého kmene a kmene bez OST bylo úspěšně popsáno u bakterie *C. jejuni* (Jervis et al., 2010). Dále byly jako zdroj OST použity mutantní kmeny *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC354 (Forslund et al., 2006) a *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200/ $\Delta FTS1067$ (Strašková et al., 2009). Každý z těchto kmenů má odstraněn gen kódující odpovídající protein, a to PilA (v případě FSC354 kmene, v následujícím textu označen jako $\Delta pilA$ kmen) či protein DsbA (v případě FSC200/ $\Delta FTS1067$, v následujícím textu uváděn jako $\Delta dsbA$ kmen). Proteiny PilA a DsbA jsou nativní akceptorové proteiny pro glykosylaci, jejich absence tedy zapříčiní, že glykan bude v těchto kmenech v nadbytku, a zvýší se tak pravděpodobnost *in vitro* glykosylace cílové akceptorové molekuly, v našem případě 5,6-karboxyfluorescein peptidu. Všechny membránové frakce těchto kmenů byly připraveny pomocí lýzy bakteriální suspenze (kapitola 2.3.5).

3.1.2 Stanovení kinetiky růstu mutantních kmenů

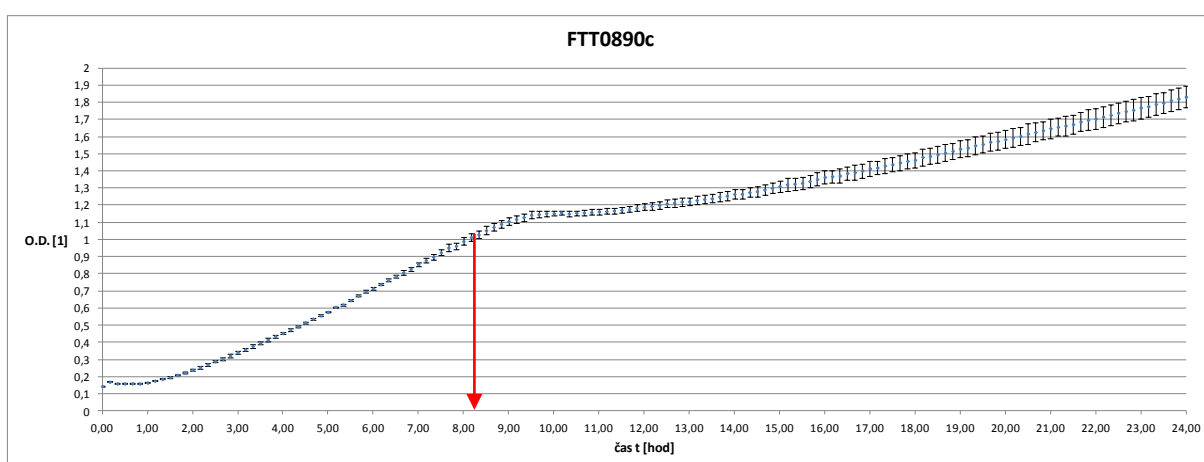
Pro určení optimální doby kultivace mutantních kmenů byla sledována kinetika růstu dle metody 2.3.3.



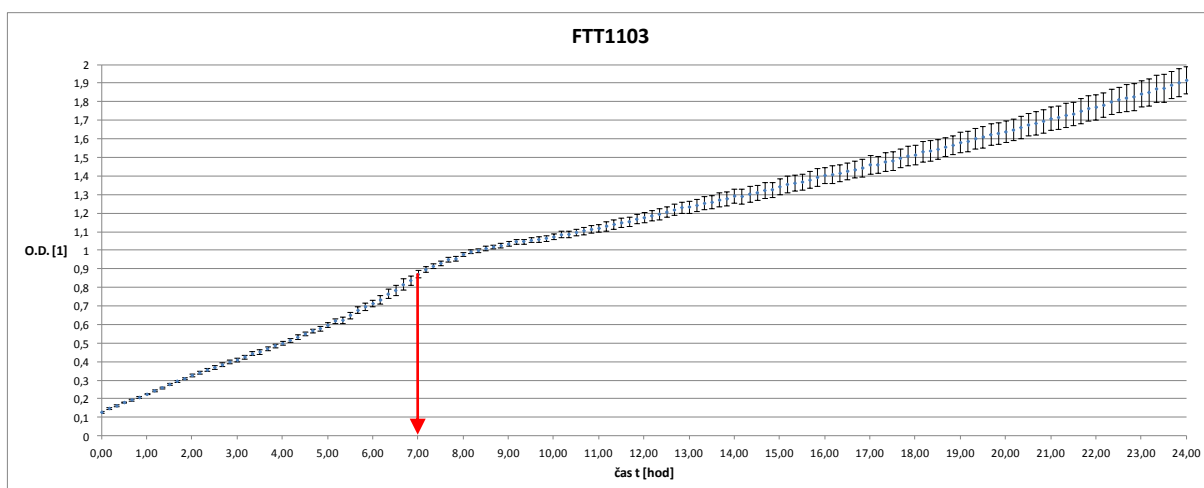
Graf 1: Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* divokého kmene FSC200.



Graf 2: Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene $\Delta pglA$.



Graf 3: Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene $\Delta pilA$.



Graf 4: Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene $\Delta dsbA$.

Ze zpracovaných grafů byla určena O.D. a doba kultivace pro každý kmen, kdy jsou bakterie v tzv. pozdní logaritmické fázi růstu, při níž je replikace bakterií vysoká a ještě nedochází k jejich přílišnému úhynu. Pro divoký kmen FSC200 byla zvolena O.D. 0,7, které bylo dosaženo za 7 hodin kultivace kmene při počáteční O.D. 0,1 (graf 1). U mutantního kmene *ΔpglA* bylo pozdní logaritmické fáze dosaženo po 7,5 hodinách kultivace při výsledné O.D. 0,7 (graf 2). U kmene *ΔpilA* byla určena O.D. na 1 po téměř 8,5 hodinách kultivace z počáteční O.D. 0,1 (graf 3). Výsledná O.D. 0,8 byla stanovena u kmene *ΔdsbA* a bylo jí dosaženo po 7 hodinách kultivace při počáteční O.D. 0,1 (graf 4). Stanovené optimální doby růstu byly využity při následných kultivacích uvedených bakteriálních kmenů.

3.2 Ověření glykosylační aktivity mutantních kmenů

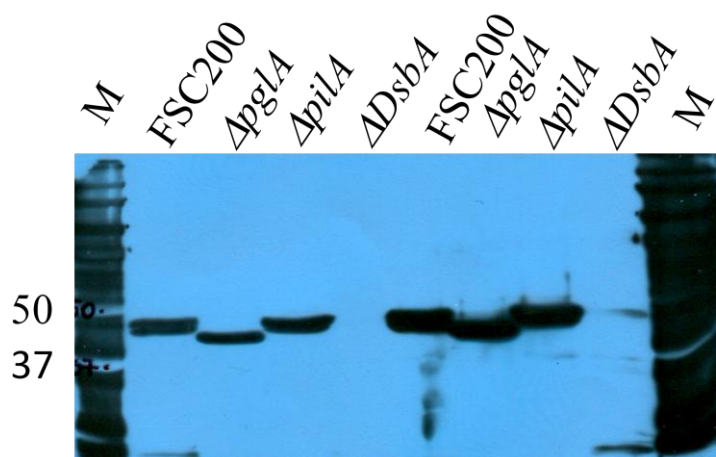
Pokud je daný protein glykosylován, projeví se to na jeho molekulové hmotnosti, která je vyšší, než je jeho teoretická molekulová hmotnost určená z aminokyselinové sekvence proteinu. Molekulovou hmotnost proteinu lze sledovat po separaci proteinů elektroforézou v přítomnosti SDS na polyakrylamidovém gelu, tzv. SDS-PAGE. Rozdělené proteiny mají na gelu tvar proužků. Pro srovnání slouží kmen *ΔpglA*, který je použit jako negativní kontrola glykosylace. V tomto kmeni mají sledované proteiny nižší molekulové hmotnosti než jejich glykosylované varianty.

Bakteriální kmeny byly kultivovány po dobu x určenou z kinetiky růstu, poté zlyzovány (metody 2.3.3, 2.3.4) a z celobuněčného lyzátu byla izolována membránová frakce podle metody 2.3.5. Pelety membrán jednotlivých kmenů byly rozpuštěny ve čtyřech různých solubilizačních pufrch s pH 7 či 8 obsahujících jeden ze dvou testovaných detergentů, Triton X-100 či DDM. Oba použité detergenty byly zvoleny na základě jejich účinnosti při *in vitro* glykosylacích v předešlých studiích (Gerber et al., 2013; Jervis et al., 2010; Kohda et al., 2007). Takto byly z každého bakteriálního kmene připraveny čtyři vzorky membránových frakcí – FSC200 v solubilizačním pufru 1A, 2A, 1B a 2B, *ΔpglA* v solubilizačním pufru 1A, 2A, 1B a 2B, *ΔpilA* v solubilizačním pufru 1A, 2A, 1B a 2B a *ΔdsbA* v solubilizačním pufru 1A, 2A, 1B a 2B. Koncentrace proteinů v připravených frakcích byla stanovena dle metody 2.3.7. Pro ověření funkčnosti glykosylačního aparátu v mutantních kmenech, které by měly sloužit jako zdroj OST, byly proteiny připravených membránových frakcí separovány pomocí SDS-PAGE (dle metody 2.3.8), přeneseny na membránu (metoda 2.3.9) a následně byly vybrané proteiny DsbA a PilA detekovány pomocí specifických protilátek (metoda 2.3.9).

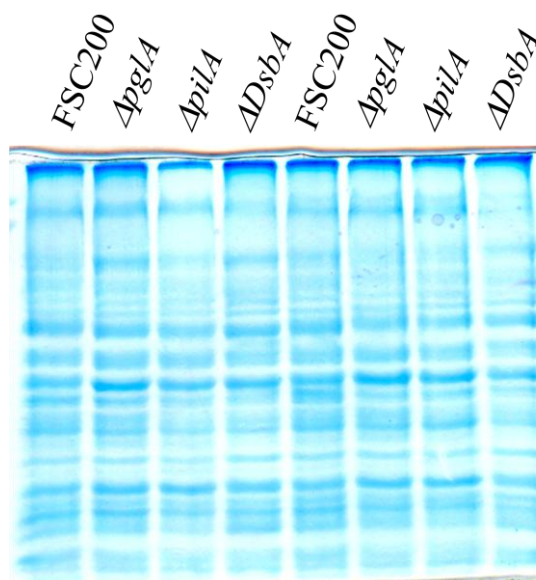
3.2.1 Ověření glykosylační aktivity kmene FSC200 *ΔdsbA*

Imunodetekce proteinu DsbA byla provedena v 30 μ g proteinů membránových frakcí všech použitých kmenů rozpuštěných v solubilizačních pufrch s Tritonem X-100 (obr. 5) či DDM (obr. 7). Protein DsbA má teoretickou molekulovou hmotnost 39 kDa. Jak je vidět z obrázků, v divokém kmeni FSC200 je protein DsbA plně glykosylován s molekulovou hmotností blízkou se 50 kDa. V mutantním kmeni *ΔpglA* není DsbA glykosylován, což je vidět z jeho nižší molekulové hmotnosti. DsbA pocházející z mutantního kmene *ΔpilA* má stejnou

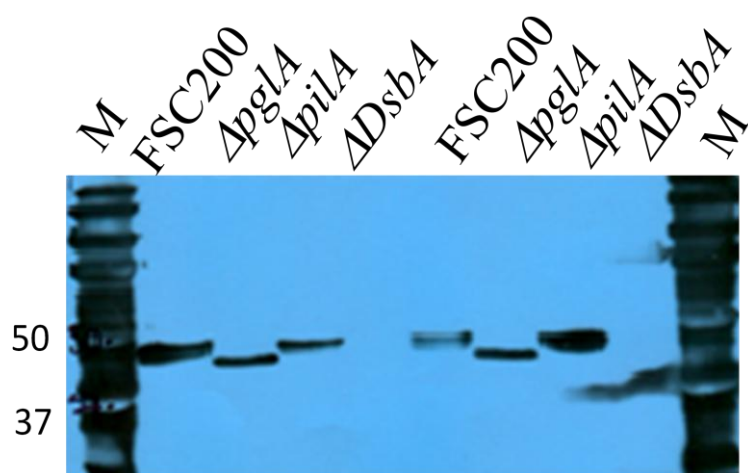
molekulovou hmotnost jako DsbA z divokého kmene a je tedy plně glykosylován. Z toho vyplývá, že glykosylační aktivita v kmeni FSC200 Δ dsbA je zachována, což svědčí o funkčnosti OST a lze tedy tento kmen použít jako zdroj OST pro *in vitro* glykosylaci. Uvedenými imunodetekcemi proteinu DsbA byl zároveň ověřen fenotyp použitého Δ dsbA mutantního kmene, ve kterém nebyl tento protein dle očekávání detekován. Jako důkaz stejných nanášek vzorků jednotlivých kmenů byly gely po WB obarveny modřením dle Jungbluta (viz metoda 2.3.14) jak je vidět na obrázcích č. 6 a 8. Zvláště významné to pak bylo právě pro kmen FSC200 Δ dsbA.



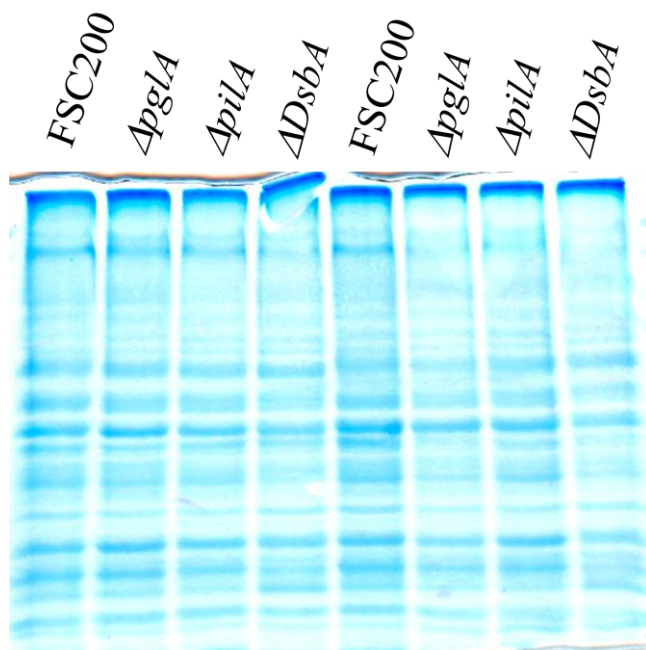
Obrázek 5: Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene Δ dsbA s detergentem Triton X-100. Levá část: solubilizační pufr 1A; pravá část: soubilizační pufr 2A. M = marker molekulových hmotností.



Obrázek 6: Obarvený gel po WB modřením dle Jungbluta jako důkaz stejných nanášek. Detergent Triton X-100.



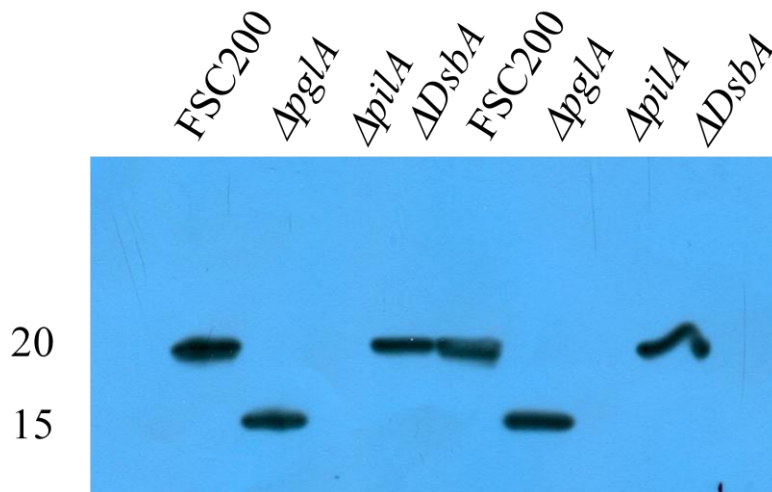
Obrázek 7: Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta dsbA$ s detergentem DDM. Levá část: solubilizační pufr 1B; pravá část: solubilizační pufr 2B.



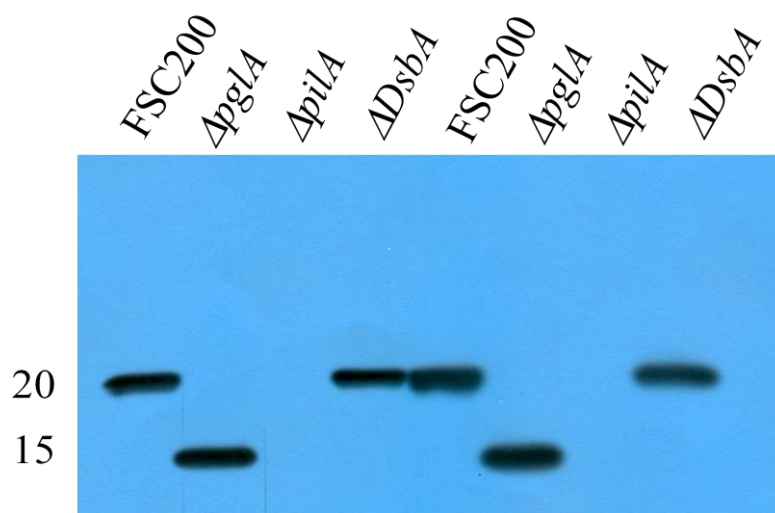
Obrázek 8: Obarvený gel po WB modřením dle Jungbluta jako důkaz stejných nanášek. Detergent DDM.

3.2.2 Ověření glykosylační aktivity kmene FSC200 $\Delta pilA$

Protein PilA byl detekován v 0,5 μ g proteinů membránových frakcí všech použitých kmenů rozpuštěných v solubilizačních puffech s Tritonem X-100 (obr. 9) či DDM (obr. 10). Teoretická molekulová hmotnost proteinu PilA je 14,6 kDa. Na obrázcích je viditelné, že v divokém kmeni FSC200 je protein PilA plně glykosylován, což se projevilo na jeho molekulové hmotnosti, která je cca 20 kDa. V mutantním kmeni $\Delta pilA$ není protein PilA glykosylován, a má tudíž nižší molekulovou hmotnost. PilA má stejnou molekulovou hmotnost jak v divokém kmeni FSC200, tak v mutantním kmeni $\Delta dsbA$, v tomto mutantním kmeni je tedy plně glykosylován. Z toho plyne, že glykosylační aktivita v kmeni FSC200 $\Delta pilA$ je zachována, OST je funkční a tento kmen lze použít jako zdroj OST pro *in vitro* glykosylaci. Tak jako u proteinu DsbA byl u proteinu PilA provedenými imunodetekcemi ověřen fenotyp použitého $\Delta pilA$ mutantního kmene. PilA zde opět nebyl, dle očekávání, detekován. Kontrola nanášeného množství vzorků na oba gely nebyla z důvodu nízkých nanášek, které jsou na hranici detekčního limitu modření, dobře viditelná (obrázek neuveden).



Obrázek 9: Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta pilA$ s detergentem Triton X-100. Levá část: solubilizační pufr 1A; pravá část: solubilizační pufr 2A.

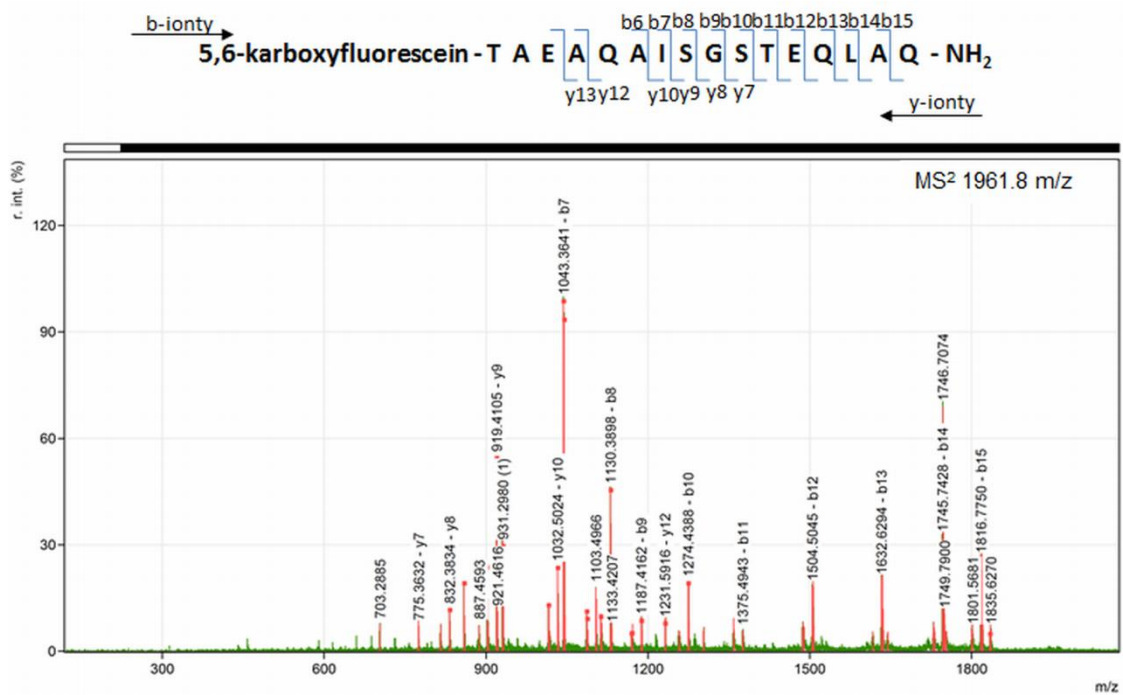


Obrázek 10: Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene *Δpila* s detergentem DDM. Levá část: solubilizační pufr 1B; pravá část: solubilizační pufr 2B.

3.3 Akceptorová molekula – fluorescenčně značený peptid

DsbA protein je *in vivo* glykosylován na dvou glykosylačních místech – serinu 38, který je součástí N-terminálního glykopeptidu, a serinu 355, který je součástí C-terminálního glykopeptidu. Jako akceptorová molekula pro *in vitro* glykosylaci byl v našem experimentu zvolen peptid stejné aminokyselinové sekvence jako je část C-terminálního glykopeptidu DsbA proteinu kmene FSC200. Aminokyselinová sekvence peptidu je TAEAQAISSGSTEQLAQ a v sekvenci je glykosylačním místem serin 8 (zvýrazněn tučně). Uvedený peptid byl syntetizován na zakázku firmou JPT. Pro vizualizaci peptidu na gelu byla k peptidu připojena fluorescenční značka. Fluorescenční značka se nazývá 5,6-karboxyfluorescein a je připojena na N-terminálním konci peptidu. C-terminální konec je amid, proto je výsledný název peptidu 5,6-karboxyfluorescein- TAEAQAISGSTEQLAQ-NH₂. Molekulová hmotnost tohoto peptidu je 1961,99 g/mol. V předešlé studii bylo použito fluorescenční barvivo karboxytetrametylrodamin (TAMRA) připojené na N-terminální konec peptidu (Kohda et al., 2007). V další studii bylo použito fluorescenční barvivo 6-karboxyfluorescein vázané na N-terminální konec peptidu s výsledným názvem peptid FAM-ADQNATA (Jervis et al., 2010).

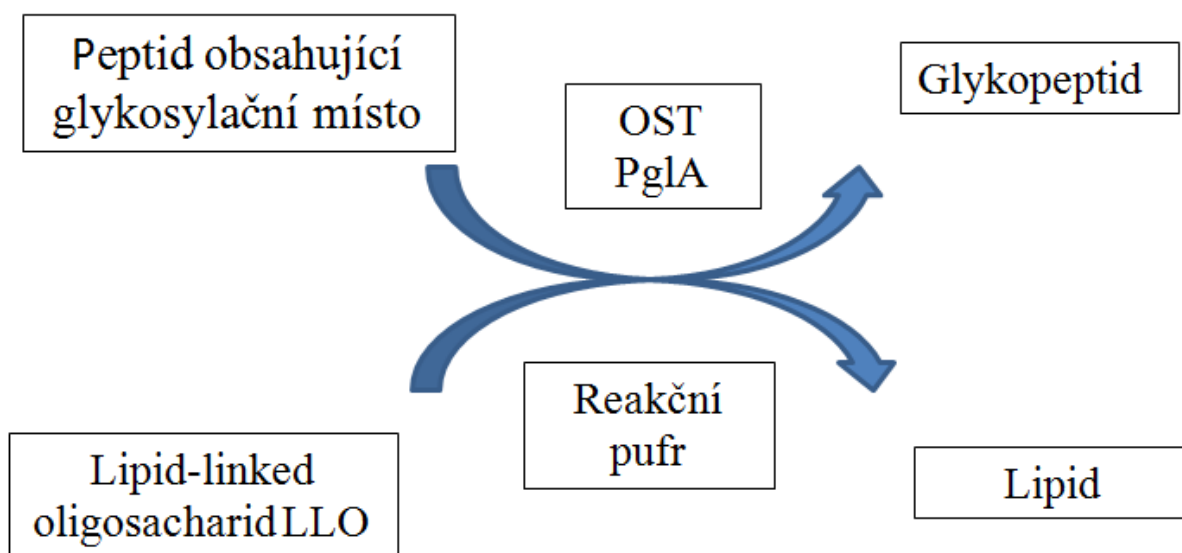
Sekvence fluorescenčního peptidu byla ověřena na Katedře molekulární patologie a biologie pomocí hmotnostní spektrometrie na přístroji MALDI-TOF/TOF. V MS módu byl změřen iont o molekulové hmotnosti 1961.8 m/z, což odpovídá teoretické molekulové hmotnosti syntetizovaného peptidu a tento iont byl dále fragmentován. Změřené fragmentační spektrum bylo analyzováno pomocí programu mMass (Strohalm et al., 2008). Na obrázku č. 11 je uvedeno anotované fragmentační spektrum, které potvrdilo aminokyselinovou sekvenci peptidu.



Obrázek 11: Tandemové hmotnostní spektrum fluorescenčního peptidu o hmotě 1961 g/mol. Rozdíly hmot (m/z) mezi jednotlivými píky určují aminokyselinovou sekvenci peptidu.

3.4 *In vitro* glykosylace peptidu

Nezbytnou součástí pro provedení *in vitro* glykosylace je enzym OST, který katalyzuje přenos glykanu z lipidového nosiče na cílový protein/peptid. K cílovému proteinu/peptidu jsou glykany připojeny pouze tehdy, obsahuje-li protein/peptid glykosylační místo AK, které může být součástí krátké aminokyselinové sekvence zvané glykosylační motiv. V naší studii byla tato reakce prováděna v připravené membránové frakci jako zdroje OST (Balonová et al., 2010; Balonová et al., 2012; Egge-Jacobsen et al., 2011).



Obrázek 12: Princip metody *in vitro* glykosylace peptidu (Kohda et al., 2007).

Jak již bylo řečeno, glykosylace je připevňování glykanů na proteiny, popřípadě peptidy. V naší studii byla prováděna *in vitro*, čili ve zkumavce v podmínkách laboratoře. Samotná OST reakce byla provedena podle postupu č. 2.3.10, který byl využit v předešlých studiích (Jervis et al., 2010; Kohda et al., 2007). Průběh *in vitro* glykosylační reakce je schematicky znázorněn na obrázku č. 12. Jak je vidět, pro uskutečnění této enzymatické reakce bylo použito několik reakčních komponent – fluorescenčně značený peptid jako akceptorová molekula, OST v podobě bakteriální membránové frakce a případně přídavek LLO. Dle Jervis et al. (2010) byly zvoleny množství jednotlivých reakčních komponent. V naší studii pak 5,6-karboxyfluorescein peptid byl použit v množství 120 pmol, což odpovídá množství 3 µl 30 µmol peptidu (se sekvencí ADQNATA) v uvedené studii. Stejně

tak bylo použito 26 μ l membránové frakce obsahující OST jako výchozí testované množství. Jako zdroj OST byly testovány tři membránové frakce různých bakteriálních kmenů. Jako první membránová frakce OST1 vzniklá smícháním FSC200 kmene s FSC200/ Δ *pglA* mutantním kmenem v objemovém poměru 1:1. OST2 byla membránová frakce z mutantního kmene Δ *dsbA*. Poslední použitou membránovou frakcí s pracovním názvem OST3 tvořil mutantní kmen Δ *pilA*. Pro zajištění rozpustnosti OST byly vzorky rozpuštěny v pufrech obsahujících dva různé detergenty – Triton X-100 a DDM. Úspěšnost každé enzymatické reakce závisí na zvoleném reakčním prostředí. Proto byly v naší studii vzorky OST rozpuštěny v solubilizačních pufrech o dvou různých hodnotách pH, 7 a 8. Enzymatické reakce vyžadují přítomnost katalyzátorů, kterými často bývají dvojmocné ionty, jako je hořčík, vápník či magnézium. Z tohoto důvodu byly v této práci zvoleny dva reakční pufrů obsahující různá množství těchto iontů. Složení solubilizačních a reakčních pufrů jsou uvedena v kapitole 2.3.5. *In vitro* glykosylace dále probíhají za různých teplotních podmínek, která je často dána růstovými podmínkami použitého organismu. Například pro OST izolované z kvasinek je optimální teplota pro glykosylaci 37°C. Naproti tomu úspěšná glykosylace u termofilní bakterie *Pyrococcus furiosus* je dosažena při zvýšené teplotě 65°C (Kohda et al., 2007). Vzhledem k předešlým studiím zabývajícím se *in vitro* glykosylacemi v Gram-negativních bakteriích (Feldman et al., 2005; Gerber et al., 2013; Jervis et al., 2010; Kowarik et al., 2006) byla zvolena teplota 30°C a jako druhá byla vybrána teplota 37°C, při níž *F. tularensis* vykazuje optimální růst.

3.4.1 *In vitro* glykosylace bez přídavku LLO

Jelikož jsou LLO obsaženy v membránách každého kmene, byla *in vitro* glykosylace provedena nejprve s využitím membránových frakcí jako zdroje LLO (Jervis et al., 2010; Kohda et al., 2007). Díky tomu, se do reakce přidávaly jen dvě komponenty – OST a 5,6-karboxyfluorescein peptid. Peptid byl vždy smíchán s reakčním pufrem 1 nebo 2 a na každou reakci ho bylo používáno stejné množství - 120 pmol. Všechny OST byly používány v kombinacích obou detergentů a všech solubilizačních pufrů a do reakce byly přidávány ve třech různých objemech – 26 μ l, 52 μ l a 100 μ l. Inkubace reakční směsi pak probíhala 18 hodin buď za teploty 30°C nebo 37°C. U každé OST byla tedy provedena reakce několikrát vždy za různých podmínek (jiný detergent, jiné pH, jiný objem, jiný reakční pufr s různým obsahem dvojmocných iontů a jiná teplota) – OST1, 2 nebo 3 v detergentu Triton X-100 nebo

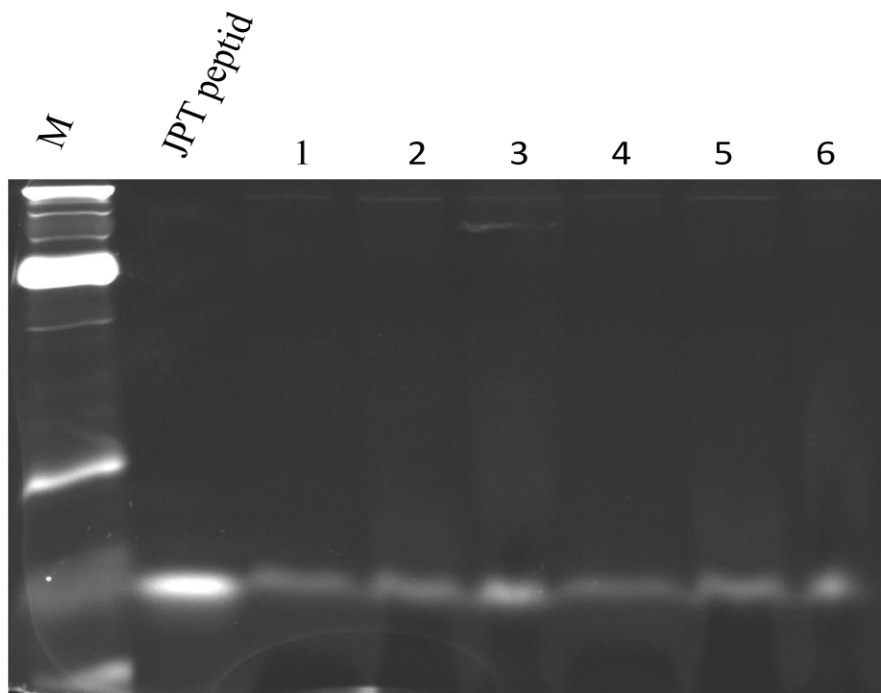
DDM v daném množství (viz výše), se 4 μ l peptidu (60 ng/ μ l) v reakčním pufru 1 nebo 2, v solubilizačním pufru o jiném pH, při teplotě 30°C nebo 37° a době inkubace 18 hodin.

3.4.1.1 Izolace peptidu/glykopeptidu ze směsi proteinů po *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO

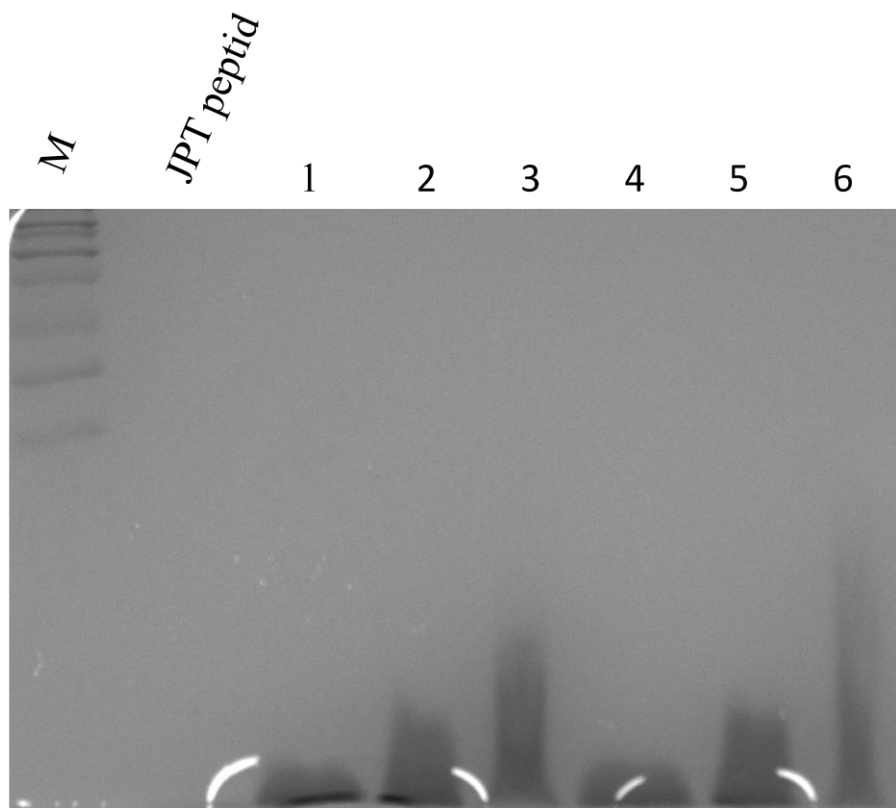
Stejně jako u glykosylace proteinů je analýza glykosylace peptidů založena na rozdílné hmotnosti nemodifikovaného peptidu a odpovídajícího glykopeptidu. Lze tedy použít separaci peptidů dle jejich molekulové hmotnosti již zmíněnou elektroforézou. Na rozdíl od proteinů, jejichž hmotnosti se pohybují v rozmezí 10 až 250 kDa, jsou peptidy podstatně menší molekuly o hmotnosti pod 10 kDa, pro které se separace na SDS-PAGE nedá použít. Pro separaci peptidu byla v minulých letech vyvinuta tricinová SDS-PAGE (Schägger, 2006). V publikované práci (Jervis et al., 2010) byl vzorek po *in vitro* reakci rovnou nanesen na gel v polovičním množství. V naší studii používáme různá objemová množství vzorků. U vzorků s největším objemem je pak koncentrace peptidu v důsledku zředění nejnižší, a proto bylo nutné vzorky upravit tak, aby byly zajištěny stejné nanášky peptidu na gel. Nejjednodušší metodou pro tyto účely je precipitace proteinů, při které po přídavku precipitačního činidla dojde k vysrážení proteinů z roztoku, a vzniklé precipitáty jsou následně rozpuštěny v požadovaném objemu. Pro posouzení vhodnosti precipitace bylo provedeno 8 různých enzymatických reakcí dle tabulky č. 9. Vzorky v reakčním pufru 1 po proběhlé 18-ti hodinové reakci při 30 °C byly posléze precipitovány acetonem. Precipitáty byly následně rozpuštěny ve stejných objemech v Tricinovém vzorkovém pufru a rozděleny pomocí Tricinové elektroforézy (viz kapitola 2.3.13). Výsledky enzymových reakcí na gelu byly detekovány pod UV transiluminátorem při vlnové délce excitace 494 nm a emise 520 nm, při které absorbuje 5,6-karboxyfluorescein (obrázek 13).

Tabulka 9: Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO.

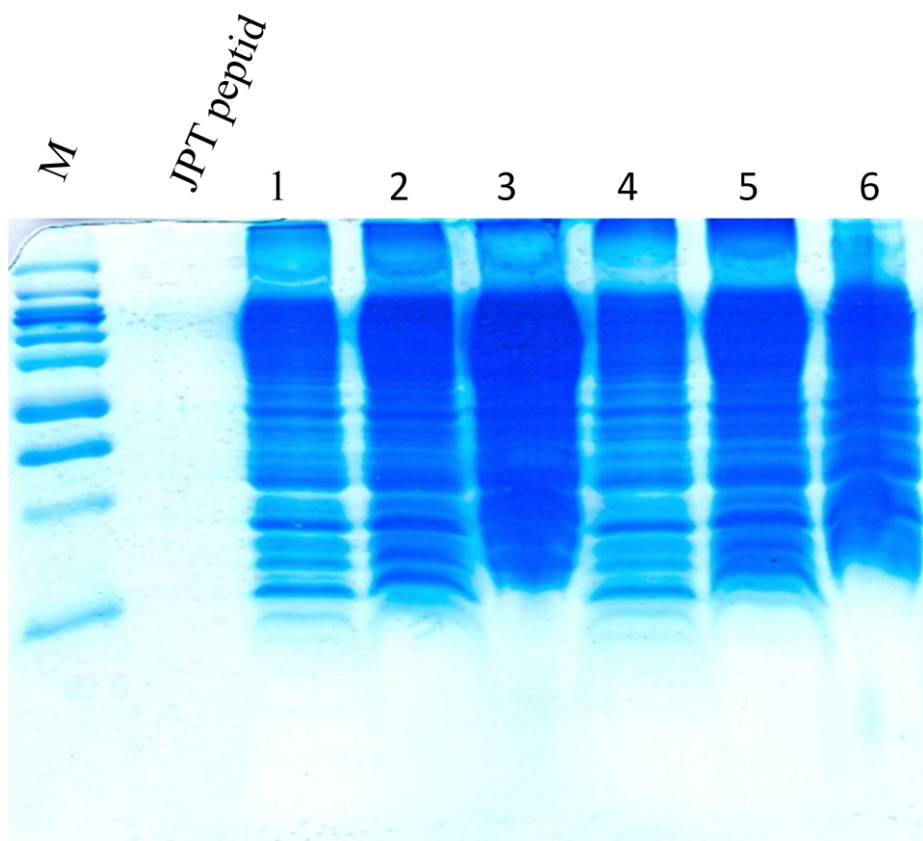
Číslo vzorku	OST	Objem [μ l]	Detergent	Solubilizační pufr
1	OST1	26	TX-100	1A
2	OST1	52	TX-100	1A
3	OST1	100	TX-100	1A
4	OST1	26	DDM	1B
5	OST1	52	DDM	1B
6	OST1	100	DDM	1B



Obrázek 13: Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin.



Obrázek 14: Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin ve vizualizaci bez UV.



Obrázek 15: Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin – obarvený gel modřením dle Jungbluta.

Obrázek gelu byl dále zaznamenán bez použití UV při vlnové délce ve viditelné oblasti (obrázek 14). Za těchto podmínek je možné pozorovat pouze barvičku Coomassie blue G-250. Jak je z obrázku vidět, barvička Coomassie blue G-250 tvoří šmouhy, což je pravděpodobně dáno přítomností velkého množství proteinů membránové frakce. Zatímco u samotného JPT peptidu a vzorků, kde bylo použito 26 μl OST1, se barvička od komplexu peptidů/proteinů s SDS oddělila, u vzorků s obsahem 52 a zvláště pak 100 μl OST1 zůstala barvička v tomto komplexu navázána. To se projevilo deformací, respektive zúžením proužku detekovaného fluorescenčního peptidu a následným poklesem jeho intenzity fluorescence. Gel po UV detekci byl následně dobarven modřením dle Jungbluta (obrázek 15), kde je rovněž možné pozorovat špatnou separaci proteinů u vzorků s vyšším obsahem OST. Z výsledků vyplývá, že samotná precipitace pro úpravu vzorků nestačí. Díky tomuto zjištění bylo přistoupeno k experimentu s jinými postupy.

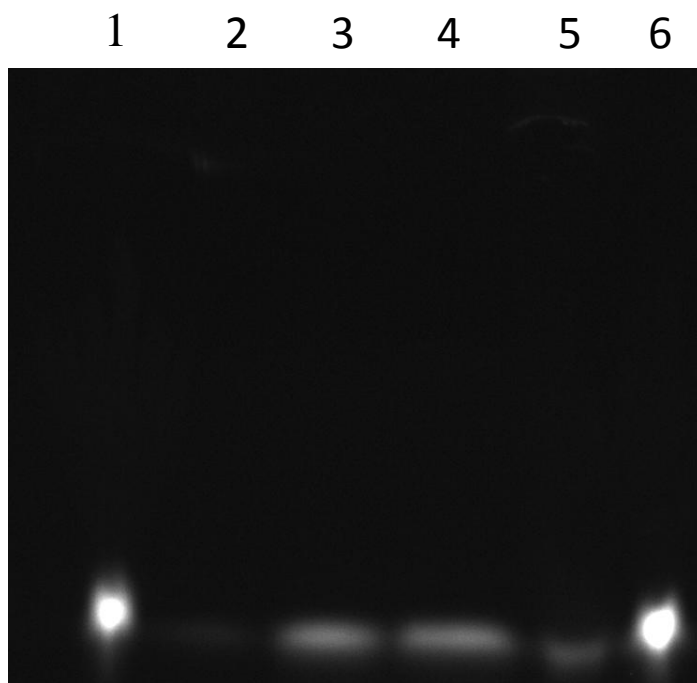
Jako alternativa k precipitaci proteinů byla zvolena chromatografie na oktadecylové reverzní fázi C18 (kapitola 2.3.11). Tato fáze zachytí jak proteiny, tak peptidy, zatímco soli jsou odstraněny. Peptidy jsou z C18 fáze v následném kroku eluovány za podmínek, při kterých většina proteinů zůstává stále zachycena. Dojde tak k odsolení vzorku a zároveň částečnému odstranění proteinů. Další metodou byla kationtově výměnná chromatografie na polysulfoetyl A fázi (SCX). Na této fázi se při použití pH ~ 3, kdy jsou peptidy/proteiny pozitivně nabitě, přednostně zachytí vícenásobně kladně nabitě proteiny, zatímco krátké, méně pozitivně nabitě peptidy jsou vázány slabě nebo vůbec. Fluorescenční peptid TAEAQAISGSTEQLAQ použitý v naší studii je při pH ~ 3 neutrální, neboť obsahuje kyselé a naopak neobsahuje žádné bazické aminokyseliny. Proto se na SCX fázi nezachytí a je tak izolován od zbytku proteinů ve vzorku (kapitola 2.3.12). Pro zvolení optimální metody zpracování vzorku po enzymové reakci bylo provedeno 6 identických modelových reakcí se 120 pmol fluorescenčního peptidu rozpuštěného v 10x reakčním pufru 1 a 100 µl OST membránové frakce rozpuštěné v solubilizačním pufru 1A. Enzymové reakce byly inkubovány při 30°C po dobu 18 hodin. Vzorky byly následně zpracovány různými postupy viz tabulka 10, za použití metod uvedených v kapitolách 2.3.10, 2.3.11, 2.3.12 a 2.3.13.

Tabulka 10: Různé postupy zpracování vzorků po in vitro glykosylaci bez přídavku LLO.

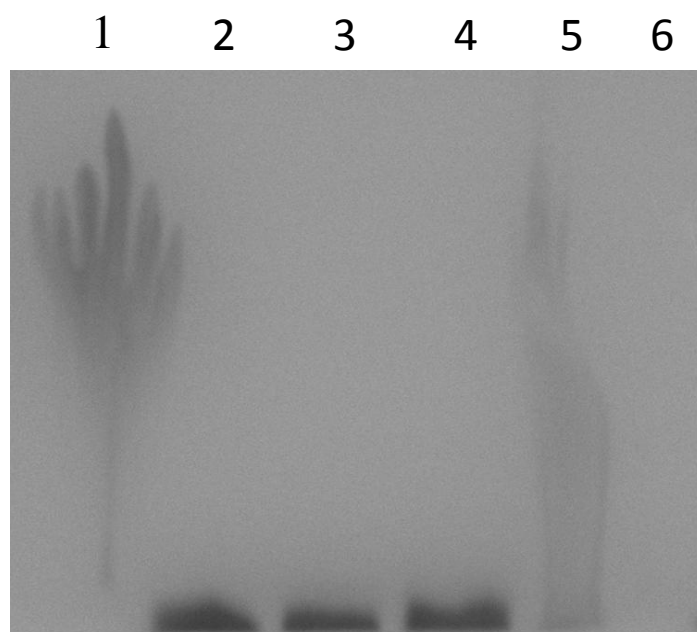
Vzorek číslo	Zvolený postup zpracování vzorku			
1	C18	SCX	Tricine-SDS-PAGE	
2	C18	SCX	Precipitace	Tricine-SDS-PAGE
3	Precipitace	C18	SCX	Tricine-SDS-PAGE
4	Precipitace	SCX	Tricine-SDS-PAGE	
5	Precipitace	Tricine-SDS-PAGE		
6	C 18	SCX	Tricine-SDS-PAGE	

Vzorky 1 a 6 byly zpracovány totožným způsobem s tím rozdílem, že vzorek 6 byl na gel nanesen ve vzorkovém pufru bez barvičky Coomassie blue G-250. Ukázalo se, že barvička separaci peptidu na gelu neovlivňuje, protože došlo ke stejnému efektu, jako u vzorku 1, tedy zúžení detekovaného proužku fluorescenčního peptidu (obrázek 16). Separace peptidu na gelu vypadala nejlépe při použití postupu 3 a 4, kde nedošlo ke zvlnění proužků. Na stejném gelu detekovaném ve viditelné oblasti je vidět, že se barvička od peptidu během Tricine-SDS-PAGE oddělila. V obou případech byly vzorky precipitovány a poté byl peptid separován od proteinů na SCX fázi. V postupu 4 byl vynechán krok odsolení přes C18 reverzní fázi, protože precipitací se kromě detergentu a lipidů odstraní i soli. Vzorek z bodu 5

byl pouze precipitován a na gelu bez použití UV (obrázek 17) je vidět to, co bylo pozorováno již dříve u precipitovaných vzorků - šmouha barvičky Coomassie blue G-250 a následné snížení intenzity detekovaného fluorescenčního peptidu na obrázku č. 16.



Obrázek 16: Zvolení optimální metody zpracování vzorku po proběhlé enzymové reakci.



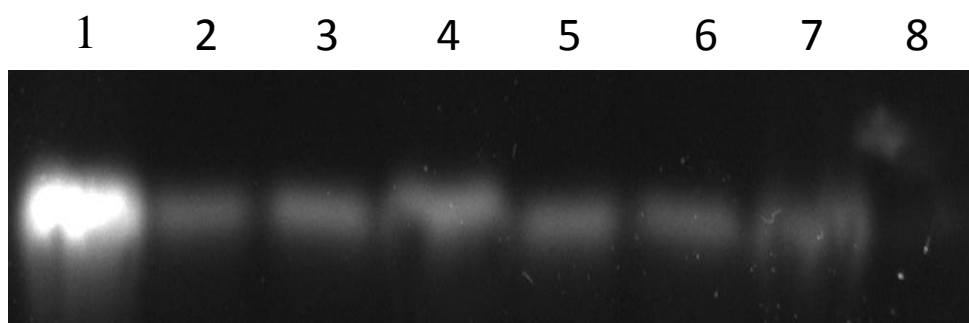
Obrázek 17: Zvolení optimální metody zpracování vzorku po proběhlé enzymové reakci – vizualizace bez UV.

Z výsledků vzorků 1 a 6 vyplývá, že precipitace vzorku je pro dobrou separaci peptidu na gelu nutná, kvůli odstranění lipidů a solí. Zároveň je ale žádoucí odstranit nebo alespoň snížit množství proteinů. Zařazení precipitačního kroku za oba chromatografické postupy se ukázalo jako nevhodné (postup č. 2), protože peptid v daném vzorku nebyl vůbec nedetekován. Z tohoto hlediska byl zvolen postup vzorek nejdříve precipitovat a poté provést separaci peptidu od proteinů na SCX bez nutnosti předchozího odsolení na C18 reverzní fázi. Pro další práci byl tedy zvolen postup č. 4.

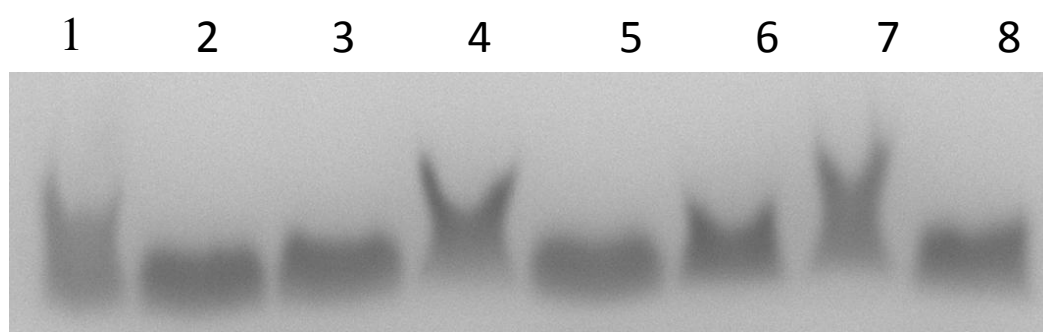
Z odsolených vzorků byl tedy 5,6-karboxyfluorescein peptid izolován pomocí iontové výměnné chromatografie SCX. Peptid byl vypláchnut a zbylé proteiny zůstaly zachyceny na SCX fázi. Frakce byla odpařena na vakuové odparce, ke vzorkům byl přidán vzorkový pufr, vše bylo povařeno 5 minut při 95°C a nakonec byly vzorky nanесeny na gel a proběhla Mini 1D Tricin-SDS-PAGE podle postupu č. blabla (Jervis et al., 2010; Schägger, 2006). Poté byl fluorescenční peptid vizualizován pod UV transiluminátorem, při vlnové délce excitace 494 nm a emise 520 nm. Následně byly gely obarveny modřením dle Jungbluta (viz metoda 2.3.14). Na reprezentativním gelu (obrázek 18) jsou vidět výsledky sedmi vybraných *in vitro* glykosylací, přičemž vzorek 1 znázorňuje samostatný JPT-peptid. Všechny ostatní vzorky byly rozpuštěny v reakčním pufru 1 a inkubace probíhala za teploty 37°C. Ostatní zpracování vzorků je uvedeno v tabulce č. 11.

Tabulka 11: Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO.

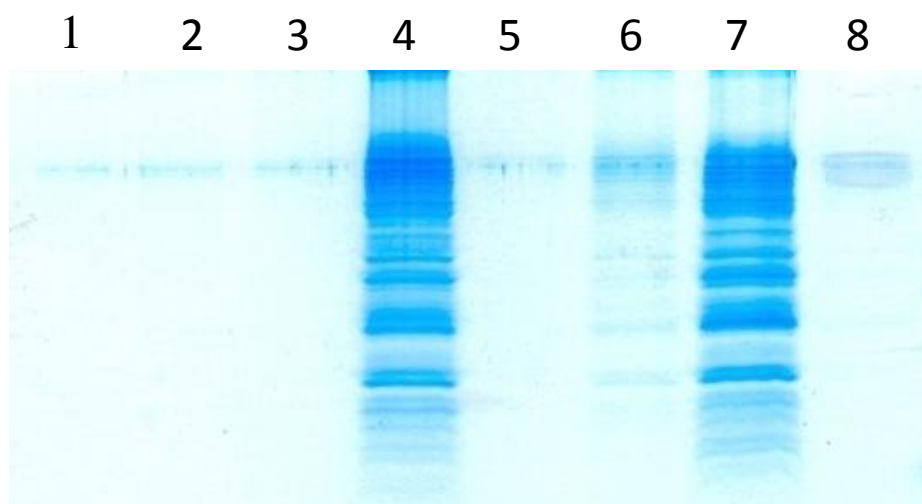
Číslo vzorku	OST	Objem [μl]	Detergent	Solubilizační pufr
2	OST3	26	TX-100	1A
3	OST3	52	TX-100	1A
4	OST3	100	TX-100	1A
5	OST3	26	DDM	1B
6	OST3	52	DDM	1B
7	OST3	100	DDM	1B
8	OST3	26	TX-100	2A



Obrázek 18: In vitro glykosylace bez přídavku LLO.



Obrázek 19: In vitro glykosylace bez přídavku LLO – vizualizace bez UV.

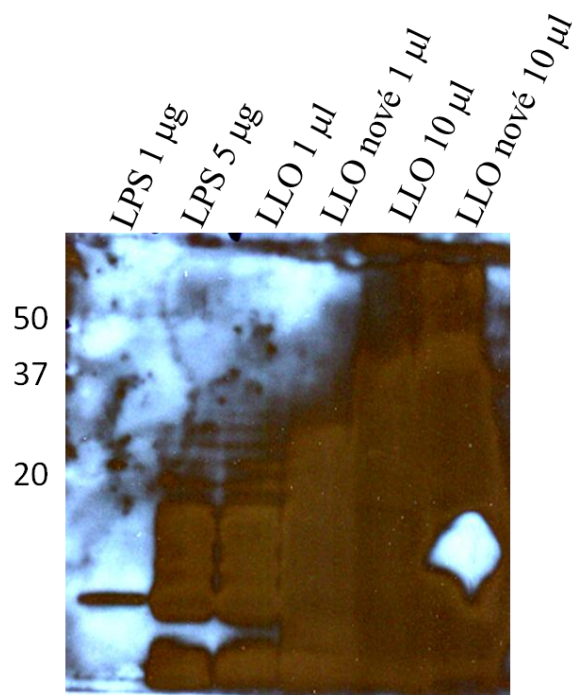


Obrázek 20: In vitro glykosylace bez přídavku LLO - obarvený gel modřením dle Jungbluta. Lze vidět úspěšnost odstranění proteinů pomocí SCX ze vzorků obsahujících 26 a 52 μ l membránové frakce a značné snížení množství proteinů při použití 100 μ l membránové frakce.

In vitro glykosylace za těchto podmínek nebyla v naší studii prokázána, jelikož nevznikl žádný produkt. Byl by viditelný jako proužek o vyšší molekulové hmotnosti. Negativní výsledek byl zaznamenán rovněž u dalších 131 *in vitro* glykosylačních reakcí (obrázky neuvedeny). Proto bylo přistoupeno na reakce s přidáním LLO, kde se předpokládalo, že pro proběhnutí reakce je možná nezbytné zvýšit objem dárcovského substrátu.

3.4.2 *In vitro* glykosylace s přidavkem LLO

Všechny membránové frakce z kultivovaných kmenů obsahují LLO, po přidání extrahovaných LLO z kmene FSC200 lze zvýšit jejich množství a tím zvýšit i potencionální možnost glykosylace. Ve studii Kohda et al. (2007) autoři testovali, zda dojde ke glykosylaci peptidu pomocí OST izolované z kvasinek. Produkt vznikl pouze v případě, když do reakce byly přidány LLO. Vliv přidavku exogenních LLO na vznik glykosylovaného produktu byl tedy sledován v našem dalším experimentu. LLO byly připraveny obdobně jako v předchozích studiích pomocí metody xy z divokého kmene FSC200 (Ielpi, Couso, Dankert, 1993; Kohda et al., 2007; Musumeci, Ielmini, Feldman, 2013). K ověření úspěšné izolace LLO z membránové frakce FSC200 byla nejprve provedena imunodetekce LPS, jakožto hlavního zástupce LLO, pomocí metody 2.3.6. LPS vykazoval na vyvolaném snímku bouřlivou reakci s anti-LPS protilátkou (obrázek 21).



Obrázek 21: Imunodetekce LPS jako hlavního zástupce LLO pomocí anti-LPS protilátky. Jako pozitivní kontrola byl použit LPS izolovaný z *F. tularensis* kmene LVS.

Z provedené imunodetekce vyplynulo, že LLO byly úspěšně vyizolovány. Frakci tedy bylo možno použít pro *in vitro* glykosylaci v dalších experimentech. V následujících reakcích byly LLO přidávány do reakční směsi jako třetí reakční komponenta a to v objemu 10 µl.

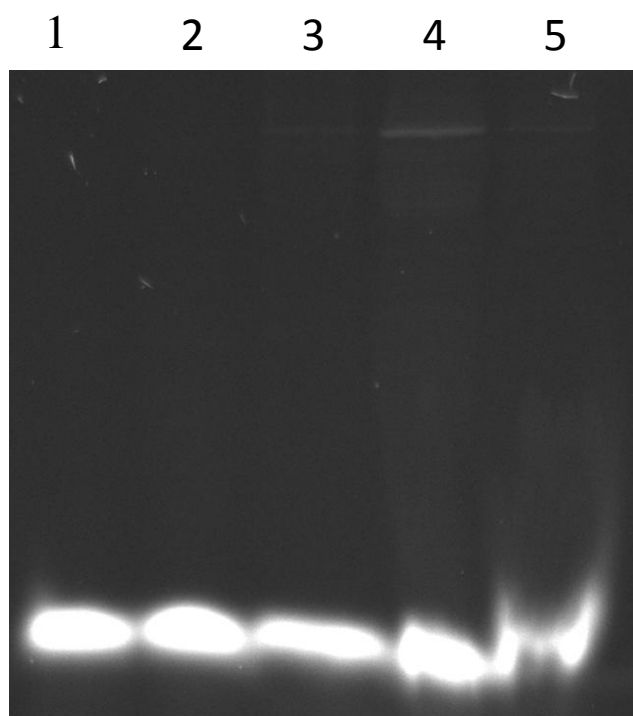
3.4.2.1 Izolace peptidu/glykopeptidu ze směsi proteinů po *in vitro* glykosylaci s přidavkem LLO

Po přidání LLO ke vzorkům se zvýšila koncentrace lipidů, proto byl před iontově výměnnou chromatografií SCX zařazen ještě další krok. A to přečištění pomocí reverzní fáze C18. Tato varianta vyplynula z následujícího experimentu, kde bylo použito 5 modelových vzorků s různým zpracováním (tabulka 12).

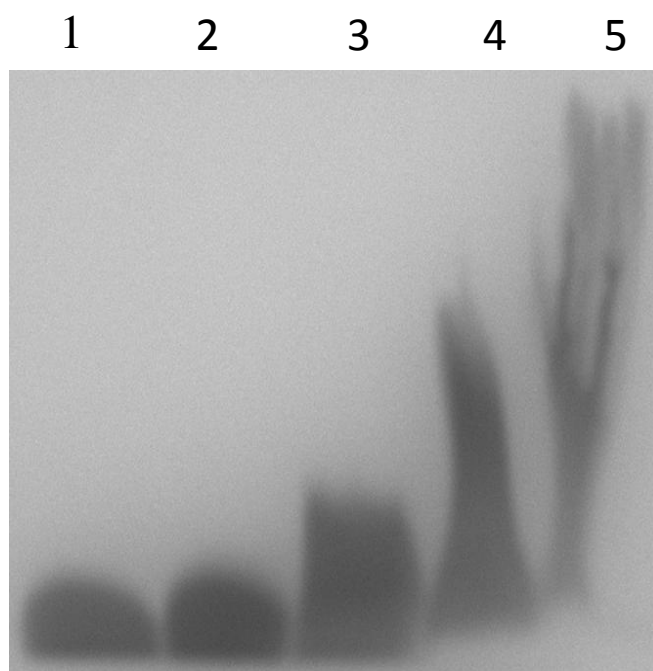
Tabulka 12: Různé postupy zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci s přidavkem LLO.

Vzorek číslo	Zvolený postup zpracování vzorku			
1	Precipitace	C18	SCX	Tricine-SDS-PAGE
2	Precipitace	C18	Tricine-SDS-PAGE	
3	Precipitace	SCX	Tricine-SDS-PAGE	
4	Precipitace	Tricine-SDS-PAGE		
5	Bez precipitace	Tricine-SDS-PAGE		

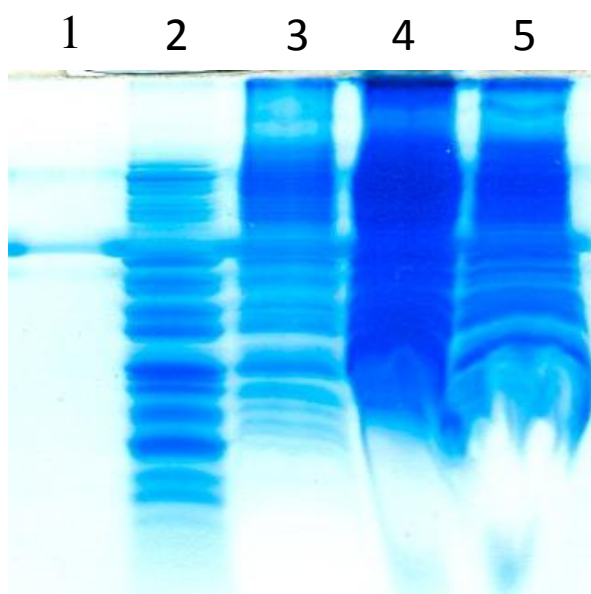
Enzymové reakce byly provedeny smícháním 120 pmol fluorescenčního peptidu, 52 μ l OST membránové frakce a 10 μ l LLO a inkubací při 30°C po dobu 18 hod. Po enzymové reakci byly vzorky 1, 2, 3 a 4 nejprve odsoleny pomocí precipitace. Vzorek 5 byl analyzován bez předchozího zpracování, a to v nanášeném množství 27 μ l, které byly smíchány s 9 μ l 4x Tricin vzorkového pufru a poté byla provedena Tricine-SDS-PAGE. Tato varianta, tzn. obdoba postupu použitého v publikaci Jervis et al. (2010) s polovičním množstvím vzorku, byla hned vyloučena, jelikož viditelný proužek byl velice rozmazaný. Vzorek 4 vypadal po precipitaci o něco lépe, než bez ní, avšak proužek byl stále rozmazaný. U třetího vzorku byla použita SCX a proužek byl rovný, ale zúžený. Vzorky 1 a 2 byly odsoleny pomocí C18 reverzní fáze, přičemž u vzorku 1 byla následně použita ještě SCX. Na gelu se tyto dvě varianty zdály být jako nejlepší.



Obrázek 22: Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přidavkem LLO.



Obrázek 23: Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přidavkem LLO – vizualizace bez UV.



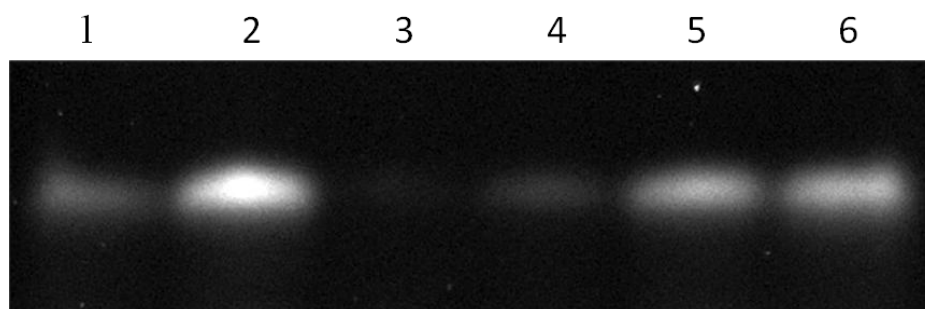
Obrázek 24: Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přidavkem LLO – obarvený gel modřením dle Jungbluta.

Pro následné zpracování vzorků byl vybrán postup 1, ve kterém byly vzorky nejprve vyprecipitovány, poté byla provedena C18 reverzní fáze a nakonec iontově výměnná chromatografie SCX. Jak je vidět z modřeného gelu (obrázek 24), zvolený postup č. 1 odstranil při použití 52 μ l OST membránové frakce všechny proteiny.

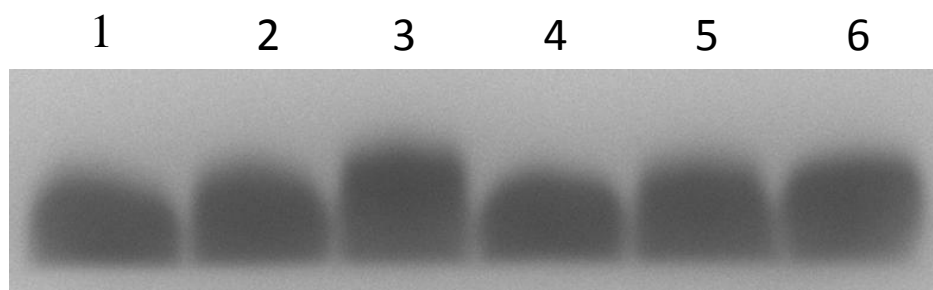
V následných analýzách byly vzorky po proběhlé enzymatické reakci tedy zpracovávány postupem č. 1. V tabulce č. 13 je uvedeno složení reakčních směsí šesti vybraných *in vitro* glykosylací, do kterých bylo dále přidáno 10 μ l LLO. Všechny vzorky byly v reakčním pufru 1 a inkubace probíhala při teplotě 30°C. Na obrázku č. 25 je pak vidět vizualizace vzniklých proužků pod UV.

Tabulka 13: Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci s přidavkem LLO.

Číslo vzorku	OST	Detergent	Solubilizační pufr
1	OST2	TX-100	1A
2	OST2	DDM	1B
3	OST2	TX-100	2A
4	OST2	DDM	2B
5	OST3	TX-100	1A
6	OST3	DDM	1B



Obrázek 25: *In vitro* glykosylace s přidavkem LLO.

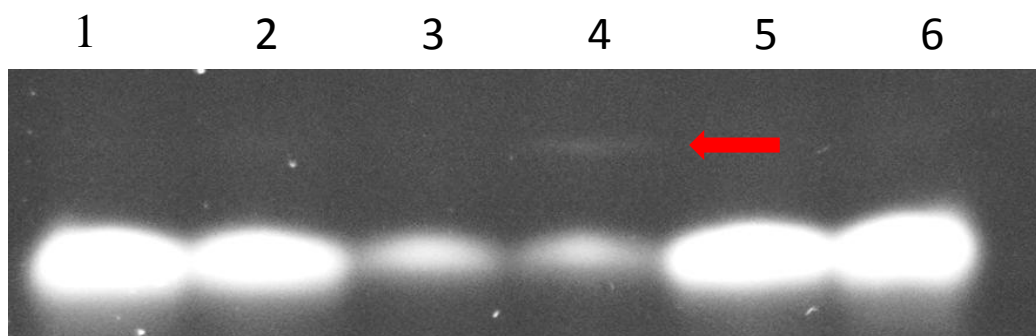


Obrázek 26: *In vitro* glykosylace s přidavkem LLO – vizualizace bez UV.

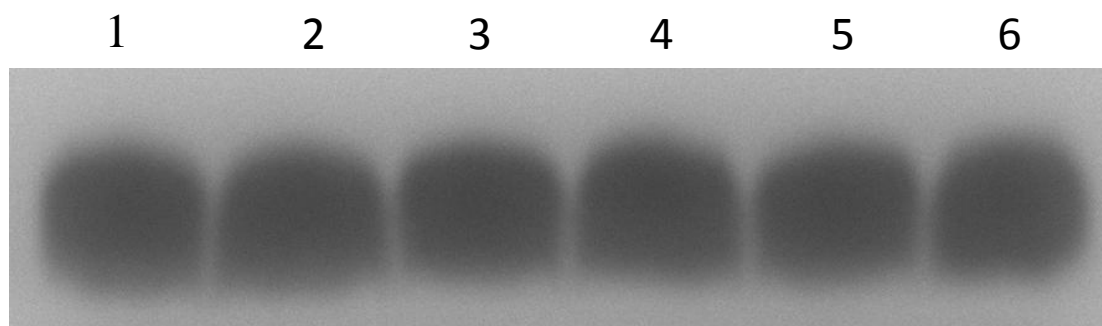
Při této kombinaci reakčních komponent a dalších, zde neuvedených reakcích, výsledný produkt nevznikl. Pozitivní výsledek však byl zaznamenán u další kombinace reakčních komponent (viz tabulka 14). Na obrázku č. 27 je nad proužkem ve vzorku 4 nepatrně viditelný další proužek o vyšší molekulové hmotnosti (viz šipky). Pravděpodobně se jedná o žádaný produkt – glykosylovaný peptid.

Tabulka 14: Zpracování dalších vzorků pro in vitro glykosylaci s přídavkem LLO.

Číslo vzorku	OST	Detergent	Reakční pufr	Solubilizační pufr	Teplota [°C]
1	OST3	TX-100	2	1A	30
2	OST3	DDM	2	1B	30
3	OST3	TX-100	2	2A	30
4	OST3	DDM	2	2B	30
5	OST2	TX-100	1	1A	37
6	OST2	DDM	1	37	



Obrázek 27: In vitro glykosylace s přídavkem LLO. Červená šipka ukazuje na pravděpodobně vzniklý glykosylovaný peptid.

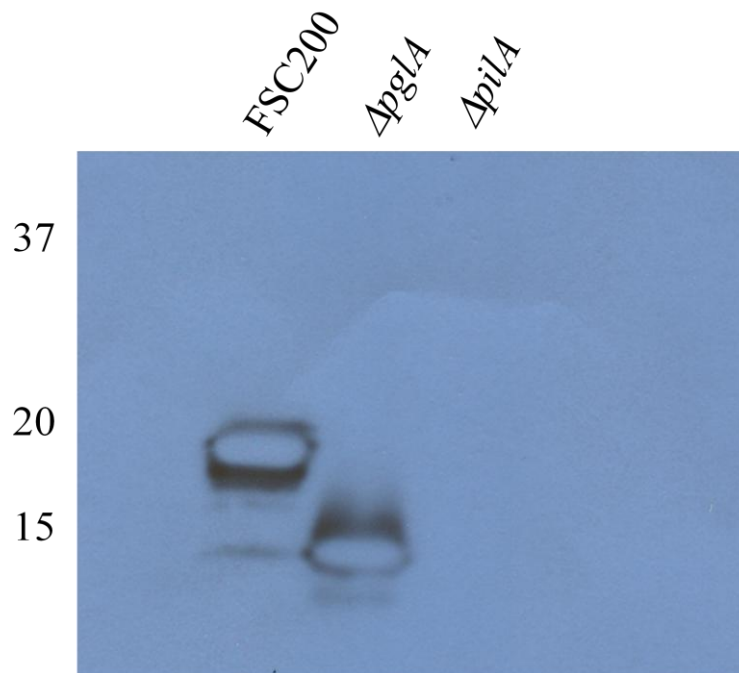


Obrázek 28: In vitro glykosylace s přídavkem LLO – vizualizace bez UV.

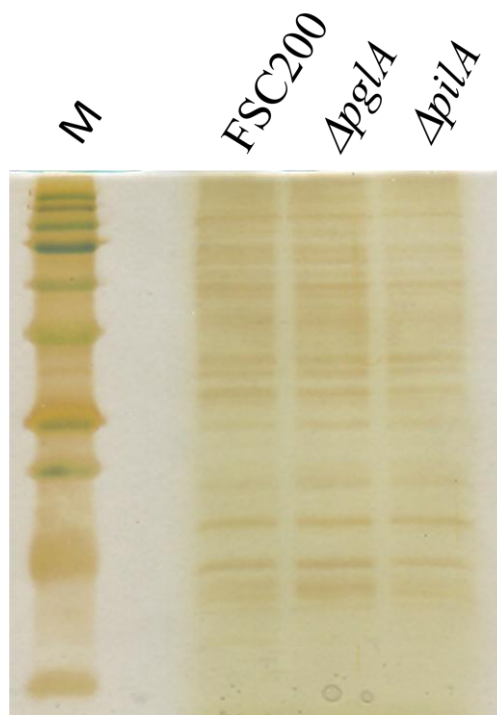
Zdá se, že ke glykosylaci tedy dochází za použití mutantního kmene *ΔpilA* jako zdroje OST za podmínek neutrálního pH s použitím reakčního pufru 2, detergentu DDM, inkubovaném při 30°C.

3.4.3 Ověření vzniku glykosylovaného peptidu

Pro potvrzení správnosti pozitivního výsledku byla *in vitro* glykosylace zopakována za stejných podmínek s nově připravenými reakčními složkami. Byla připravena nová membránová frakce OST3 z kmene FSC200/*ΔFTT0890c* neboli *ΔpilA* a fenotyp kmene byl opět ověřen imunodetekcí s následnou kontrolou nanášky ostříbřením gelu, které je citlivější než modření (metoda 2.3.15). A dále byla připravena nová směs LLO.

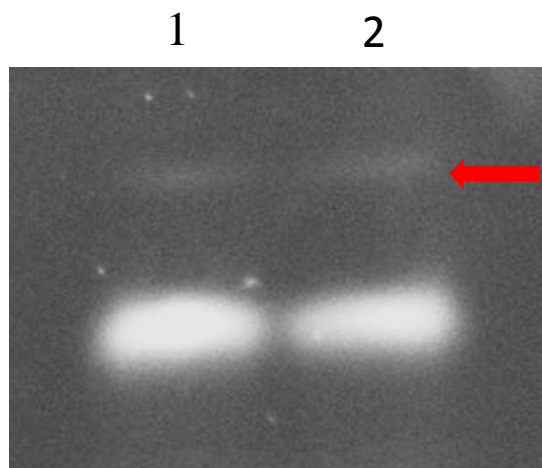


Obrázek 29: Ověření fenotypu nově připravené membránové frakce mutantního kmene *ΔpilA*.



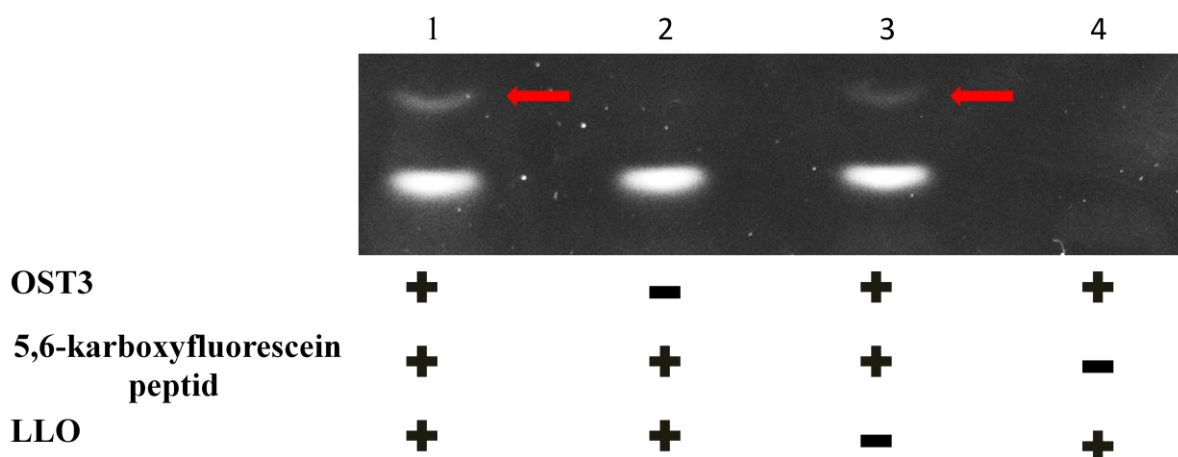
Obrázek 30: Kontrola nanášky osřibřením gelu po WB pomocí metody EMBL.

In vitro glykosylace byla tedy provedena smícháním 120 pmol 5,6-karboxyfluorescein peptidu rozpuštěného v reakčním pufru 2 s 52 μ l nově připravené membránové frakce $\Delta pila$ a s přídávkem 10 μ l nově připravené frakce LLO izolované z kmene FSC200. Po 18 hodinové inkubaci při 30°C byly vzorky opět precipitovány, přečištěny přes C18 reverzní fázi a následně byl peptid/glykopeptid izolován na SCX. Detekce na gelu potvrdila předchozí výsledek. Tedy proužek o vyšší molekulové hmotnosti než je výchozí peptid, a který pravděpodobně představuje nově vznikající produkt – glykosylovaný peptid (viz obrázek 31).



Obrázek 31: *In vitro* glykosylace s přidavkem LLO - z nově připravené membránové frakce a nových LLO. Opakování ve dvou identických vzorcích. Červená šipka znázorňuje pravděpodobný glykopeptid.

Pro vyloučení nespecifické reakce na gelu byly v dalším experimentu zahrnuty odpovídající kontroly, ve kterých byla vždy jedna z reakčních komponent vynechána. Enzymatické reakce proběhly za stejných podmínek jako při vzniku glykopeptidu v minulých analýzách.



Obrázek 32: Negativní kontrola glykosylovaného peptidu s vynecháním vždy jedné reakční komponenty. OST3: membránovou frakce mutantního kmene $\Delta pilA$.

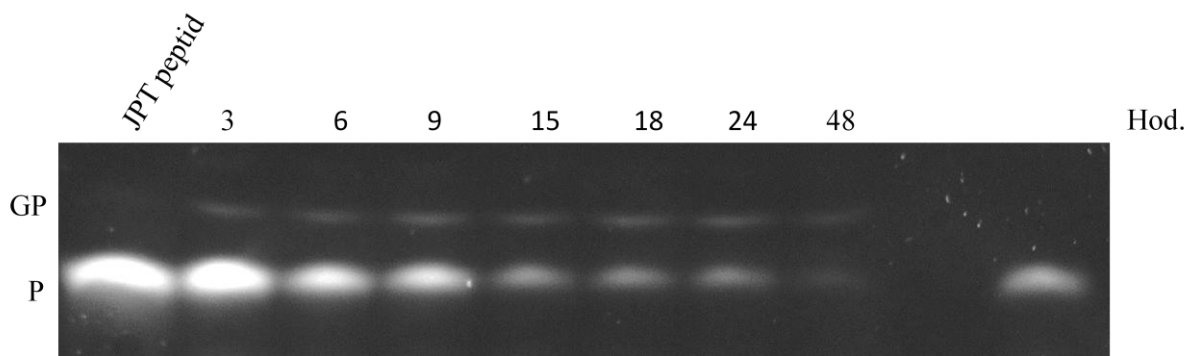
Složení vzorku 1 bylo stejné jako v předchozím experimentu, ve kterém byl pozorován dva proužky – proužek o nižší molekulové hmotnosti představující nemodifikovaný peptid a druhý proužek o vyšší molekulové hmotnosti, kterým je pravděpodobně glykosylovaný peptid. Na vzorek 2 byl použit mutantní kmen $\Delta pglA$, který neobsahuje OST enzym PglA, ale ostatní reakční komponenty byly zachovány. Ke glykosylaci tedy v tomto vzorku dojít nemůže a na gelu také nebyl proužek o vyšší

molekulové hmotnosti detekován. Ve vzorku 3 chyběly přidané LLO. Přesto byly pozorovány dva proužky. Ve vzorku 4 chyběl 5,6-karboxyfluorescein peptid, proto po UV vizualizaci na gelu není viditelný žádný proužek (obrázek 32). Z absence proužků o vyšší molekulové hmotnosti u vzorků 2 a 4, u kterých ke glykosylaci nemůže dojít, je zřejmé, že proužky o vyšší molekulové hmotnosti ve vzorcích 1 a 3 jsou opravdu produkty *in vitro* glykosylace. Navíc pozitivní reakce u vzorku 3 naznačuje, že membránová frakce izolovaná z *ApilA* kmene kromě OST obsahuje i dostatečné množství LLO jako dárcovského substrátu ke glykosylaci peptidu.

3.4.4 Testování inkubační doby

Reakční doba *in vitro* glykosylací se liší v závislosti na biologickém původu studovaného agens a rovněž na podobě použitého OST. Například ve studii Kohda et al. (2007) použily OST z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a z termofilního archea *Pyrococcus furiosus*. Pozitivní výsledky glykosylací byly dosaženy po inkubaci 24 a 21 hodin. Ve studii Jervis et al. (2010) pracovaly s bakteriemi *H. pullorum* a *C. jejuni* a inkubace reakční směsi probíhala přes noc. V našich dosavadních experimentech byla pro zvýšení pravděpodobnosti proběhnutí glykosylace zvolena rovněž delší reakční doba 18 hodin. Nicméně ze studie Gerber et al. (2013) vyplývá, že ke glykosylaci peptidu dochází rychleji. V následném experimentu byl proveden test inkubační doby. Sledovalo se, za jaký čas již ke glykosylaci dochází. Pracovalo se s šesti různými časy - 3, 6, 9, 15, 18, 24 a 48 hodin. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako v předešlém experimentu. Experiment ukázal, že ke glykosylaci peptidu dochází již po 3 hodinové inkubaci (viz obrázek 33). Jako negativní kontrola zde byl použit opět mutantní kmen *ApglA*, u kterého nemůže ke glykosylaci docházet (na obrázku 33 neočíslovaný vzorek). Na obrázku č. 33 je vidět, že množství nemodifikovaného peptidu sice klesá, což naznačuje jeho spotřebu v reakci, na druhou stranu se zdá, že glykosylovaného peptidu nepřibývá. Vzhledem k tomu, že takto slabé intenzity fluorescence lze špatně hodnotit vizuálně, byly intenzity jednotlivých proužků změřeny denzitometricky pomocí programu Bio1D (Vilber Lourmat). Z ploch a výšek píků každého detekovaného proužku byly určeny jejich objemové intenzity. Množství neglykosylovaného peptidu a glykopeptidu v jednotlivých inkubačních časech byla dále vyjádřena v procentech vztažených na celkový součet objemových intenzit neglykosylovaného peptidu ve všech časech (rovno 100 %). Z relativních intenzit glykopeptidu lze pozorovat, že množství

glykopeptidu je ve všech časech prakticky stejné (tabulka 15). Výsledky tak naznačují, že se samotný neglykosylovaný peptid pravděpodobně váže na zkumavku a vznik glykopeptidu v závislosti na inkubační době enzymové reakce tudíž nelze hodnotit. Nicméně z experimentu vyplývá, že inkubační doba 3 hodiny je pro *in vitro* glykosylaci peptidu TAEAQAISGSTEQLAQ dostačující.



Obrázek 33: Testování inkubační doby vzniku glykopeptidu. GP: glykopeptid; P: peptid.

Tabulka 15: Vznik glykopeptidu v závislosti na čase.

Inkubační doba [hod]	Neglykosylovaný peptid				Glykopeptid			
	Výška [1]	Plocha [1]	Objemová intenzita [1]	Relativní intenzita [%]	Výška [1]	Plocha [1]	Objemová intenzita [1]	Relativní intenzita [%]
3	4064	11730	14925578	27,7	667	11815	5367089	10,0
6	2106	11900	9243001	17,2	651	11475	5131719	9,5
9	1900	10880	7882730	14,6	707	11815	5282073	9,8
15	996	11560	5803689	10,8	613	11730	4987676	9,3
18	892	11900	5672210	10,5	664	11730	5089346	9,4
24	837	11900	5538888	10,3	640	11645	4936515	9,2
48	549	11815	4814247	8,9	586	11730	4897103	9,1

ZÁVĚR

V této diplomové práci byla ověřena glykosylační aktivita dvou mutantních kmenů bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica*, a to kmene FSC200 $\Delta dsbA$ a kmene FSC200 $\Delta pilA$, pomocí SDS-PAGE a následné imunodetekce. Tyto kmeny byly poté použity pro *in vitro* glykosylaci syntetického peptidu TAEAQAISGSTEQLAQ shodné aminokyselinové sekvence jako je C-terminální peptid glykoproteinu DsbA. Vzorky byly nejprve zbaveny solí pomocí precipitace, poté pomocí C18 reverzní fáze a nakonec následovalo vyizolování peptidu pomocí iontově výměnné chromatografie na SCX fázi. Po optimalizaci tohoto postupu byly nalezeny vhodné podmínky pro vznik glykopeptidu, které byly objeveny prozatím pouze v mutantním kmeni FSC200 $\Delta pilA$. Reakční komponenty, OST, 5,6-karboxyfluorescein peptid a LLO, byly ustáleny v poměrech 52 μ l OST, 120 pmol peptidu a 10 μ l LLO. Glykosylovaný peptid vznikl při použití solubilizačního pufru s neutrálním pH a detergentem DDM o složení 50 mM Tris-HCl (pH 7,0) s 0,25 M NaCl, 5% (v/v) glycerolem a 1% (w/v) DDM pro přípravu OST. *In vitro* glykosylace proběhla v prostředí reakčního pufru o složení 0,5 M Tris-HCl o pH 6,5 s obsahem dvojmocných iontů vápníku a manganu v podobě $CaCl_2$ a $MnCl_2$, a to ve výsledné koncentraci 6 mmol/l vápenatých a 0,6 mmol/l manganatých iontů. Glykosylovaný peptid v tomto reakčním prostředí vznikl za teploty 30°C a bylo prokázáno, že pro vznik produktu stačí již délka 3 hodiny. Pro potvrzení, zda se jedná opravdu o vzniklý glykosylovaný peptid, bude následovat analýza produktu pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií.

Podmínky pro *in vitro* glykosylaci peptidu tedy byly nalezeny, nicméně množství vznikajícího glykopeptidu by mohlo být pravděpodobně i vyšší. Mohlo by se tak stát, pokud by se zvýšilo množství reakčních komponent, jako je například OST nebo by se hledalo optimální množství dvojmocných iontů do reakční složky směsi. Pozitivní výsledek by mohla dát i jiná kombinace OST, kde by se objemově v poměru 1:1 smíchal právě mutantní kmen FSC200 $\Delta pilA$ s mutantním kmenem $\Delta pglA$, který by poskytl větší množství potřebného substrátu k provedení reakce. Pokud by se podařilo zvýšit množství vzniklého produktu, a potvrdilo by se, že se vskutku jedná o vzniklý glykopeptid, dala by se tato studie použít pro studium glykosylační dráhy bakterie *F. tularensis*, kde by se využilo aktivity OST z mutantního kmene FSC200 $\Delta pilA$ smíchaného s jednotlivými mutantními kmeny

s inaktivovanými geny hypotetické glykosylační dráhy *F. tularensis*. Díky tomu by byly poznány další skutečnosti o této bakterii a mohl by se kupředu posunout i vývoj vakcín.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. AAS, F.E. et al. 2007: *Neisseria gonorrhoeae* O-linked pilin glycosylation: functional analyses define both the biosynthetic pathway and glycan structure. *Molecular Microbiology*, May 2007, volume 65(3), pages 607-624
2. ANONSEN, J.H. et al. 2012: An Extended Spectrum of Target Proteins and Modification Sites in the General O-Linked Protein Glycosylation System in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Proteome Research*, October 2012, volume 11, pages 5781-5793
3. BALONOVÁ, L. et al. 2010: Multimethodological Approach to Identification of Glycoproteins from the Proteome of *Francisella tularensis*, an Intracellular Microorganism. *Journal of Proteome Research*, 2010, volume 9, pages 1995–2005. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3025813/>
4. BALONOVÁ, L. 2011: Investigation of the *Francisella tularensis* glycoproteome. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, dizertační práce, strany 17-30 (nepublikováno)
5. BALONOVÁ, L. et al. 2012: Characterization of Protein Glycosylation in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*. *Molecular & Cellular Proteomics*, July 2012, volume 11, pages 1-12. Dostupné z WWW: <http://www.mcponline.org/content/11/7/M111.015016.full.pdf+html?sid=cd6e1e8e-7264-4617-ab4e-84cfa0566dd7>
6. BARRY, E.M., COLE, L.E., SANTIAGO, A.E. 2009: Vaccines against tularemia. *Human Vaccines*, December 2009, volume 5(12), pages 832-838
7. BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. 1996: *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie*. Marvil, strany 255-256
8. BENEŠ, J. 2009: *Infekční lékařství*. Galén, Praha, strany 256-259, ISBN: 978-80-7262-644-1
9. BUCHTA, V., JÍLEK, P., HORÁČEK, J., HORÁK, V. 1998: *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Katedra biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Praha, strana 91, ISBN: 80-7184-565-5
10. CASTRIC, P. 1995: PilO, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin. *Microbiology*, 1995, volume 141, pages 1247-1254

11. CASTRIC, P., CASSELS, F.J., CARLSON, R.W. 2001: Structural Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 1244 Pilin Glycan. *The Journal of Biological Chemistry*, July 2001, volume 276(28), pages 26479-26485
12. COLE, L.E. et al. 2009: Antigen-specific B-1a antibodies induced by *Francisella tularensis* LPS provide long-term protection against *F. tularensis* LVS challenge. *Proc Natl Acad Sci USA*, March 2009, volume 106(11), pages 4343-4348
13. CONLAN, J.W., SHEN, H., WEBB, A., PERRY, M.B. 2002: Mice vaccinated with the O-antigen of *Francisella tularensis* LVS lipopolysaccharide conjugated to bovine serum albumin develop varying degrees of protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A and type B strains of the pathogen. *Vaccine*, October 2002, volume 20(29-30), pages 3465-3471
14. COWLAY, S.C., GRAY, C.J., NANO, F.E. 2000: Isolation and characterization of *Francisella novicida* mutants defective in lipopolysaccharide biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett.*, January 2000, volume 182(1), pages 63-67
15. CUCCUI, J. et al. 2013: Exploitation of bacterial N-linked glycosylation to develop a novel recombinant glycoconjugate vaccine against *Francisella tularensis*. *Open Biology*, May 2013, volume 3(5), pages 1-9
16. DARLING, R.G. et al. 2002: Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emerg Med Clin North Am.*, May 2002, volume 20(2), pages 273-309
17. DELAKE, D.L. 2006: Phospholipid Flippases. *Journal of Biological Chemistry*, November 2006, volume 282, pages 821-825. Dostupné z WWW: <http://www.jbc.org/content/282/2/821.full>
18. DENNIS, D.T. et al. 2001: Tularemia as a Biological Weapon. *Medical and Public Health Management. Journal of the American Medical Association*, 2001, volume 285(21), pages 2763-2773
19. DEVAUX, P.F. et al. 2008: How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, July-August 2008, volume 1778(7-8), pages 1591-1600. Dostupné z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273608001090>
20. EGGE-JACOBSEN, W. et al. 2011: O-Linked Glycosylation of the PilA Pilin Protein of *Francisella tularensis*: Identification of the Endogenous Protein-Targeting Oligosaccharyltransferase and Characterization of the Native Oligosaccharide. *Journal of Bacteriology*, October 2011, volume 193(19), pages 5487-5497. Dostupné z WWW: <http://jb.asm.org/content/193/19/5487.full>

21. ELLIS, J., OYSTON, P.C.F., GREEN, M., TITBALL, R.W. 2002: Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, October 2002, volume 15(4), pages 631-646. Dostupné z WWW: <http://cmr.asm.org/content/15/4/631.full.pdf+html>
22. FELDMAN, M.F. et al. 2005: Engineering N-linked protein glycosylation with diverse O antigen lipopolysaccharide structures in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, February 2005, volume 102(8), pages 3016-3021. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC549450/>
23. FOLEY, J.E., NIETO, N.C. 2010: Tularemia. *Veterinary Microbiology*, January 2010, volume 140, pages 332-338
24. FORSLUND, AL. et al. 2006: Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Molecular Microbiology*, 2006, volume 59(6), pages 1818-1830
25. FOSHAY, L. 1950: Tularemia. *Annual Review of Microbiology*, October 1950, volume 4, pages 313-330
26. FULOP, M., MANCHEE, R., TITBALL, R.W. 1995: Role of lipopolysaccharide and a major outer membrane protein from *Francisella tularensis* in the induction of immunity against tularemia. *Vaccine*, 1995, volume 13(13), pages 1220-1225
27. FULOP, M., MASTROENI, P., GREEN, M., TITBALL, R.W. 2001: Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccine*, August 2001, volume 19(31), pages 4465-4472
28. GERASIMOV, V.N., DOLOTOV, V.I., STEPANOV, A.V., URAKOV, N.N. 1997: Morphology, ultrastructure and populational features of bacteria *francisella*. *Vestn Ross Akad Med Nauk.*, 1997, volume 6, pages 24-30. Dostupné z WWW: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?cmd=Retrieve&list_uids=9289274&dopt=Abstract
29. GERBER, S. et al. 2013: Mechanism of Bacterial Oligosaccharyltransferase: In vitro quantification of sequon binding and catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, March 2013, volume 288(13), pages 8849-8861. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3610960/>
30. GIL, H., BENACH, J.L., THANASSI, D.G. 2004: Presence of Pili on the Surface of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*, May 2004, volume 72(5), pages 3042-3047. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC387894>
31. GÜRCAN, S. 2014: Epidemiology of Tularemia. *Balkan Med J*, 2014, volume 31, pages 3-10

32. HANUSZKIEWICZ, A. et al. 2014: Identification of the Flagellin Glycosylation System in *Burkholderia cenocepacia* and the Contribution of Glycosylated Flagellin to Evasion of Human Innate Immune Responses. *The Journal of Biological Chemistry*, May 2014, volume 289, pages 19231-19244
33. HARTLEY, M.D. et al. 2011: Biochemical Characterization of the O-Linked Glycosylation Pathway in *Neisseria gonorrhoeae* Responsible for Biosynthesis of Protein Glycans Containing N,N'-Diacetylbacillosamine. *Biochemistry*, May 2011, volume 50, pages 4936-4948
34. HIGHTOWER, J. et al. 2014: Historical distribution and host-vector diversity of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia, in Ukraine. *Parasites & Vectors*, October 2014, volume 7(453), pages 1-6. Dostupné z WWW: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/453>
35. HUNTLEY, J.F., CONLEY, P.G., HAGMAN, K.E., NORGDARD, M.V. 2007: Characterization of *Francisella tularensis* Outer Membrane Proteins. *Journal of Bacteriology*, January 2007, volume 189(2), pages 561-574. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1797401/>
36. CHECROUN, C., WEHRLY, T.D. et al. 2006: Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *PNAS*, September 2006, volume 103(39), pages 14578-14583. Dostupné z WWW: <http://www.pnas.org/content/103/39/14578>
37. CHU, P., CUNNINGHAM, A.L., YU, J.J. et al. 2014: Live Attenuated *Francisella novicida* Vaccine Protects against *Francisella tularensis* Pulmonary Challenge in Rats and Non-human Primates. *Plos Pathogens*, October 2014, volume 10(10). Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4207810/>
38. IELPI, L., COUSO, R.O., DANKERT, M.A. 1993: Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*, May 1993, volume 175(9), pages 2490-2400. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC204549/>
39. IWASHKIW, J.A., VOZZA, N.F., KINSELLA, R.L., FELDMAN, M.F. 2013: Pour some sugar on it: the expanding world of bacterial protein O-linked glycosylation. *Molecular Microbiology*, May 2013, volume 89(1), pages 14-28

40. JANOVSÁ, S., PÁVKOVÁ, I., HUBÁLEK, M. et al. 2007: Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, February 2007, volume 108(2), pages 151-159
41. JANOVSÁ, S. et al. 2007: Proteomic Analysis of Antibody Response in a Case of Laboratory-Acquired Infection with *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Folia Microbiol*, 2007, volume 52(2), pages 194-198
42. JARED, S. Thermo scientific, Pierce Protein Biology Products: Protein Glycosylation. *Piercenet.com* [online]. [cit. 2015-01-26]. Dostupné z WWW: <http://www.piercenet.com/method/protein-glycosylation>
43. JERVIS, A.J. et al. 2010: Characterization of N-Linked Protein Glycosylation in *Helicobacter pullorum*. *Journal of Bacteriology*, October 2010, volume 192(19), pages 5228-52367
44. KOHDA, D. et al. 2007: New oligosaccharyltransferase assay method. *Glycobiology*, August 2007, volume 17(11), pages 1175-1172. Dostupné z WWW: <http://glycob.oxfordjournals.org/content/17/11/1175.long>
45. KOWARIK, M. et al. 2006: N-linked glycosylation of folded proteins by the bacterial oligosaccharyltransferase. *Science*, November 2006, volume 314(5802), pages 1148-1150
46. KU, S.C., SCHULZ, B.L., POWER, P.M., JENNINGS, M.P. 2009: The pilin O-glycosylation pathway of pathogenic *Neisseria* is a general system that glycosylates AniA, an outer membrane nitrite reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, volume 378, pages 84–89
47. KVASIL , B. a kol. 1985: Malá československá encyklopedie, II. svazek D-CH. ACADEMIA, nakladatelství Československé akademie věd, Praha, první vydání, strana 498
48. LARSEN, R., POGLIANO, K. 2011: *Francisella Tularensis*: A Microbial Biorealm page on the genus *Francisella tularensis*. *Microbe Wiki* [online]. [cit. 2014-09-25]. Dostupné z WWW: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Francisella_tularensis
49. LARSSON, P., OYSTON, P.C., CHAIN, P. et al. 2005: The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nature Genetics*, January 2005, volume 37(2), pages 153-159. Dostupné z WWW: <http://www.nature.com/ng/journal/v37/n2/full/ng1499.html>

50. LEES-MILLER, R.G. et al. 2013: A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii*. *Molecular Microbiology*, September 2013, volume 89(5), pages 816-830
51. LI, H. et al. 2008: Structure of the oligosaccharyl transferase complex at 12 Å resolution. *Structure*, March 2008, volume 16(3), pages 432-440. Dostupné z WWW: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969212608000191>
52. LINDGREN, M. et al. 2013: Importance of PdpC, IglC, IglI, and IglG for Modulation of a Host Cell Death Pathway Induced by *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*, June 2013, volume 81(6), pages 2076-2074. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3676040/>
53. LINTON, D. et al. 2002: Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 2002, volume 43(2), pages 497-508
54. LINTON, D. et al. 2005: Functional analysis of the *Campylobacter jejuni* N-linked protein glycosylation pathway. *Molecular Microbiology*, March 2005, volume 55(6), pages 1695-1703
55. LITHGOW, K.V. et al. 2014: A general protein O-glycosylation system within the *Burkholderia cepacia* complex is involved in motility and virulence. *Molecular Microbiology*, March 2014, volume 92(1), pages 116-137
56. MANN, B.J., ARK, N.M. 2009: Rationally designed tularemia vaccines. *Expert Rev Vaccines*, July 2009, volume 8(7), pages 877-885
57. MATSUMOTO, S. et al. 2013: Crystal structures of an archaeal oligosaccharyltransferase provide insights into the catalytic cycle of N-linked protein glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, October 2013, volume 10(44), pages 17868–17873. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3816453/>
58. McLENDON, M.K., APICELLA, M.A., ALLEN, L.A.H. 2006: *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annu Rev Microbiol.*, 2006, volume 60, pages 167 – 175. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1945232/>
59. MUSUMECI, M.A., IELMINI, M.V., FELDMAN, M.F. 2013: In Vitro Glycosylation Assay for Bacterial Oligosaccharyltransferases in: *Glycosyltransferases Methods in Molecular Biology*. May 2013, volume 1022, pages 161-171. Dostupné z WWW: http://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-62703-465-4_13

60. NANO, F.E. et al. 2004: A Francisella tularensis Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *Journal of Bacteriology*, October 2004, volume 186(19), pages 6430-6436. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC516616/>
61. OYSTON, P.C.F., SJOSTEDT, A., TITBALL, R.W. 2004: Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in francisella tularensis. *Microbiology*, December 2004, volume 2, 967-978
62. OYSTON, P.C.F. 2008: Francisella tularensis: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, volume 57, pages 921-930
63. OYSTON, P.C.F. 2009: Francisella tularensis vaccines. *Vaccine*, July 2009, volume 27, pages 48-51
64. PASCALIS, R.D., CHOU, A.Y., RYDEN, P. et al. 2014: Models Derived from In Vitro Analyses of Spleen, Liver, and Lung Leukocyte Functions Predict Vaccine Efficacy against the Francisella tularensis Live Vaccine Strain (LVS). *mBio*, April 2014, volume 5(2), pages e00936-13. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3993856/>
65. PECHOUS, R.D., McCARTHY, T.R., ZAHRT, T.C. 2009: Working toward the Future: Insights into Francisella tularensis Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiology and molecular biology reviews*, December 2009, volume 73(4), pages 684-711. Dostupné z WWW: <http://mibr.asm.org/content/73/4/684#ref-list-1>
66. PETROSINO, J.F., XIANG, Q., KARPATY, S.E. et al. 2006: Chromosome Rearrangement and Diversification of Francisella tularensis Revealed by the Type B (OSU18) Genome Sequence. *Journal of Bacteriology*, October 2006, volume 188(19), pages 6977-6985. Dostupné z WWW: <http://jb.asm.org/content/188/19/6977.full.pdf+html>
67. POWER, P.M., JENNINGS, M.P. 2003: The genetics of glycosylation in Gram-negative bacteria. *Microbiology Letters*, 2003, volume 218, pages 211-222
68. POWER, P.M., SEIB, K.L., JENNINGS, M.P. 2006: Pilin glycosylation in Neisseria meningitidis occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, volume 347, pages 904-908

69. PRIOR, J.L. et al. 2003: Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Medical Microbiology*, October 2003, volume 52(10), pages 845-851
70. QIN, A. et al. 2009: Identification of an Essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* Virulence Factor. *Infection and Immunity*, January 2009, volume 77(1), pages 152-161. Dostupné z WWW: <http://iai.asm.org/content/77/1/152.full>
72. QUTYAN, M., PALIOTTI, M., CASTRIC, P. 2007: PilO of *Pseudomonas aeruginosa* 1244: subcellular location and domain assignment. *Mol Microbiol.*, December 2007, volume 66(6), pages 1444-1458. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2248727/>
73. QUTYAN, M. et al. 2010: Glycosylation of Pilin and Nonpilin Protein Constructs by *Pseudomonas aeruginosa* 1244. *Journal of Bacteriology*, November 2010, volume 192(22), pages 5972-5981
74. RAETZ, CH.R.H., WHITFIELD, CH. 2002: Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem.*, 2002, volume 71, pages 635 – 700. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2569852/>
75. ŘÍMAN, J. et al. 1986: Polysacharidy. *Malá československá encyklopedie IV. svazek M-Pol*, Academia, Praha 1986, strana 988
76. SALOMONSSON, E. et al. 2009: Functional analyses of pilin-like proteins from *Francisella tularensis*: complementation of type IV pilus phenotypes in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology*, May 2009, volume 155, pages 2546-2559
77. SANTIC, M., AL-KHODOR, S., KWAIK, Y.A. 2010: Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. *Cellular Microbiology*, 2010, volume 12(2), pages 129 – 139. Dostupné z WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1462-5822.2009.01400.x/pdf>
78. SCOTT, N.E. et al. 2011: Simultaneous Glycan-Peptide Characterization Using Hydrophilic Interaction Chromatography and Parallel Fragmentation by CID, Higher Energy Collisional Dissociation, and Electron Transfer Dissociation MS Applied to the N-Linked Glycoproteome of *Campylobacter jejuni*. *Molecular and Cellular Proteomics*, February 2011, volume 10(2), pages M000031-MCP201. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3033663/>
79. SHEVCHENKO, A. et al. 1996: Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad*

- Sci USA, December 1996, volume 93(25), pages 14440-14445. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC26151/>
80. SCHÄGGER, H. 2006: Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc.*, 2006, volume 1(1), pages 16-22
 81. SJÖSTEDT, A. 2003: Virulence determinants and protective antigens of *Francisella tularensis*. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, volume 6, pages 66-71
 82. SJÖSTEDT, A. 2005: Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes and Infections*, 2006, volume 8, pages 561-567. Dostupné w WWW: http://www.idpublications.com/journals/pdfs/mifec/mifec_mostcited_1.pdf
 83. STEELE, S. et al. 2013: *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *Plos Pathogens*, August 2013, volume 9(8), pages 1-14. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744417/>
 84. STEINER, D.J., FURUYA, Y., METZGER, D.W. 2014: Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infection and Drug Resistance*, September 2014, volume 2014:7, pages 239-251. Dostupné z WWW: <http://www.dovepress.com/hostndashpathogen-interactions-and-immune-evasion-strategies-in-franci-peer-reviewed-article-IDR>
 85. STRAŠKOVÁ, A. et al. 2009: Proteome Analysis of an Attenuated *Francisella tularensis* dsbA Mutant: Identification of Potential DsbA Substrate Proteins. *Journal of proteome research*, June 2009, volume 8, pages 5336-5346
 86. STROHALM, M. et al. 2008: mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 2008, volume 22(6), pages 905-908
 87. SULLIVAN, J.T., JEFFERY, E.F., SHANNON, J.D., RAMAKRISHNAN, G. 2006: Characterization of the Siderophore of *Francisella tularensis* and Role of fslA in Siderophore Production. *Journal of Bacteriology*, June 2006, volume 188(11), pages 3785-3795. Dostupné z WWW: <http://jb.asm.org/content/188/11/3785.full.pdf+html>
 88. SZYMANSKI, CH.M. et al. 1999: Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, March 1999, volume 32(5), pages 1022-1030
 89. TÄRNVIK, A., BERGLUND, L. 2003: Tularaemia. *European Respiratory Journal*, February 2003, volume 21, pages 361-373. Dostupné z WWW: <http://erj.ersjournals.com/content/21/2/361.full.pdf+html>

90. THOMAS, R.M. et al. 2011: Glycosylation of DsbA in *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Bacteriology*, October 2011, volume 193(19), pages 5498-5509
91. UDRŽALOVÁ, J. 2009: Analýza proteinů a peptidů bakterie *Francisella tularensis* za účelem výběru identifikačních a typizačních markerů. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, diplomová práce, strana 24 (nepublikováno)
92. Velký lékařský slovník: *Francisella Tularensis*. *Lékařské.slovníky.cz* [online]. Praha 4: Maxdorf, 2008 [cit. 2014-11-12]. Dostupné z WWW: <http://lekarске.slovníky.cz/pojem/francisella-tularensis>
93. VIK, A. et al. 2009: Broad spectrum O-linked protein glycosylation in the human pathogen *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, March 2009, volume 106(11), pages 4447-4452. Dpstupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2648892/>
94. WEERAPANA, E., IMPERIALI, B. 2006: Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, March 2006, volume 16, pages 91-101
95. WEHRLY, T.D. et al. 2009: Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cellular Microbiology*, July 2009, volume 11(7), pages 1128-1150. Dostupné z WWW: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746821/>
96. WEINTRAUB, A. 2003: Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydrate Research*, November 2003, volume 338(23), pages 2539-2547
97. YOUNG, N.M. et al. 2002: Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. *The Journal of Biological Chemistry*, November 2002, volume 277(46), pages 42530-42539

SEZNAM OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

- Obrázek 1:** Mapa celosvětového výskytu čtyř hlavních poddruhů rodu *Francisella*.
- Obrázek 2:** *F. tularensis* jako intracelulární patogen.
- Obrázek 3:** N-vázaný glykan připojený amidovou vazbou k asparaginu a O-vázaný glykan připojený hydroxylovou skupinou k serinu
- Obrázek 4:** Ukázka glykosylace u Gram-negativních bakterií
- Obrázek 5:** Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta dsbA$ s detergentem Triton X-100
- Obrázek 6:** Obarvený gel po WB modřením dle Jungbluta jako důkaz stejných nanášek.
- Obrázek 7:** Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta dsbA$ s detergentem DDM.
- Obrázek 8:** Obarvený gel po WB modřením dle Jungbluta jako důkaz stejných nanášek.
- Obrázek 9:** Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta pilA$ s detergentem Triton X-100.
- Obrázek 10:** Průkaz glykosylační aktivity a ověření fenotypu mutantního kmene $\Delta pilA$ s detergentem DDM.
- Obrázek 11:** Tandemové hmotnostní spektrum fluorescenčního peptidu o hmotě 1961 g/mol.
- Obrázek 12:** Princip metody in vitro glykosylace peptidu.
- Obrázek 13:** Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin.
- Obrázek 14:** Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin ve vizualizaci bez UV.
- Obrázek 15:** Precipitované vzorky po inkubaci 18 hodin – obarvený gel modřením dle Jungbluta.
- Obrázek 16:** Zvolení optimální metody zpracování vzorku po proběhlé enzymové reakci.
- Obrázek 17:** Zvolení optimální metody zpracování vzorku po proběhlé enzymové reakci – vizualizace bez UV.
- Obrázek 18:** In vitro glykosylace bez přídavku LLO.
- Obrázek 19:** In vitro glykosylace bez přídavku LLO – vizualizace bez UV.
- Obrázek 20:** In vitro glykosylace bez přídavku LLO - obarvený gel modřením dle Jungbluta.
- Obrázek 21:** Imunodetekce LPS jako hlavního zástupce LLO pomocí anti-LPS protilátky.
- Obrázek 22:** Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přídavkem LLO.
- Obrázek 23:** Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přídavkem LLO – vizualizace bez UV.

- Obrázek 24:** Zvolení optimální metody zpracování vzorku s přídavkem LLO – obarvený gel modřením dle Jungbluta.
- Obrázek 25:** *In vitro* glykosylace s přídavkem LLO.
- Obrázek 26:** *In vitro* glykosylace s přídavkem LLO – vizualizace bez UV.
- Obrázek 27:** *In vitro* glykosylace s přídavkem LLO. Červená šipka ukazuje na pravděpodobně vzniklý glykosylovaný peptid.
- Obrázek 28:** *In vitro* glykosylace s přídavkem LLO – vizualizace bez UV.
- Obrázek 29:** Ověření fenotypu nově připravené membránové frakce mutantního kmene *ApilA*.
- Obrázek 30:** Kontrola nanášky ostříbřením gelu po WB pomocí metody EMBL.
- Obrázek 31:** *In vitro* glykosylace s přídavkem LLO - z nově připravené membránové frakce a nových LLO.
- Obrázek 32:** Negativní kontrola glykosylovaného peptidu s vynecháním vždy jedné reakční komponenty.
- Obrázek 33:** Testování inkubační doby vzniku glykopeptidu.
-
- Tabulka 1:** G- bakterie s glykosylačním aparátem.
- Tabulka 2:** Příprava kompletního Chamberlainova média.
- Tabulka 3:** Roztoky kalibrační řady.
- Tabulka 4:** Mini 1D SDS-PAGE.
- Tabulka 5:** Molekulové hmotnosti proteinů.
- Tabulka 6:** Promývací a inkubační kroky při WB a imunodetekci.
- Tabulka 7:** Příprava roztoků na tricínové gely.
- Tabulka 8:** Měnící se konstantní napětí.
- Tabulka 9:** Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO.
- Tabulka 10:** Různé postupy zpracování vzorků po *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO.
- Tabulka 11:** Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci bez přídavku LLO.
- Tabulka 12:** Různé postupy zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci s přídavkem LLO.
- Tabulka 13:** Zpracování vzorků pro *in vitro* glykosylaci s přídavkem LLO.
- Tabulka 14:** Zpracování dalšího vzorků pro *in vitro* glykosylaci s přídavkem LLO.
- Tabulka 15:** Vznik glykopeptidu v závislosti na čase.

- Graf 1:** Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* divokého kmene FSC200.
- Graf 2:** Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene *ΔpglA*.
- Graf 3:** Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene *ΔpilA*.
- Graf 4:** Sledování kinetiky růstu *F. tularensis* subsp. *holarctica* mutantního kmene *ΔdsbA*.