

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**

**PROTEOMICKÁ CHARAKTERIZACE  
SEKRETOVANÝCH PROTEINŮ  
U GRAMNEGATIVNÍCH BAKTERIÍ RODU  
*PSEUDOMONAS***

**Bakalářská práce**

**Lucie Dostálová**

**Studijní program: B1501 Biologie**  
**Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie**  
**Forma studia: Prezenční**

**Vedoucí práce: Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.**

**Olomouc 2018**

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Lucie Dostálová
Název práce	Proteomická charakterizace sekretovaných proteinů u gramnegativních bakterií rodu <i>Pseudomonas</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Technologické centrum UP Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Tato práce byla věnována proteomické analýze sekretovaných proteinů z gramnegativních bakterií rodu <i>Pseudomonas</i> , konkrétně kmenů <i>Pseudomonas prosekii</i> 2673, <i>Pseudomonas</i> sp. 2433. Jedná se o bakterie, které se vyskytují volně v přírodě a jejich studium by mohlo přinést zajímavé poznatky z hlediska identifikace sekretovaných proteinů, z nichž některé mohou představovat potenciální antimikrobiální látky. K tomuto účelu byl sestaven protokol sestávající se z následujících kroků: precipitace proteinů, elektroforetické separace, proteolytického štěpení a přečištění peptidů na C18 reverzní fázi s následnou MS detekcí a bioinformatickým zpracováním získaných dat. Celkem bylo identifikováno 1514 proteinů, z nichž bylo 389 predikováno jako sekretovaných. Navržený postup je tedy pro identifikaci proteinů sekretovaných bakteriemi použitelný a do budoucna by tak mohl přinést požadované výsledky.
Klíčová slova	Buněčná sekrece, sekretované proteiny, bakterie, <i>Pseudomonas</i> , proteomika, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	79

Počet příloh

0

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Author's name	Lucie Dostálová
Title of thesis	Proteomic analysis of secreted proteins from <i>Pseudomonas</i> species
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Protein Biochemistry and Proteomics Technological Centre of the Palacky University Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research
Supervisor	Mgr. Ivo Chamrád, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>The aim of this bachelor thesis was proteomic analysis of secreted proteins from the gramnegative bacteria <i>Pseudomonas</i>, namely from strains <i>Pseudomonas prosekii</i> 2673 and <i>Pseudomonas</i> sp. 2433. These bacteria have recently been discovered in Antarctic nature and some of their extracellular proteins show promising antimicrobial activity. For the study of proteins secreted by these bacterial species, an experimental protocol was designed that consisted of following steps: protein precipitation, electrophoretic separation, proteolytic digestion and peptide purification on C18 reversed phase with subsequent MS detection and bioinformatic analysis of the obtained data. Altogether, more than 1500 proteins were identified, from which 389 proteins were predicted as potentially secreted. This data suggests that the proposed protocol is suitable for routine identification of proteins secreted by bacteria and as such, it can deliver many interesting findings in the near future.</p>
Keywords	Cell secretion, secreted proteins, bacteria, <i>Pseudomonas</i> , proteomics, mass spectrometry

Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci bakalářského studia oboru Molekulární a buněčná biologie vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Mgr. Ivo Chamrádovi, Ph.D., za přátelský přístup a cenné rady, které mi poskytoval po celou dobu řešení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D., za veškerou pomoc s LC–MS/MS analýzami. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za veškerou podporu a trpělivost během studia.

## Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍLE PRÁCE .....	11
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	12
3.1	Sekrece.....	12
3.1.1	Sekrece proteinů u eukaryot .....	13
3.1.2	Sekrece proteinů u bakterií .....	15
3.1.3	Sekreční systémy u grampozitivních bakterií .....	17
3.1.4	Sekreční systém u gramnegativních bakterií .....	20
3.2	Proteomika.....	27
3.2.1	Metody používané v moderní proteomice .....	27
3.2.2	Bakteriální proteomika .....	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	35
4.1	Použité chemikálie.....	35
4.2	Biologický materiál .....	35
4.3	Použité přístrojové vybavení .....	36
4.4	Použité nástroje a spotřební materiál .....	36
4.5	Použité roztoky a gely .....	36
4.6	Metody.....	39
4.6.1	Extrakce bakteriálních proteinů sekretovaných do média .....	39
4.6.2	Kvantifikace proteinů 2-D Quant Kitem .....	39
4.6.3	SDS-PAGE .....	40
4.6.4	Barvení proteinů pomocí dusičnanu stříbrného .....	42
4.6.5	Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue .....	42
4.6.6	Štěpení proteinů v roztoku.....	42
4.6.7	Štěpení proteinů v gelu .....	43
4.6.8	Purifikace peptidů na reverzní fázi C18 pomocí kolon Micro SpinColumn.....	44
4.6.9	Purifikace peptidů na reverzní fázi C18 pomocí vyrobených mikrokolonek .....	44
4.6.10	LC-MS/MS analýza .....	45
4.6.11	Zpracování dat .....	46
4.6.12	Bioinformatická analýza získaných výsledků.....	47
5	VÝSLEDKY A HODNOCENÍ .....	49
5.1	Charakteristika biologického materiálu a návrh pracovního postupu.....	49
5.2	Proteomická analýza R2A média.....	51
5.3	Proteomická analýza složení R2A média po kultivaci bakterií z rodu <i>Pseudomonas</i> ...	54



5.4	Predikce sekretovaných proteinů a jejich další anotace.....	57
5.5	Příklady proteinů sekretovaných bakteriemi z rodu Pseudomonas .....	62
6	ZÁVĚR.....	65

Seznam použité literatury

Seznam použitých zkratk

## 1 ÚVOD

V současné době je v problematice identifikace sekretovaných proteinů z bakterií vyvíjeno velké úsilí. Studium sekrece proteinů z bakterií je důležité nejen kvůli bakteriální virulenci, ale může přinést i další zajímavé poznatky pro klinické odvětví například při studiu tzv. bakteriocinů. Jedná se o bakteriální proteiny, které působí na receptory jiných bakterií, což má za následek jejich smrt.

Tato bakalářská práce se zabývá proteomickou charakterizací sekretovaných proteinů z gramnegativních bakterií rodu *Pseudomonas*. Identifikace sekretovaných proteinů byla prováděna u dvou vybraných zástupců z tohoto rodu, konkrétně se jednalo o *Pseudomonas protekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433. Jde o bakterie tyčinkovitého tvaru, které jsou aerobní a netvoří spory. Tyto kmeny se vyskytují volně v přírodě. Jejich studium by mohlo přinést zajímavé poznatky z hlediska identifikace sekretovaných proteinů, mezi nimiž se mohou vyskytovat i tzv. pyociny. To jsou bakteriociny, které mohou představovat nové potenciální antimikrobiální látky.

## 2 CÍLE PRÁCE

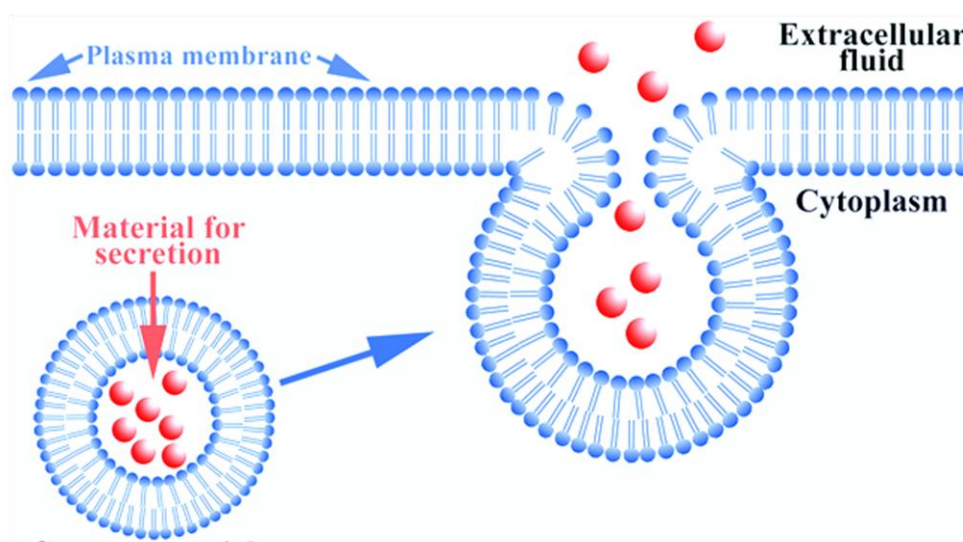
- Vypracovat rešerši na téma proteinové sekrece a proteomické analýzy sekretovaných proteinů se zaměřením na studie u bakterií.
- Osvojit si základní metody pro proteomickou analýzu komplexních proteinových směsí (extrakce proteinů a jejich enzymatické štěpení, frakcionace a čištění peptidů, MS analýza, zpracování a vyhodnocení získaných dat).
- Sestavit protokol pro proteomickou analýzu sekretovaných proteinů bakteriálního původu.
- Aplikovat vyvinutou metodiku na proteiny sekretované gramnegativními bakteriemi rodu *Pseudomonas* a diskutovat získané výsledky.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Sekrece

Sekrece je proces, při kterém dochází k řízenému vylučování látek, tzv. sekretů, důležitých pro správnou funkci daného organismu. Tím se liší od exkrece, při které dochází k vyměšování odpadních nebo škodlivých látek. Z chemického hlediska jsou nejčastěji buňkami sekretovány glykolipidy, polysacharidy, aromáty nebo proteiny (například hormony, enzymy atd.). Na sekreci proteinů a její detaily pak bude zaměřen celý následující text.

Nejběžnějším sekrečním mechanismem je exocytóza. Při exocytóze se tvoří tzv. transportní váčky (vezikuly), které obsahují sekret. Vezikuly poté putují k sekrečnímu pólu buňky, kde se jejich membrána spojí s buněčnou membránou a následovně dojde k uvolnění sekretu do mezibuněčného prostoru buňky.



Obrázek č. 1: Exocytóza (převzato z: <http://www.oskole.sk/?idca=7&clanok=17682>)

Z hlediska exocytózy lze u eukaryotických organismů rozlišit dva základní typy sekrece. Prvním typem je tzv. sekrece konstitutivní, při níž buňky za každých okolností v takřka konstantním množství uvolňují proteiny, jako jsou složky mezibuněčné hmoty (kolagen, fibronectin atd.) nebo krevní plazmy (proteiny krevního séra-albumin atd.). Dalším typem je tzv. regulovaná sekrece, při níž se proteiny skladují a koncentrují ve váčcích a uvolňují se z buňky až na základě specifického podnětu. Tímto typem sekrece jsou uvolňovány zejména hormony, trávicí enzymy apod. V případě prokaryotických organismů, a to zejména pro gramnegativní bakterie, hraje důležitou

úlohu vezikulární exocytóza. Celý mechanismus spočívá v odškrcení periplazmy v podobě bakteriálního vezikulu vnější membrány pro translokaci mikrobiálních biochemických signálů do eukaryotických hostitelských buněk (Yashroy 1993) nebo jiných blízkých mikrobu (Kadurugamuwa a Beveridge 1996).

Exocytóza je však pouze terminálním krokem celé sekrece. Podrobněji budou detaily sekrečních drah bakterií popsány v následujících kapitolách.

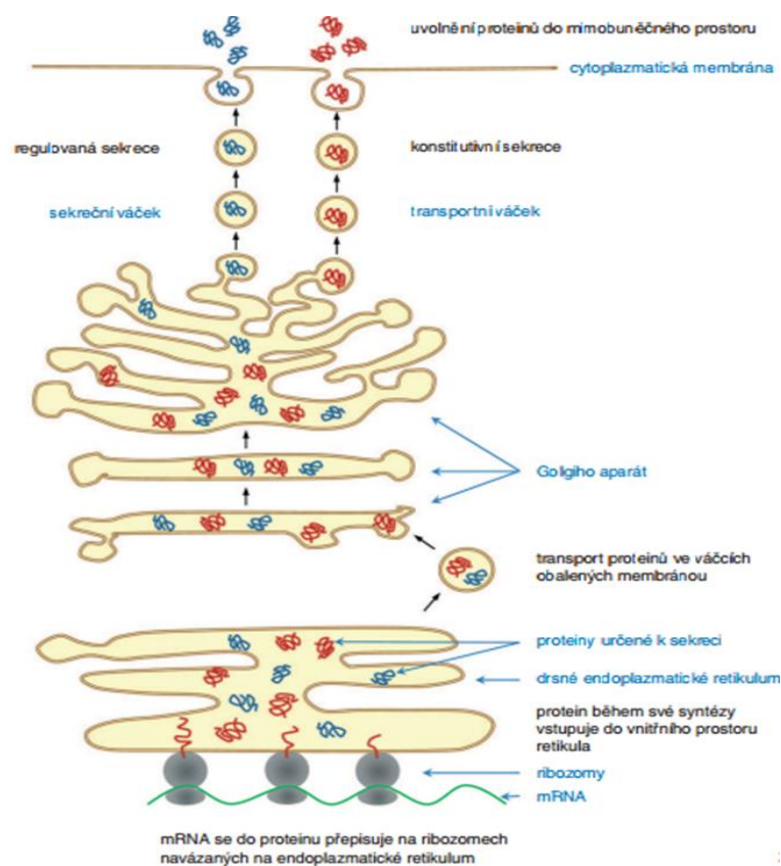
### **3.1.1 Sekrece proteinů u eukaryot**

Eukaryotické organismy jsou na rozdíl od prokaryotických organismů vývojově mnohem mladší, za to jsou ale složitější. Jejich složitost nespočívá jen v přítomnosti organel, které prokaryotické organismy postrádají, ale také v samotné sekreci proteinů, která je předmětem této práce. V eukaryotických buňkách probíhá syntéza proteinů (tzv. proteosyntéza) buď na ribozomech lokalizovaných v cytosolu, anebo může být realizovaná na ribozomech, které se vyskytují na povrchu drsného Endoplazmatického retikula.

Proteiny syntetizované na ribozomech v cytosolu jsou posílány do buněčných organel, jako jsou mitochondrie, peroxizomy, chloroplasty a vnitřek jádra. Naproti tomu proteiny syntetizované na povrchu drsného Endoplazmatického retikula jsou prostřednictvím vezikul transportovány do Golgiho aparátu a následně do jiných buněčných organel (lysozomy, endozómy a do jaderné membrány), anebo jsou sekretovány ven z buňky. Do příslušných míst v buňce jsou proteiny transportovány podle specifických „adresních štítků“ (targeting), kterými jsou u proteinů části jejich aminokyselinové sekvence.

Sekrece proteinů eukaryotických organismů je realizována pomocí sekreční dráhy probíhající přes drsné Endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Celý proces sekrece spočívá v syntéze proteinů na volných ribozomech, jež nesou signální sekvenci (N-terminální sekvenci), která rozpoznává tzv. SRP částici (signal recognition particle). SRP částice je lokalizována v cytosolu a jejím hlavním úkolem je navázat se na signální sekvenci proteinu. Pomocí této částice je protein rozpoznáván SRP receptorem, který se vyskytuje na membráně drsného ER. Touto vazbou se syntéza proteinů dočasně zastaví a celý translační komplex se přesune na membránu drsného ER. Po přisednutí ribozomu na membránu dojde k odpojení SRP receptoru a opět je spuštěna syntéza proteinů.

Vznikající polypeptid putuje skrze translokační kanál, který je tvořený proteinem Sec61 do lumenu ER (Zimmermann a kol. 2011).



Obrázek č. 2: Schéma sekreční dráhy eukaryotických organismů (převzato z: <http://ziva.avcr.cz/2013-2/proteinova-sekrece-bunek-savcu-aneb-jak-si-bunky-povidaji-a-jak-jim-naslouchat.html>)

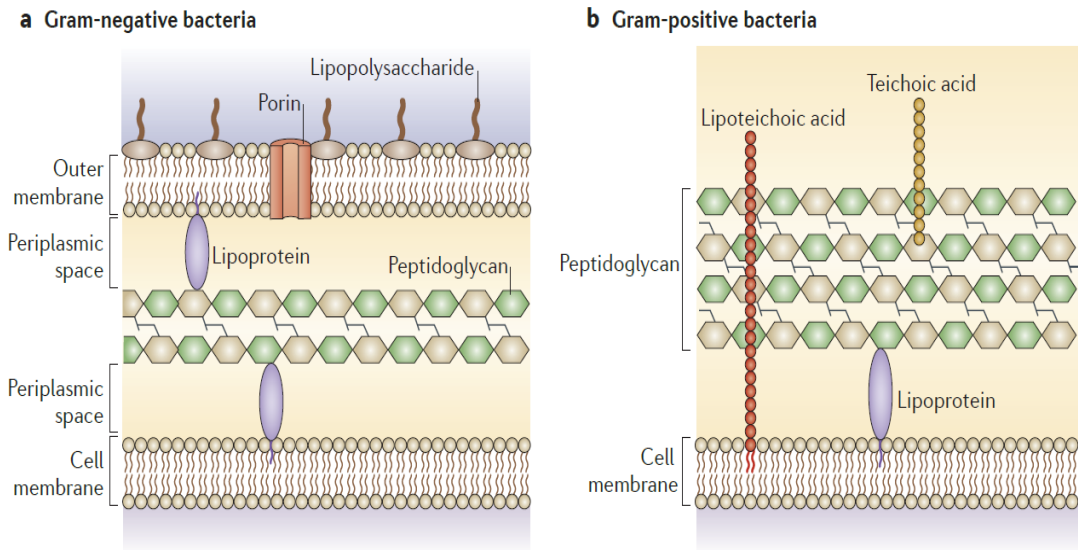
V lumenu ER jsou proteiny upraveny tak, aby získaly správnou strukturu a funkci. Těmito úpravami jsou myšleny tzv. posttranslační modifikace, které dodávají proteinům nové vlastnosti, stabilizují jejich konformaci a pomáhají regulovat jejich funkci. Mezi tyto modifikace patří fosforylace, glykosylace, acetylace, methylace a další. Správně složené proteiny jsou transportovány prostřednictvím váčků, které vznikají odštěpením membrány endoplazmatického retikula. Váčky jsou transportovány do *cis* Golgiho aparátu, který navazuje na Endoplazmatické retikulum. Naopak špatně složené proteiny jsou degradovány pomocí degradační dráhy asociované s endoplazmatickým retikulem (ERAD-endoplasmic reticulum associated degradation). Jejím úkolem je rozeznat tyto proteiny a transportovat je z ER retrotranslokací do cytoplasmy, kde dochází k jejich ubiquitinaci a degradaci v 26S proteazomu (Brodsky 2007; Mancini, Aebi a Helenius 2003). V Golgiho aparátu dochází k syntéze polysacharidů a také zde

pokračuje syntéza glykolipidů, která byla započata už v ER. Především zde ale dochází ke koncentraci produktů, které pochází z ER do tzv. vysoce koncentrovaných sekrečních granul (Langmeier a kol. 2009). Výsledkem úprav v Golgiho aparátu jsou sekreční granula obsahující hotové funkční proteiny. Finální proteiny jsou sekretovány z granul do mezibuněčného prostoru buňky pomocí exocytózy, jak již bylo zmíněno výše.

### 3.1.2 Sekrece proteinů u bakterií

Bakterie patří do skupiny prokaryotických organismů, které jsou evolučně starší a jednodušší. Na rozdíl od eukaryotických organismů se vyznačují menší velikostí. Postrádají buněčné jádro, namísto toho mají kruhovou molekulu DNA, která není oddělena od okolní cytoplazmy membránou. Dále také postrádají buněčné organely, jako je například Endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie, plastidy a jiné. Proteosyntéza u nich probíhá pouze v cytoplazmě na volných ribozomech, které mají jednodušší stavbu ve srovnání s organismy eukaryotického původu.

Stejně jako některé eukaryotické organismy mají i bakterie buněčnou stěnu, ta se ale ve svém složení výrazně liší. Z hlediska její struktury rozlišujeme dvě základní skupiny bakterií: grampozitivní a gramnegativní. Buněčná stěna grampozitivních bakterií má velmi jednoduchou stavbu. Je tvořena silnou vrstvou peptidoglykanu (mureinu), který se skládá ze dvou typů monomerních aminosacharidových jednotek: kyseliny N-acetylmuramové a N-acetylglukosaminu. Tyto jednotky tvoří lineární polysacharidové řetězce (vlákna) spojená pomocí  $\beta$ -(1,4)-glykosidické vazby. Vrstva peptidoglykanu je navíc prostoupena kyselinou teichoovou, která umožňuje peptidoglykanovým vazbám vertikální spojení a tím i vytváří trojrozměrnou síť. Vnitřní vrstva buněčné stěny je tvořena dvouvrstvou fosfolipidů se zabudovanými membránovými proteiny. Vnější membránu grampozitivní bakterie postrádají. Oproti tomu buněčná stěna gramnegativních bakterií se skládá z vnitřní membrány složené z dvouvrstvy fosfolipidů a membránových proteinů. Dále je tvořena tenkou vrstvou peptidoglykanu a především také obsahuje vnější membránu, která se k peptidoglykanům váže prostřednictvím lipoproteinů. Vnější membrána je pak opět tvořena dvouvrstvou fosfolipidů se zabudovanými membránovými proteiny (tzv. poriny). Na zevní straně této membrány se dále nachází lipopolysacharidy, které poskytují těmto bakteriím ochranu proti chemickým látkám a lytickým účinkům některých látek (Bednář a kol. 1996; Votava a Broukal 2007) (Obr. 3).



Obrázek č. 3: Porovnání buněčné stěny (a) gramnegativních a (b) grampozitivních bakterií (převzato z: Brown a kol. 2015)

Na rozdílné stavbě bakteriální buněčné stěny je založeno jedno ze základních barvení používaných v mikrobiologii, které objevil Hans Christian Gram, tzv. Gramovo barvení. Toto barvení se provádí pomocí roztoků jako je krystalová violet a Lugolův roztok (obsahuje jód) s následným promytím prostřednictvím ethanolu nebo acetonu. Grampozitivní bakterie mají, jak už bylo zmíněno výše, ve stěně tlustou vrstvu peptidoglykanu, který brání vymytí vzniklého modrého komplexu (tvořeného krystalovou violetí a jódem) z buňky acetonem. Naproti tomu mají gramnegativní bakterie pouze tenkou vrstvu peptidoglykanu, acetonem se tedy odbarví. Poté se ještě buněčná stěna dobarví safraninem, jenž způsobí u gramnegativních bakterií typické červené zbarvení (Gram 1884).

Vzhledem k tomu, že bakterie nejčastěji žijí v symbióze s jinými organismy, vyvinuly se u nich mechanismy umožňující adhezi, poškození hostitelské tkáně, proniknutí do hostitelského organismu, patogenitu a jejich přežití. Jedním z těchto mechanismů je produkce široké škály vysoce specializovaných makromolekulárních efektorů, které zahrnují například proteiny a DNA. Sekretované proteiny jsou pak jedním z hlavních faktorů bakteriální virulence. Z tohoto důvodu se nedávne studie zaměřily na výzkum sekrečního systému bakterií (Green a Mecsas 2016). Tento výzkum může dopomoci k vývoji nových antimikrobiálních látek a může také minimalizovat vznik lékové rezistence.



V závislosti na vylučovacím systému bakterií mohou sekretované proteiny zůstat spojené s vnější membránou bakterií, dále mohou být uvolňovány do extracelulárního prostoru, anebo mohou být sekretovány do cílové buňky (Costa a kol. 2015).

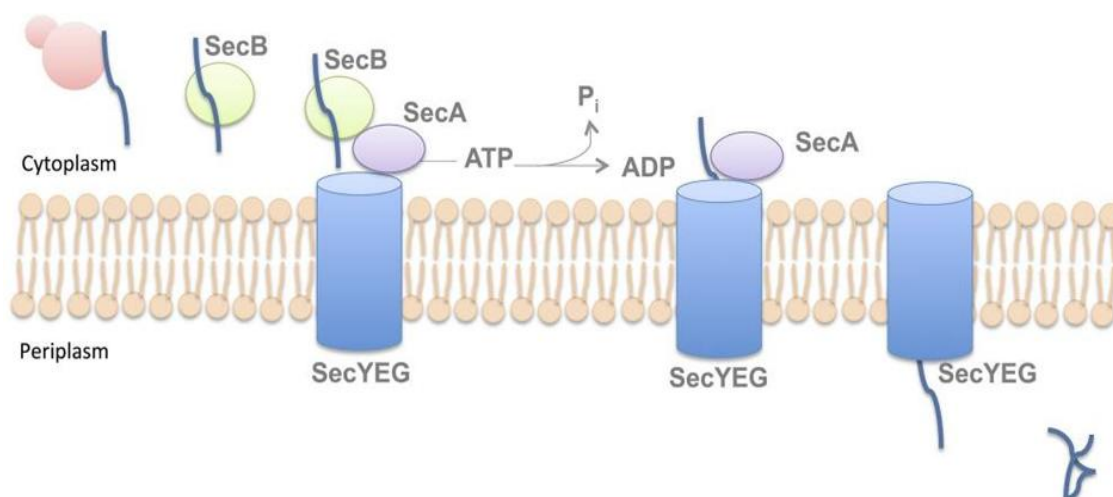
### 3.1.3 Sekreční systémy u grampozitivních bakterií

Vzhledem k tomu, že se grampozitivní bakterie liší svou stavbou buněčné stěny od gramnegativních, lze očekávat i rozdílnou cestu sekrece proteinů. V případě grampozitivních bakterií je pro dopravu proteinů přes cytoplazmatickou membránu do extracelulárního prostoru využito zejména sekrečních drah Sec (Secretory translocase, sekreční translokáza) a Tat (Twin-arginine targeting, translokáza transportující proteiny s motivem zdvojeného argininu) (Costa a kol. 2015; Ball a kol. 2016).

Sekreční dráha Sec představuje jeden z nejstarších mechanismů pro export proteinů, který se vyskytuje ve všech třídách bakterií. Přemísťuje především proteiny, které zatím nebyly poskládány. Tento transportní systém se skládá ze tří částí. Ze složky rozpoznávající sekretovaný protein (SecB), dále z motorového proteinu (SecA) a z kanálu integrovaného v membráně (SecYEG-translokáza). Navíc některé grampozitivní bakterie také produkují tzv. Sec doplňující proteiny, které mají důležitou úlohu při sekreci specifických proteinů. Touto cestou jsou sekretovány proteiny, které podporují virulenci bakteriálních patogenů (tato dráha je přítomná např. u bakterií rodu *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*) (Green a Mecsas 2016; Lenz a kol. 2003).

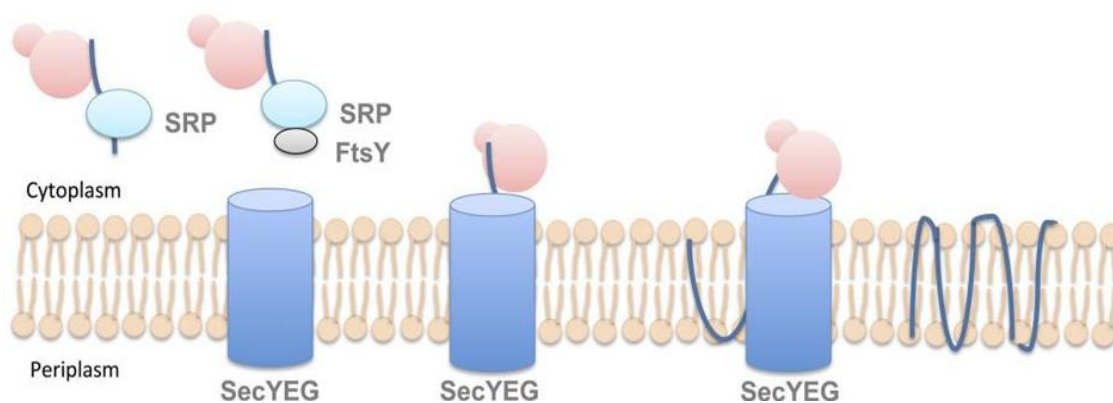
Export zprostředkovaný Sec dráhou je závislý na hydrofobní signální sekvenci na N-konci sekretovaného proteinu, která je obvykle dlouhá 20 aminokyselin a obsahuje tři oblasti: pozitivně nabitý amino-konec, hydrofobní jádro a polární karboxylový konec. Proteiny, které jsou prostřednictvím Sec dráhy sekretovány do periplazmy nebo ven z buňky, obsahují signální sekvenci specifickou pro SecB protein, zatímco proteiny určené k setrvání ve vnitřní membráně obsahují signální sekvenci pro SRP částici (signal recognition particle).

SecB proteiny rozpoznávají specifické signální sekvence a zároveň slouží jako chaperony bránící ve složení proteinů. SecB protein následovně předá své substráty SecA proteinu, který je navázaný na SecYEG proteinový kanál, a za dodání energie ve formě ATP je protein translokován. U proteinů, jenž jsou transportovány do periplazmy, je zprostředkován další transport přes vnější membránu pomocí systému T2SS (Type II secretion system), anebo T5SS (Type V secretion system) (Green a Mecsas 2016).



Obrázek č. 4: Transport sekretovaných proteinů Sec dráhou prostřednictvím SecB proteinu (převzato z: Green a Mecsas 2016)

Proteiny, které setrvávají ve vnitřní membráně, jsou transportovány SRP dráhou. Tyto transmembránové proteiny obsahují hydrofobní domény, které jsou obecně méně stabilní. Z tohoto důvodu SRP dráha využívá mechanismus kotranslačního exportu. SRP částice se váže na cílové proteiny již během translace při opouštění ribozomu a následovně se spojí s FtsY proteinem. Vzniká tak proteinový komplex, jenž se pak váže na SecYEG proteinový kanál, který umožní přechod proteinu do cytoplazmy.



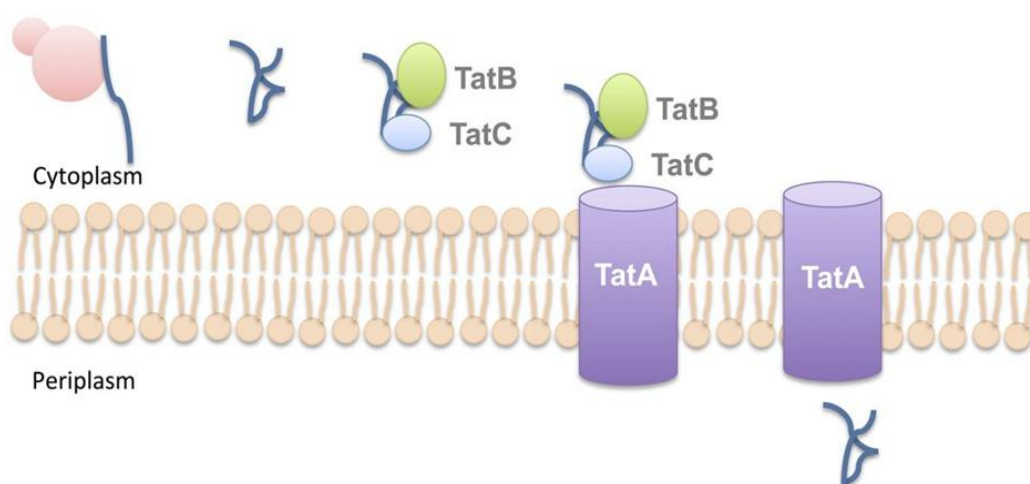
Obrázek č. 5: Transport sekretovaných proteinů Sec dráhou prostřednictvím SRP částice (převzato z: Green a Mecsas 2016)

U sekreční dráhy Sec některých bakterií jako je *Bacillus subtilis* s *Mycobacterium tuberculosis*, byly objeveny tzv. homology SecA1 a SecA2. Funkce homologu SecA1 je nezbytná pro transport většiny sekretovaných proteinů. Naproti tomu SecA2 přenáší

menší podskupinu substrátu a zároveň je zapojen do virulence. Mechanismus této dráhy však ještě není zcela objasněn (Green a Mecsas 2016; Feltcher a Braunstein 2012).

Sekreční dráha Tat oproti Sec dráze vylučuje výhradně složené proteiny. Tento systém ve velké míře převažuje, protože ne všechny proteiny mohou být vylučovány v jejich nesloženém stavu. Tat systém je složen ze tří podjednotek: TatA, TatB, TatC. U grampozitivních bakterií jsou podjednotky TatA a TatB spojeny v jeden multifunkční protein. Tat signální sekvence obsahuje jeden pár argininů na N-konci složeného proteinu.

Mechanismus této sekreční dráhy spočívá v tom, že podjednotky TatB a TatC vážou signální peptid vylučovaných proteinů a následovně se spojí s podjednotkou TatA, která tvoří s membránou spřažený kanál. Zatímco u grampozitivních bakterií je většina proteinů sekretována touto cestou do extracelulárního prostoru, u gramnegativních bakterií (u kterých se tento sekreční systém vyskytuje také) mohou sekretované proteiny buď zůstat v periplasmě, nebo jsou transportovány ven z buňky prostřednictvím sekrečního systému II, viz níže (Green a Mecsas 2016). Pro většinu bakterií je tato cesta důležitá pro správnou fyziologii a přežívání, některé patogenní bakterie, jako je *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner a kol. 2002), *Yersinia pseudotuberculosis* (Lavander a kol. 2006) a *Escherichia coli* (Pradel a kol. 2003), vyžadují funkční Tat dráhu pro virulenci v infekci zvířat (Green a Mecsas 2016).



Obrázek č. 6: Transport sekretovaných proteinů realizovaný Tat dráhou (převzato z: Green a Mecsas 2016)

Dále byl u grampozitivních bakterií popsán sekreční systém T7SS (Type VII secretion system). Ten byl konkrétně objeven u bakterií *Mycobacterium* a *Corynebakterie*. Tyto bakterie jsou charakteristické silnou lipidovou buněčnou stěnou

(mykomembrána), která se nachází na jejich vnějším povrchu. Slouží jako účinná bariéra chránící před vlivy okolního prostředí a také chrání bakterie před antimikrobiálními léčivy. I když se jedná o poměrně nedávno objevený sekreční systém, doposud není znám jeho přesný mechanismus, jakým transportuje proteiny skrz mykomembránu (Green a Meccas 2016; Costa a kol. 2016).

### **3.1.4 Sekreční systém u gramnegativních bakterií**

Mnoho gramnegativních bakterií vylučuje prostřednictvím sekrečního systému virulentní proteiny buď ven z buňky, ale v některých případech mohou být také virulentní proteiny vylučovány přímo do cytoplazmy eukaryotické nebo prokaryotické cílové buňky.

U gramnegativních bakterií je pozoruhodná sekrece extracelulárních proteinů, jelikož musí při sekreci procházet dvěma fosfolipidovými membránami. Některé sekretované proteiny gramnegativních bakterií procházejí skrz bakteriální membrány ve dvou oddělených krocích. Nejprve jsou dodávány do periplazmatického prostoru sekrečními dráhami Sec nebo Tat, tak jak bylo popsáno výše. Poté jsou transportovány přes vnější membránu sekundárními transportními systémy. Tento proces se nazývá Sec nebo Tat dependentní sekrece proteinů. V dalším případě jsou proteiny přenášeny pomocí transmembránových kanálů v procesu známém jako Sec nebo Tat independentní sekrece proteinů.

Sekreci proteinů u gramnegativních bakterií lze rozdělit na systémy sahající přes dvě membrány (I, II, III, VI) a dále na systémy sahající přes jednu membránu (V, chaperone-usheer, Curli) (Costa a kol. 2016).

Sekreční systém typu I (Type I secretion system, T1SS) se vyskytuje u mnoha gramnegativních bakterií, kde jsou jeho substráty transportovány v jedнокrokovém procesu přes vnitřní i vnější bakteriální membránu. Základem sekrečního systému I jsou tzv. ATP vázající transportéry, které se vyskytují ve vnitřní membráně a spadají do tzv. „ATP-binding cassette“ (ABC) superrodiny. ABC proteiny jsou vysoce konzervované a zajišťují transmembránový transport široké škály substrátů jak u organismů prokaryotických, tak eukaryotických. Tyto proteiny jsou složeny ze dvou integrálních membránových kanálů a dvou cytoplazmatických domén, jež hydrolyzují ATP a tím čerpají energii pro aktivní transport substrátu. T1SS ABC transportéry lze rozdělit do tří skupin na základě sekvence jejich N-konce. První třída ABC transportérů obsahuje C39

peptidázovou doménu (peptidase domain-CD), které rozpoznávají a štěpí N-konce substrátů. Příkladem substrátu T1SS ABC transportéru s C39 peptidázovou doménou je kolicin u *E. coli* (Wu a kol. 2004).

Druhá třída ABC transportérů obsahuje obdobnou sekvenci jako první třída. Jedná se o sekvenci C39 like peptidázovou doménu (like peptidase domain-CLD), ta ovšem postrádá proteolytickou aktivitu. Substráty ABC transportérů, které mají CLD, obecně obsahují RTX (repeat in toxin) motiv a jsou mnohem větší než ty, které jsou sekretovány první třídou ABC transportérů. Je zajímavé, že RTX motiv váže vápník na extracelulární, ale ne na intracelulární úrovni. Vzhledem k tomu, že navázání vápníku podporuje ustavení trojrozměrné struktury těchto proteinů, jsou tyto velké substráty schopné zůstat nesložené uvnitř buňky.

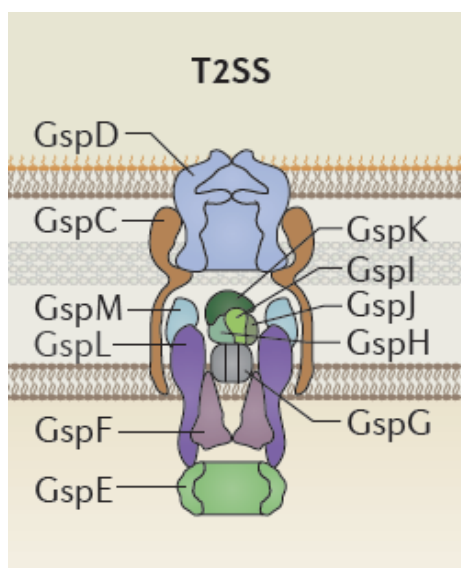
Třetí třída ABC transportérů postrádá další sekvence na své N-koncové části. Jejich substráty mohou, ale nemusí, obsahovat RTX motiv, jenž je menší než u CLD a obsahuje také sekreční signály na svém C-konci.

Všechny ABC proteinové transportéry jsou dále propojeny s dvěma přídavnými proteiny. Jedná se o fúzní protein (membrane fusion protein, MFP), který prochází skrz vnitřní membránu a dále o faktor vnější membrány (outer membrane factor, OMFs). Tyto specializované proteiny společně umožňují překonat periplazmatický prostor a vnější membránu bakteriální buňky v jednom kroku. T1SS substráty přispívají k virulenci u různých bakteriálních patogenů a patří mezi ně například alkalická fosfatáza, která je sekretována bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (van Delden 2004).

Sekreční systém typu II (Type II secretion system, T2SS) se nachází u většiny gramnegativních bakterií a jeho funkcí je transport složených proteinů z periplazmatického prostoru do extracelulárního prostředí. Jelikož se tento systém vyskytuje pouze na vnější straně vnější membrány, musí být nejdříve sekretované proteiny transportovány do periplazmy pomocí dráhy Sec nebo Tat. T2SS systém představuje složitý komplex skládající se z více jak 15 proteinů, které lze rozdělit do čtyř podskupin: vnější membránový komplex, vnitřní membránový komplex, tzv. pseudopilus a sekreční ATPáza. Jak již název napovídá, vnější membránový komplex se nachází na vnější membráně, kde slouží jako kanál, přes který jsou translokovány složené periplazmatické T2SS substráty. Tento kanál je tvořen z multimerického proteinu tzv. sekretinu (GspD) mající dlouhý N-konec. Tento protein se rozprostírá po celém periplazmatickém prostoru a spojuje jej tak s ostatními T2SS proteiny ve vnitřní membráně. Vnitřní membránový komplex se skládá z více kopií proteinů GspC, GspF,

GspL, GspM. Vazbou s GspL proteinem je k vnitřní membráně napojen ještě protein GspE (Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis). Pseudopilus je tvořen malými podjednotkami (pseudopily), které jsou známé jako GspG, GspH, GspI, GspJ, GspK. Pseudopily mezi sebou polymerizují a tím vytvářejí dynamický komplex, jenž jako píst tlačí proteiny přes vnější membránu sekretinu (Reichow a kol. 2010). Polymerizace pseudopilu je zajištěna ATPázovou aktivitou GspE. Sekreční ATPáza je pak lokalizována v cytoplazmě a poskytuje především energii pro celý sekreční systém (Green a Meccas 2016).

U některých typů gramnegativních bakterií slouží T2SS k sekreci pouze několika specifických proteinů, zatímco u jiných druhů má tento systém širokou specifitu a je schopen sekretovat rozmanité spektrum substrátů, z nichž některé také přispívají k virulenci bakteriálních patogenů. Jako příklad může být uveden exotoxin A z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* blokující syntézu proteinů v hostitelských buňkách, což může vyvolat letální infekci (Green a Meccas 2016). Další patogeny (u *E. coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Aeromonas hydrophila*) využívají tento sekreční systém k sekreci enzymů pomáhající adaptaci na vnější prostředí. Jedná se zpravidla o enzymy, jako jsou proteázy, lipázy a fosfatázy (Green a Meccas 2016).



Obrázek č. 7: Sekreční systém typu II (převzato z: Costa a kol. 2015)

Sekreční systém typu III (Type III secretion system, T3SS) není výlučně spojen pouze s bakteriální patogenitou. Může se podílet i na symbiotických interakcích, jako příklad lze uvést symbiózu bakterie *Rhizobium* s kořeny luštěnin (Büttner 2012). Tento

systém dále vylučuje širokou škálu proteinových substrátů přes vnitřní i vnější membránu. Kromě toho také transportuje substráty přes membránu hostitelské buňky, a proto se tento systém označuje jako tzv. „injektisom“. Transport proteinu je tak uskutečněn přes tři membrány v jednom kroku s výjimkou u bakterií rodu *Yersinia*.

Jádro sekrečního systému T3SS je složeno z devíti proteinů tvořících tři hlavní části: základní komplex, jehlu a translokon. Základní komplex protíná obě bakteriální membrány a jeho vnitřkem prochází jehla sahající do extracelulárních prostorů. Vnitřní část jehly má duté jádro, které je dostatečně široké pro průchod nesloženého proteinu. Translokon, který je lokalizovaný v cytosolu, je pak nezbytný pro přenos efektorových proteinů přes hostitelskou membránu.

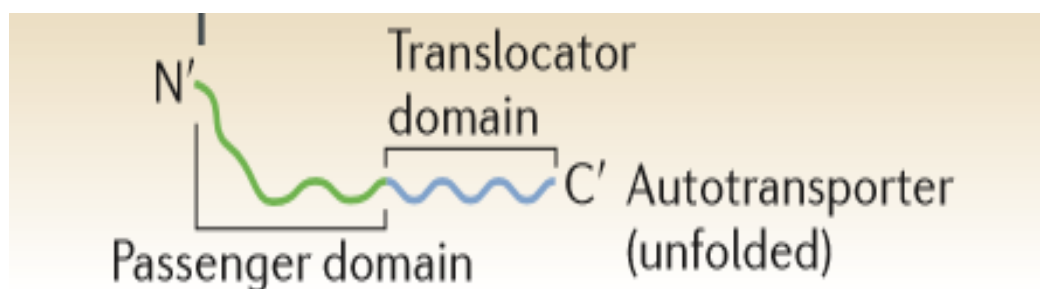
Tento sekreční systém (známý jako YSC-YOP „TYPE III“) navíc umožňuje *Yersinia pestis* sekretovat proteiny zvané Yops (*Yersinia* outer proteins) do makrofágů a dalších buněk imunitního systému. T3SS se skládá z několika složek. Ve vnější membráně je lokalizovaný protein YscC, který zde tvoří dodekamerní pór. Dále proteiny YscD a YscJ tvoří pór ve vnitřní membráně (MS ring). Společně tyto proteiny vytvářejí kostru zakotvenou v peptidoglykanové vrstvě. Nejdůležitější komponentou tohoto systému je jehla, která prochází skrz vnitřní a vnější membránu. Jehla je složena ze čtyř proteinů (YscF, YscO, YscP, YscX), z nichž je nejdůležitější YscF. Jehlou jsou poté sektetovány proteiny, které jsou transportovány do pórů hostitelské membrány. Tyto póry jsou tvořeny proteiny YopB a YopD a zároveň zodpovídají za rozpad buňky (cytolýza). Sekrece proteinů je poháněna pomocí ATPázové aktivity prostřednictvím tzv. YscN proteinu. Ten se vyskytuje na bazální straně vnitřní membrány (Diepold a kol. 2010).

T3SS substráty jsou obecně považovány za efektorové proteiny, jejichž translokace do hostitelské buňky je nezbytná pro virulenci mnoha patogenů, jako jsou *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*. Příkladem efektorových proteinů jsou IpaB a IpaH 7.8 u bakterie *Shigella* (Coburn a kol. 2007), dále SipA, SopA, SopB, SopD a SopE2 u bakterie *Salmonella enterica* (Giacomodonato a kol. 2007).

Sekreční systém typu VI (Type VI secretion system, T6SS) byl objeven poměrně nedávno. Proteiny jsou zde translokovány do různých buněk. Příjemcem je běžně jiná bakteriální buňka, ale může to být i buňka eukaryotická. Tento systém umožňuje transport efektorových proteinů z jedné bakterie do druhé, který je zprostředkovaný kontaktem. Předpokládá se, že tak hraje důležitou roli v bakteriální komunikaci a interakci s vnějším prostředím (Costa a kol. 2015).

T6SS je svou stavbou analogií bakteriofága lambda T4. Skládá se z 21 proteinů, z nichž se 13 (Hcp, VgrG, TssB/TssC, TssE, TagL/TssL, TssJ, TssM, TssA, dvě kopie TssF, TssK) vyskytuje u všech druhů bakterií. Tento systém je složen ze dvou komplexů, tzv. koncového a membránového. Koncový komplex zasahuje hluboko do bakteriální cytoplazmy a na povrch buňky je ukotven prostřednictvím membránového komplexu. Součástí koncového komplexu jsou Hcp proteiny vytvářející dutý válec, který je pokryt pláštěm z proteinů TssB a TssC. Na konci válce se ještě nachází špice tvořená proteinem VgrG, který obsahuje tzv. doménu PAAR (prolin-alanin-alinin-arginin repeats). VgrG/PAAR komplex usnadňuje proniknutí skrz membránu hostitelské buňky (Bönemann a kol. 2009). S VgrG proteinem jsou spojeny substráty a kontrakcí Hcp proteinů dojde k sekreci substrátu mimo bakteriální buňku. Celý systém je následně degradován ClpV proteinem.

Mezi systémy sahající přes jednu membránu patří zejména sekreční systém typu 5 (Type V secretion system). Tento systém, také známý jako autotransportérový, je jedinečný v tom, že substrát a jeho sekreční pór jsou spojeny tak, že tvoří dohromady jeden funkční polypeptid. Tento polypeptid tak může řídit vlastní sekreci skrz vnější membránu a odtud vznikl název autotransportér (Costa a kol. 2015). Autotransportéry jsou složeny ze sekrečních domén nazývané jako „passanger“ doména, která se vyskytuje na N-konci. Dále se autotransportéry skládají z transmembránové domény, nazývané jako translokátorová doména vyskytující se na C-konci.

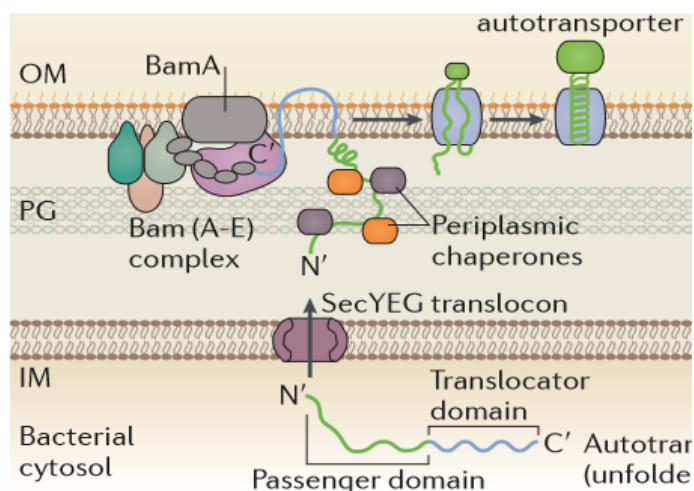


Obrázek č. 8: Schéma autotransportéru (převzato z: Costa a kol. 2015)

Vzhledem k tomu, že je sekrece proteinů u tohoto systému realizovaná pouze ve vnější membráně, musí být proteiny nejprve translokovány přes vnitřní membránu do periplazmy pomocí sekreční dráhy Sec prostřednictvím translokonu SecYEG (Green



a Mecsas 2016). Aby mohl být transport uskutečněn, musí navíc autotransportér obsahovat na N-konci signální sekvenci Sec, která je následovně odštěpena při průchodu translokonem (SecYEG) do periplazmy (van Ulsen a kol. 2014). Po transportu přes vnitřní membránu je autotransportérový polypeptid udržován v nesloženém stavu pomocí periplazmatických chaperonů (Costa a kol. 2015). Další nezbytnou součástí tohoto systému je tzv. Bam komplex, který se skládá z integrálních proteinů BamA a čtyř lipoproteinů označovaných jako BamB, BamC, BamD, BamE. Hlavním úkolem Bam komplexu je zprostředkovat vložení translokátorové domény do vnější membrány, kde se složí do tzv.  $\beta$ -barelu. „Passenger“ domény jsou pak transportovány skrz  $\beta$ -barel, kde se složí do  $\beta$ -šroubovice (Costa a kol. 2015).



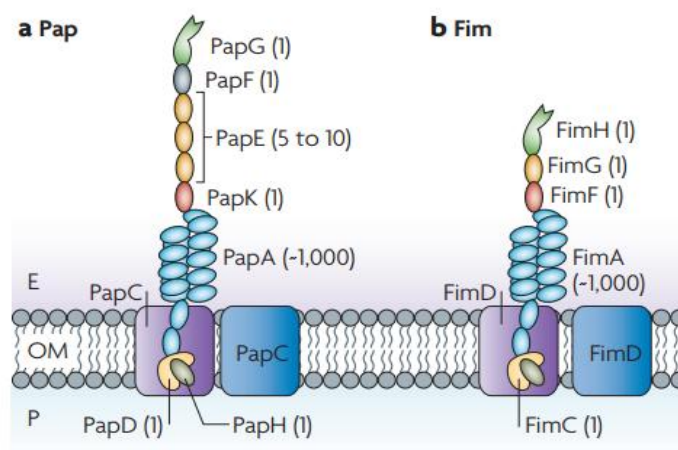
Obrázek č. 9: Schéma sekrečního systému T5SS (převzato z: Costa a kol. 2015)

Nejnámějšími substráty T5SS jsou proteiny, které slouží jako toxiny a proteiny vázající receptory (Costa a kol. 2015). Jako příklad může být uveden IscA protein, jenž je vylučován bakterií *Shigella flexneri* (Brandon a kol. 2003), který podporuje intracelulární pohyblivost založenou na aktinu a také slouží jako adhezín (Zumsteg a kol. 2014).

Dalším systémem sahajícím pouze přes jednu membránu je tzv. bakteriální chaperon-usher systém. Používá se k sestavování a vylučování pilů nebo fimbrií, které umožňují rozpoznání a připojení se k hostitelským buňkám. Tím přispívají k patogenitě a tvorbě biofilmu (Wright, Seed a Hultgren 2007). Nejlépe charakterizované chaperone-usher systémy jsou pro typy: I pili a P pili, které využívají uropatogenní bakterie ke kolonizaci a infekci močového traktu (Lillington, Geibel a Waksman 2015).

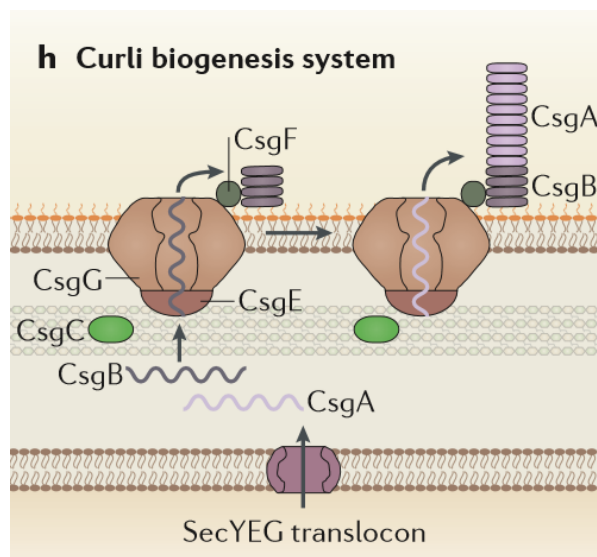
Hlavní součástí tohoto systému je pilus připomínající šroubovici. Ta je složena z několika set pilusových podjednotek. Pro typ I pili se jedná o podjednotky FimA, FimF, FimG a FimH. Naproti tomu se pilus typu P pili skládá z PapA, PapE, PapG, PapF, PapK, FimH a PapG tvoří špičku jednotlivých typů pilů, jejichž součástí je N-terminální lektinová doména, která hraje klíčovou roli v rozpoznávání hostitelských buněk.

Aby došlo k vytvoření jednotlivých typů pilů, musí dojít ke transportu jednotlivých pilusových podjednotek prostřednictvím translokonu SecYEG, který je lokalizovaný ve vnitřní membráně. Tyto podjednotky jsou přeneseny do periplazmy, ve které se nachází v rozvinutém stavu. Následovně jsou podjednotky složeny a stabilizovány prostřednictvím periplazmatického chaperonu: FimC pro typ I pili a PapD pro P pili. Vzniklé komplexy jsou následovně přeneseny na vnější membránu, kde se nachází tzv. usher protein (FimD pro I pili a PapC pro P pili), která katalyzuje polymerizaci pilusových podjednotek a zprostředkovává sekreci pilusu (Costa a kol. 2015).



Obrázek č. 10: Chaperone-usher systémy typu P pili a I pili (převzato z: Waksman 2009)

Posledním typem systému sahajícího přes jednu membránu je tzv. Curli. Tento systém je tvořen proteinovými podjednotkami CsgA, CsgB, které musí být nejprve translokovány do periplazmy opět pomocí translokonu SecYEG. Dalšími proteinovými podjednotkami jsou CsgC, CsgE, CsgF a CsgG, které tvoří kanál. Tímto kanálem poté prochází vlákna proteinových podjednotek CsgA a CsgB, jež pak na vnější straně membrány polymerizují v tzv. curli fibres (Costa a kol. 2015).



Obrázek č. 11: Sekreční systém Curli (převzato z: Costa a kol. 2015)

Jelikož předmětem studia této bakalářské práce byly proteiny sekretované bakteriemi rodu *Pseudomonas* a k tomuto účelu byly vybrány metody spadající do oboru zvaného proteomika, budou následující kapitoly věnovány právě tomuto modernímu odvětví bioanalytické chemie.

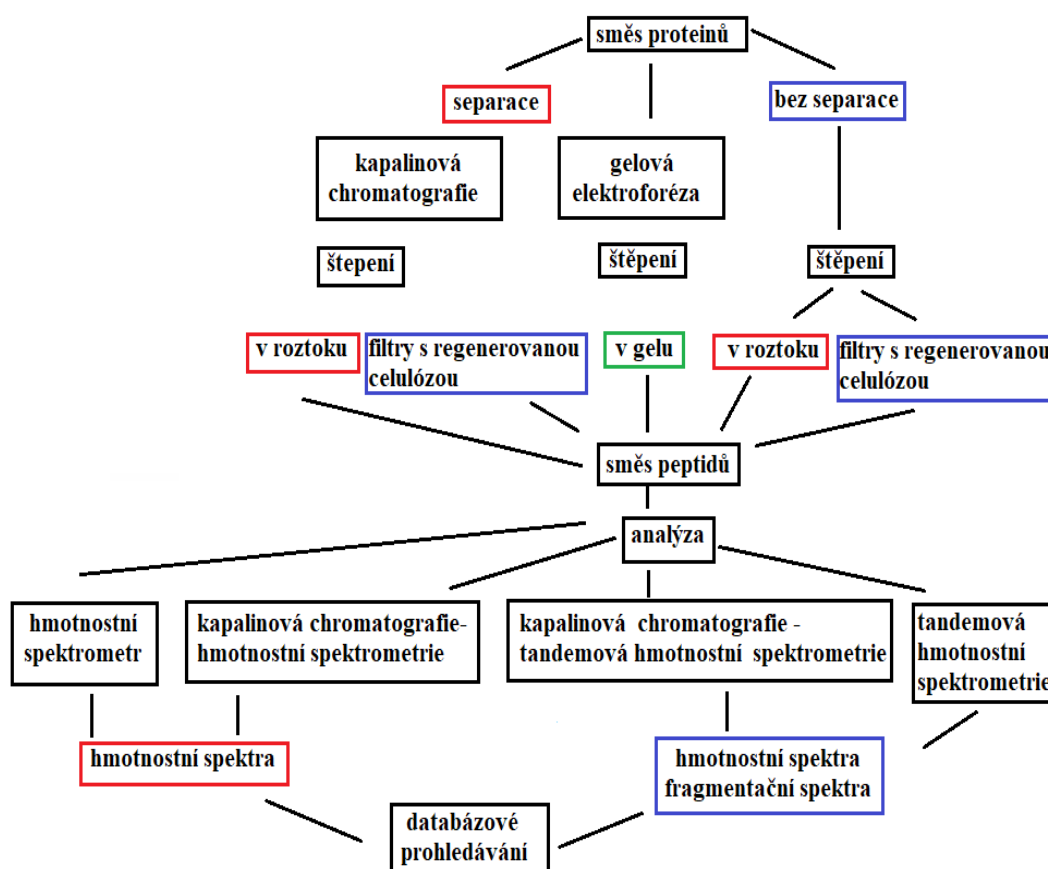
### 3.2 Proteomika

Proteomika je vědní obor, který zkoumá biologické procesy na úrovni proteinů. Zabývá se proteiny z hlediska jejich identity, kvantity, struktury, funkčních vztahů a dále také zkoumá jejich protein-proteinové interakce včetně charakterizace posttranslačních modifikací. Mezi ně patří například fosforylace, acetylace, glykosylace, hydroxylace a metylace hrající velmi důležitou roli v buněčných procesech (Aebersold a Mann 2016; Walsh, Garneau-Tsodikova a Gatto 2005). V současné době je proteomika považována za jednu z nejdynamičtějších vědeckých disciplín (Jensen 2006).

#### 3.2.1 Metody používané v moderní proteomice

V současné době se v proteomice pro izolaci, charakterizaci a identifikaci proteinů používají především tři typy bioanalytických metod. Mezi ně patří elektroforetické a chromatografické metody, jenž slouží hlavně k separaci proteinů, ale mohou také poskytovat informace o jejich kvantitě. Dalším hojně využívaným typem bioanalytických metod jsou metody hmotnostní spektrometrie, která navíc oproti předešlým technikám umožňuje i identifikaci jednotlivých proteinů. Tyto metody je pak možné kombinovat

podle následujícího schématu (Obr. 12) a jejich nejpopulárnějšími variantám budou věnovány následující odstavce.



Obrázek č. 12: Schéma přípravy proteinů pro MS analýzu

V roce 1970 švédský biochemik Ulrich Laemmli modifikoval elektroforetickou separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu přidáním dodecylsírany sodného (SDS). Laemmli použil SDS jako silný aniontový detergent, který způsobuje rozvolnění trojrozměrné struktury proteinů a udílí jim jednotný záporný náboj. Z tohoto důvodu proteiny migrují k anodě skrz póry polyakrylamidového gelu rychlostí nepřímo úměrnou jejich velikosti a jsou tak rozděleny podle jejich molekulové hmotnosti (Laemmli 1970). Vzhledem ke své jednoduchosti a robustnosti se tato separační technika stala velmi populární a široce používanou metodou dodnes v biochemii, forenzní genetice, molekulární biologii a v neposlední řadě právě v proteomice.

O pět let později byla zavedena další elektroforetická metoda pro separaci proteinů, poskytující lepší rozlišení. Jedná se o kombinaci izoelektrické fokuse a SDS-PAGE označovanou jako dvoudimenzionální elektroforéza (2-DE). Touto technikou jsou

proteiny nejprve rozděleny na základě jejich izoelektrického bodu v prvním rozměru a poté podle jejich molekulové hmotnosti ve druhém rozměru (O'Farrel 1975). 2-DE byla také první metodou, která umožnila porovnání obsahu jednotlivých proteinů v komplexních vzorcích, a tak i položila základ pro moderní diferenční proteomiku. Tato metoda byla následně ještě zdokonalena o aplikaci fluorescenčních značek (Cy2, Cy3, Cy5), jenž byla publikována skupinou Jona Mindena (Unlü, Morgan a Minden 1997) a pojmenována jako diferenční gelová elektroforéza (DIGE). Princip této metody spočívá v tom, že se jednotlivé fluorescenční značky liší svou vlnovou délkou excitovaného a emitovaného světla, tím pádem umožňují současnou separaci až tří proteinových vzorků na jednom gelu. Na rozdíl od 2-DE poskytuje tato metoda nižší variabilitu a tím se i zvýšila lepší opakovatelnost analýz.

Další přístup separace proteinů nevyužívá pohybu nabitých molekul v elektrickém poli, ale rozdílné distribuce látek mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Jedná se o metody chromatografické separace, jejichž nespornou výhodou je možnost přímého propojení (on-line) s MS (Yates, Ruse a Nakorchevsky 2009).

Obecně může být mobilní fází kapalina nebo plyn, v případě separace proteinů a peptidů se však jako mobilní fáze používá téměř výhradně kapalina. Pro separaci proteinů a peptidů se tak z chromatografických technik nejběžněji používá kapalinová chromatografie (LC).

Kapalinová chromatografie může mít různá provedení. Lze ji rozdělit na základě použitého tlaku a to na nízkotlakou, střednětlakou a vysokotlakou (vysoceúčinnou). Dále ji lze dělit podle uspořádání stacionární fáze, kdy rozlišujeme sloupcovou (kolonovou) nebo planární (tenkovrstevnou či papírovou) chromatografii.

Nejběžnější je však dělení podle charakteru stacionární fáze. Nejčastěji používanými stacionárními fázemi pro kapalinovou chromatografii proteinů jsou molekulární síta, iontoměniče a afinitní matrice. Molekulární síta využívají pro dělení analytu efektů permeace a exkluze, kdy se separované molekuly dělí na základě jejich rozdílných rozměrů. Iontoměničem je makromolekulární matrice (například polystyren, celulóza, dextran a jiné), která nese funkční skupiny kyselé nebo zásadité povahy. Tyto funkční skupiny tak mohou vlastní protiont vyměňovat s iontem, který je obsažen v mobilní fázi. Afinitní chromatografie je založena na použití imobilizovaného ligandu, který specificky interaguje s proteinem, jenž má být purifikován. K takto připravené afinitní stacionární fázi se přidá směs proteinů, z nichž se navážou jen ty, které tvoří s ligandem silnou vazbu. Zbytek směsi pak proteče kolonou bez zachycení.

Pro separaci peptidů pomocí kapalinové chromatografie se kromě výše zmíněných stacionárních fází využívají často také reverzní fáze (reversed-phase chromatography). Chromatografie s reverzní fází využívá hydrofobní stacionární fázi. Dále se například uplatňuje metoda HILIC (hydrophilic interaction liquid chromatography), která na rozdíl od chromatografie s reverzní fází používá hydrofilní stacionární fázi. Mezi další chromatografické metody se řadí i ERLIC (electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography), která je variantou metody HILIC. Využívá elektrostatického efektu k lepší separaci.

Další technikou, která se hojně využívá pro čištění peptidů před samotnou MS analýzou, je separace na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE), která se nejčastěji provádí s reverzní fází C18.

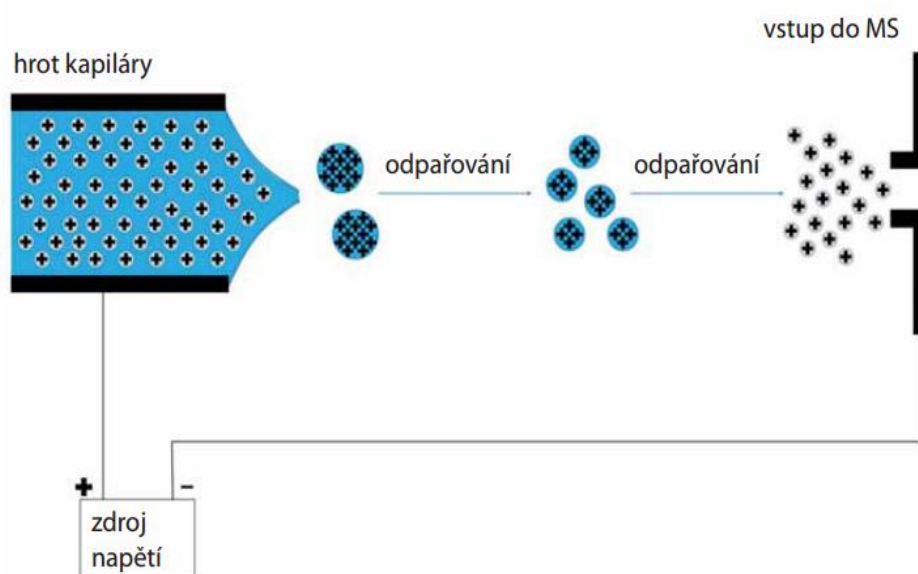
Tyto techniky však neposkytovaly informace o identitě proteinů. Vědci k tomuto účelu nejprve používali takzvané Edmanovo odbourávání (Edman 1949). Princip této metody spočívá v určování sekvence proteinů postupným odbouráváním jednotlivých aminokyselin od N-konce pomocí fenylisothiokyanátu. Avšak k výraznému rozvoji proteomiky přispěl až objev hmotnostní spektrometrie (MS). Jedná se o analytickou metodu, která umožňuje identifikaci proteinů a peptidů v komplexních biologických vzorcích s vysokou citlivostí detekce dosahující až  $10^{-15}$  mol (Mallick a Kuster 2010). Tato metoda byla postupem času obohacována o další přínosné techniky, mezi něž patří především ionizace laserem za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption ionization-MALDI) a ionizace elektrosprejem (electrospray ionization-ESI), za jejichž vývoj byla jejím objevitelům Koichi Tanakovi a Johnu Benettu Fennovi udělena v roce 2002 Nobelova cena za chemii. Tyto ionizační techniky totiž umožňují analýzu i netěkavých makromolekul, zejména proteinů a nukleových kyselin (Takana a kol. 1988; Fenn a kol. 1989).

Podstatou MS analýzy je přesné určení molekulové hmotnosti analyzovaných molekul, respektive jejich fragmentů. Hmotnostní spektrometr se skládá z ionizačního zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Při měření je pak nutné převést analyty do plynného stavu pomocí měkkých ionizačních technik, které byly zmíněny výše.

Při ionizaci za účasti matrice jsou vzorky nanášeny na ocelovou MALDI destičku. K nanášeným vzorkům obsahující peptidy se nejčastěji přidává jako matrice kyselina 2,5-dihydroxybenzoová nebo kyselina  $\alpha$ -kyano-4-hydroxybenzoová. Po přidání matrice dojde ke kokrystalizaci peptidů s použitou maticí. Takto připravená destička je umístěna

do iontového zdroje. Následně je vzorek ozářen pulzním laserem, jenž způsobí ionizaci molekul vzorku a jejich uvolnění do plynné fáze.

Další měkkou ionizační technikou je ESI, která se používá ve spojení s vysoceúčinnou kapalinovou chromatografií (LC-ESI). Při ESI je na hrot sprejovací kapiláry přivedeno vysoké napětí 2-6 kV (Yates, Ruse a Nakorchevsky 2009), tím dochází k vytvoření nabitých kapiček analytu obalených rozpouštědlem. V důsledku postupného odpařování rozpouštědla se postupně uvolní vytvořené ionty, které jsou elektricky usměřňovány na vstup do hmotnostního spektrometru (Obr. 13).



Obrázek č. 13: Schéma převedení kapalné fáze analytu na plynnou fázi pomocí ESI (převzato z: Dvořáková, Hernychová, Vojtěšek 2014)

Pro proteomické účely se používají následující analyzátory. Ve spojení s MALDI se nejčastěji používají time of flight detektory (MALDI-TOF). Jedná se o analyzátory podle doby letu, které jsou založeny na určení přesné hmoty daného iontu podle doby, za kterou proletí od zdroje k detektoru (Yates, Ruse a Nakorchevsky 2009). Dalším hojně využívaným typem hmotnostních analyzátorů je iontová past, kam jsou ionty přivedeny krátkými pulzy napětí. Vhodným poměrem napětí vloženého na kruhovou a dvě koncové elektrody jsou pak ionty zadrženy uvnitř pasti a postupnou změnou napětí jsou podle jejich  $m/z$  (hmotnost/náboj) vypuzovány na detektor. Dále může být jako analyzátor používán trojitý kvadrupól. Tento analyzátor se skládá ze tří kvadrupólů řazených za sebou. Prostřední analyzátor ( $q_2$ ) slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem způsobujícím excitaci vybraných iontů prvním kvadrupólovým analyzátozem ( $Q_1$ ) a

jejich následnou fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány třetím kvadrupólovým analyzátozem (Q3). Díky opakovaným srážkám iontů s kolizním plynem je pozorováno více fragmentových iontů než u MS / MS měření s iontovou pastí. Dalším známým analyzátozem je Orbitrap, který vynalezl Alexander Makarov (Makarov a kol. 2005). Do orbitrapu jsou ionty vstříkovány kolmo na osu přístroje mezi vnější a vnitřní elektrodu. Ionty s vhodným poměrem  $m/z$  a kinetickou energií jsou zachyceny a pohybují se po dráze kolem vnitřní elektrody. Frekvence kmitajících iontů indukují proud, který je měřen v závislosti na čase a následnou Fourierovou transformací je zjištěn poměr  $m/z$  (Bier 2010).

Proteomika v současné době používá pro charakterizaci a identifikaci proteinů dva přístupy. Nejčastěji používaným přístupem je enzymatické štěpení proteinů na peptidy a jejich následnou MS analýzou, takzvaný bottom-up přístup. Štěpení může být realizováno buď v gelu (in-gel) nebo v roztoku (in-solution). Druhý přístup představuje top-down analýza, kdy není prováděno enzymatické štěpení, a pracuje se tak s intaktními proteiny (Aebersold a Mann 2016). V tomto textu se dále zaměříme na detaily přípravy proteinů pro frekventovanější bottom-up analýzu.

Jestliže je prováděno štěpení proteinů v gelu, je nutné provést elektroforetickou separaci proteinů, nejběžnější je použití SDS-PAGE. Separované proteiny jsou následně vyříznuty z gelu. Pro efektivnější štěpení proteinů na peptidy je nezbytné rozrušení třídídimenzionální struktury proteinů, která drží pohromadě prostřednictvím disulfidických můstků, aby došlo k zpřístupnění maximálního počtu štěpných míst. Toho lze dosáhnout přidáním redukčního činidla, například dithiotreitolu. Poté je třeba provést alkylaci volných cysteinových zbytků pro zabránění opětovné tvorby disulfidických můstků vlivem oxidace kyslíkem, který je přítomen ve vzduchu (Boja a Fales 2001). Po redukci a alkylaci jsou proteiny štěpeny proteázou. Hojně využívanou proteázou je trypsin, který štěpí proteinový řetězec za aminokyselinami argininem a lysinem směrem k C-konci (Aebersold a Mann 2016).

Druhým přístupem je in-solution štěpení, které umožňuje štěpit komplexní směs proteinů přímo v roztoku. Pro denaturaci proteinů jsou zde nejprve používána silná chaotropní činidla, zejména močovina. Poté je stejně jako u štěpení v gelu provedena redukce, alkylace a proteolytické štěpení. Takto upravené analyty mohou být podrobeny MS analýze.



### 3.2.2 Bakteriální proteomika

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, které se společně s archea řadí do říše prokaryota. Jsou evolučně starší a jednodušší než eukaryota, ale přesto představují unikátní modelové organismy, které se dají použít pro studium řady základních biologických procesů. Jejich neodmyslitelná výhoda spočívá především v jejich krátké generační době, vysokém počtu jedinců v populaci a snadné kultivaci. Mimo jiné nachází uplatnění v biotechnologickém průmyslu pro velkovýrobu různých proteinů a vakcín. Bakterie také představují významné patogeny způsobující závažná onemocnění člověka a zvířat.

Bakteriální proteomika se v dnešní době ubírá čtyřmi směry. V první řadě se jedná o výzkum patogenních mikroorganismů, kde se zkoumá molekulární mechanismus patogenicity a identifikují se virulentní faktory. Do tohoto směru lze zahrnout i studium sekretovaných proteinů. Princip molekulárních mechanismů patogenicity byl vysvětlen například na proteomu patogenní bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, jenž je původcem závažného infekčního onemocnění - tuberkulózy. Záměrem tohoto výzkumu bylo porovnávání rozdílů mezi dvěma virulentními kmeny *Mycobacterium tuberculosis* s dvěma nevirulentními kmeny *Mycobacterium bovis*. U *Mycobacterium tuberculosis* byly objeveny kandidátní proteiny, které by se daly využít pro vývoj vakcín dále v diagnostice a při terapii (Jungblut a kol. 1999).

V druhé řadě jsou bakterie důležité pro řadu biologických procesů. Příkladem může být anaerobní digesce, při níž dochází k rozkladu organické hmoty bez přístupu vzduchu za vzniku bioplynu a digestátů v zemědělství. K tomu účelu se běžně používají bakterie z rodu *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Azotobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Mycobacterium* a jiné.

Dále se zabývá studiem interakcí mezi hostitelem a bakterií. Například u nepatogenních bakterií *Francisella tularensis* a *Neisseria meningitidis* byly objeveny proteiny, které se podílejí na jejich pronikání do hostitelské buňky (Havlasová a kol. 2002, Grifantini a kol. 2002). Tento příklad ovšem může spadat i do studia molekulárních mechanismů patogenicity a virulentních faktorů. Trendem dnešní doby je studium proteomu lidské střevní mikroflóry. Hlavním cílem studia střevní mikroflóry je pochopení vlivu bakterií na zdraví člověka. V rámci střevní mikroflóry byly porovnávány proteiny u dětí trpících diabetem typu I se zdravými dětmi. Pomocí 2-DE elektroforézy vědci objevili výrazné rozdíly ve střevním proteomu mezi zdravými a nemocnými jedinci. Střevní mikroflóra dětí s diabetem typu I byla obohacena o proteiny z clastru

bakterií *Clostridium*. Naopak proteom zdravých dětí obsahoval pouze bifidobakteriální proteiny. Výsledky této studie přispívají k hlubší znalosti funkce střeva u osob s tímto onemocněním a mohou také poskytnout nové přístupy ve zlepšení kontroly tohoto onemocnění (Pinto a kol. 2017).

Bakteriální proteomika přispívá také výraznou měrou k řešení jednoho ze zásadních problémů v medicíně, kterým je široce rozšířená rezistence většiny patogenních mikroorganismů k antibiotikům (Cash a kol. 1999). Existují dva druhy rezistencí. V prvním případě jde o primární rezistenci, která je podmíněna genetickou necitlivostí bakterií na dané antibiotikum. Jedná se například o antibiotika narušující syntézu bakteriální buněčné stěny, která jsou primárně neúčinná vůči mykoplazmám, jež buněčnou stěnu vůbec nemají. Příkladem mohou být některé gramnegativní bakterie (například *Pseudomonas aeruginosa*), které jsou ve srovnání s grampozitivními méně citlivé na antibiotikum penicilin. Naproti tomu sekundární rezistence vzniká až v průběhu antibiotické terapie, nebo je následkem opakovaného podávání antibiotik.

K objasnění vzniku rezistence byly použity některé proteomické techniky. Například skupinou Jinsonga Zhoua byl vysvětlen vznik rezistence u bakterie *Pseudomonas aeruginosa* vůči Ciprofloxacinu patřícímu do skupiny chinolonových antibiotik. Tohoto objevu docílili za využití 2-DE a LC-MS (Zhou a kol. 2006). Dalším příkladem bylo využití kvantifikace iTRAQ spolu s 2D-LC-MS/MS při zkoumání rezistence bakterie *Clostridium difficile* vůči antibiotiku Metronidazolu. Výsledky naznačují, že multifaktoriální odpověď může být spojená s vysokou úrovní rezistence *Clostridium difficile* k Metronidazolu včetně možné role ve změně metabolismu železa nebo ve změnách reparace DNA (Chong a kol. 2014). Dále v roce 2006 byla použita 2-DE elektroforéza s MS/MS analýzou při studiu rezistence bakterie *Streptococcus pyogenes* k penicilinu (Chaussee a kol. 2006). Bylo zjištěno, že rezistence je umožněna změnami v cytoplazmatické membráně proteomu bakterie *Streptococcus pyogenes*.

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1 Použité chemikálie

2-D Quant Kit (GE Healthcare, Velká Británie), 2-merkaproethanol (Sigma, USA), 2-propanol (Sigma, USA), aceton (Sigma, USA), acetonitril (ACN) (Sigma, USA), akrylamid (AA) (Serva, Německo), bromfenolová modř (Serva, Německo), Coomassie Blue Brilliant G-250 (Serva, Německo), dithiotreitol (Serva, Německo), dodecylsírán sodný (SDS) (Serva, Německo), dusičnan stříbrný (Lachner, Česká Republika), ethanol (Merck, Německo), formaldehyd (Sigma, USA), glycerol (Serva, Německo), iodoacetamid (IAM) (Sigma, USA), kyselina mravenčí (FA) (Sigma, USA), kyselina octová (Merck, Německo), marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Dual Xtra Standards (Bio-Rad, USA), marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad, USA), methanol (Merck, Německo), močovina (Sigma, USA), N, N'-metylenbisakrylamid (bisAA) (Serva, Německo), N, N, N', N'-tetrametylendiamin (TEMED) (Sigma, USA), persírán amonný (APS) (Serva, Německo), thiomčovina (Fluka, USA), thiosírán sodný (Sigma, USA), Triethylammonium bicarbonate buffer pH 8,0 (pufr na bázi uhličitanu triethylamonného, TEAB) (Fluka, USA), Tris ultra pure (MP Biomedicals, USA), tris (2-karboxyethyl) fosfin (TCEP) (Fluka, USA), trypsin (MP Biomedicals, USA), uhličitan draselný (Fluka, USA).

### 4.2 Biologický materiál

Výchozím materiálem pro tuto práci bylo R2A medium, jež je velmi chudé na živiny a umožňuje kultivaci druhů, které by v komplexnějším médiu nerostly (van der Linde a kol. 1999). Z tohoto důvodu je využíváno pro kultivaci antarktických izolátů (Sedláček a kol. 2017). Produkce antimikrobiálních látek kmeny *Pseudomonas prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433 byla testována podle metodiky upravené z publikace Ghequire a kol. 2015. Kmeny byly kultivovány paralelně ve dvou opakováních v 50 ml R2A média (HiMedia, Mumbai, India) při teplotě 25 °C a třepání (200 rpm) dokud buněčná hustota (měřeno jako OD600) nedosáhla hodnoty 0,5. Poté byl k jednomu z paralelních vzorků přidán mitomycin C do finální koncentrace 0,05 ng/ml, druhý vzorek byl ponechán bez zásahu, a kultivace pokračovala další 3 hodiny. Poté byly buňky centrifugovány (6 000 rpm, 30 minut) a takto získané supernatanty média byly zamrazeny a skladovány při -80 °C.

Veškerá produkce médií probíhala na Biologickém ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně a byla za ni zodpovědná Mgr. Kateřina Snopková.

#### **4.3 Použité přístrojové vybavení**

Analytické váhy Radwag X (Radwag; USA), centrifuga (Eppendorf Minispin, Německo), centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5702, Německo), centrifuga IEC CL31R Multispeed (Thermo Scientific, USA), hmotnostní spektrometr UHR-Q-TOF maXis (Bruker Daltonics, Německo) spojený s kapalinovým chromatografem RSLCnano (Thermo, USA), předvážky (Vibra, Japonsko), sonifikační lázeň K-2L (Kraintek, Česká republika), skener ImageScanner II (Amersham Biosciences, Švédsko), spektrofotometr Lighwave II WPA (Biochrom, USA), Thermoblok (Major Sciences, USA), Thermomixer Eppendorf Comfort (Eppendorf, Německo), třepačka Unimax 1010 (Heidolph, Německo), vortex V-1 Plus (BioSan, USA), transiluminátor Basic 2 (KAISER, Německo), třepačka Vortex 4-basic (Thermo Fisher Scientific, USA), vakuová odparka Eppendorf Concentrator Plus (Eppendorf, Německo), vertikální elektroforéza s příslušenstvím (Bio-Rad, USA).

#### **4.4 Použité nástroje a spotřební materiál**

3M Empore High Performance C18 extrakční disk (3M, USA), automatické pipety Eppendorf Research v rozmezí objemů od 1 µl do 5 ml (Eppendorf, Německo), Hamiltonovy jehly (průměr 18G; Hamilton, USA), kalibrované pH papírky (pH 0,0-14,0; 0,0-6,0; 7,0-14,0; Sigma, USA), Micro SpinColumn (Harvard apparatus, USA), mikroskopické vialky (Eppendorf, Německo), skleněné vialky s kónickým dnem Total Recovery 12x32 mm glass screw neck vial (Waters, USA).

#### **4.5 Použité roztoky a gely**

##### **Rozpouštění proteinového peletu**

**Močovinový pufr:** 100 mM TEAB (pH 8,0); 6M močovina; 2M thiomočovina

### **Separace proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy**

**Dělicí gel:** deionizovaná voda; akrylamid/bis (T 30%, C 2,67%); 1,5M Tris-HCl (pH 8,8); 10% (w/v) SDS; TEMED; 10% (w/v) APS

Vodou saturovaný n-butanol

**Zaostřovací gel (5%):** deionizovaná voda, akrylamid/bis (T 30%, C 2,67%); 0,5M Tris-HCl (pH 6,8); 10% (w/v) SDS; TEMED; 10% (w/v) APS

**10x koncentrovaný elektrodový pufr Tris/glycin (pH 8,3):** 25 mM Tris; 192mM glycin; 0,1% (w/v) SDS

**2x koncentrovaný vzorkovací pufr (LSB):** 0,125M Tris-HCl (pH 6,8); 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) 2-merkaptoethanol; 0,01% (w/v) bromfenolová modř

### **Barvení proteinů barvivem Coomassie Brilliant Blue**

**Zásobní roztok Coomassie Brilliant Blue:** 12,5% (v/v) kyselina fosforečná; 12,5% (w/v) síran amonný; 0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250

**Odbarvovací roztok:** 10% (v/v) kyselina octová

### **Barvení proteinů dusičnanem stříbrným**

**Fixační roztok:** 30% (v/v) ethanol; 10% (v/v) kyselina octová

**Roztok ethanolu na oplach:** 20% (v/v) ethanol

**Zcitlivující roztok thiosíranu sodného:** 0,02% (w/v) thiosíran sodný

**Barvicí roztok dusičnanu stříbrného:** 0,1% (w/v) dusičnan stříbrný

**Vyvíječí roztok uhličitanu draselného:** 3% (w/v) uhličitan draselný; 3 mM formaldehyd; 50  $\mu$ M thiosíran sodný

**Stop roztok:** 4% (w/v) Tris; 20% (v/v) kyselina octová

### Štěpení proteinů v gelu

**Odbarvovací roztok:** 50% (v/v) acetonitril (ACN); 100 mM TEAB (pH 8,0)

**Redukční činidlo:** 10 mM DTT; 100 mM TEAB (pH 8,0)

**Alkylační činidlo:** 55 mM IAM; 100 mM TEAB (pH 8,0)

**Dehydratační činidlo:** acetonitril (ACN)

**Štěpící pufr:** 25 mM TEAB; trypsin 20 ng/μl (komerčně dostupný trypsin modifikovaný rafinosou podle protokolu, který byl publikován v Šebela a kol. 2006)

**Extrakční pufr:** 30% (v/v) acetonitril; 5% (v/v) kyselina mravenčí

### Štěpení proteinů v roztoku

**Redukční činidlo:** 100 mM TEAB (pH 8,0); 25 mM TCEP

**Alkylační činidlo:** 100 mM TEAB (pH 8,0); 330 mM IAM

**Štěpící roztok:** 25 mM TEAB; trypsin 0,5 μg/μl (komerčně dostupný trypsin modifikovaný rafinosou podle protokolu, který byl publikován v Šebela a kol. 2006)

### Přečištění peptidů na C18 reverzní fázi

**Aktivační roztok:** 2-propanol

**Nanášecí a promývací roztok:** 5% (v/v) FA

**Eluční roztok:** 50% (v/v) methanol; 2,5% (v/v) FA

### Roztoky pro LC-MS

**Rozpouštěcí pufr:** 5% (v/v) FA; 5% (v/v) methanol

**Mobilní fáze, pufr A:** 0,1% FA (v/v)

**Mobilní fáze, pufr B:** 0,1% FA; 90% ACN (v/v)

## 4.6 Metody

### 4.6.1 Extrakce bakteriálních proteinů sekretovaných do média

Ke vzorkům média byl přidán vychlazený aceton ve čtyřnásobném objemovém nadbytku. Následovala inkubace vzorků po dobu 24 hodin při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Poté byl precipitát centrifugován po dobu 10 minut při 10000 g a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant byl opatrně slit z falkony. Na dně falkony zbyl pelet, který byl znovu promyt v acetonu o objemu 1 ml s následnou centrifugací po dobu 10 minut při 10000 G a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . K promytemu peletu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  močovinného pufru a vzorky byly inkubovány za neustálého promíchávání (1400 rpm) 1 hodinu při teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  v Thermomixeru. Připravené vzorky byly následně kvantifikovány pomocí sady 2-D Quant kit.

### 4.6.2 Kvantifikace proteinů 2-D Quant Kitem

Nejprve byl připraven pracovní roztok smísením barevných reagentů A a B v objemovém poměru 100:1. Následovně byla nachystána kalibrační řada ve dvou opakováních za pomoci roztoku BSA (standard) o koncentraci 2 mg/ml (Tab. 1). Pro stanovení koncentrace proteinů byly použity 3  $\mu\text{l}$  od každého vzorku, přičemž samotné stanovení bylo vždy provedeno ve třech opakováních.

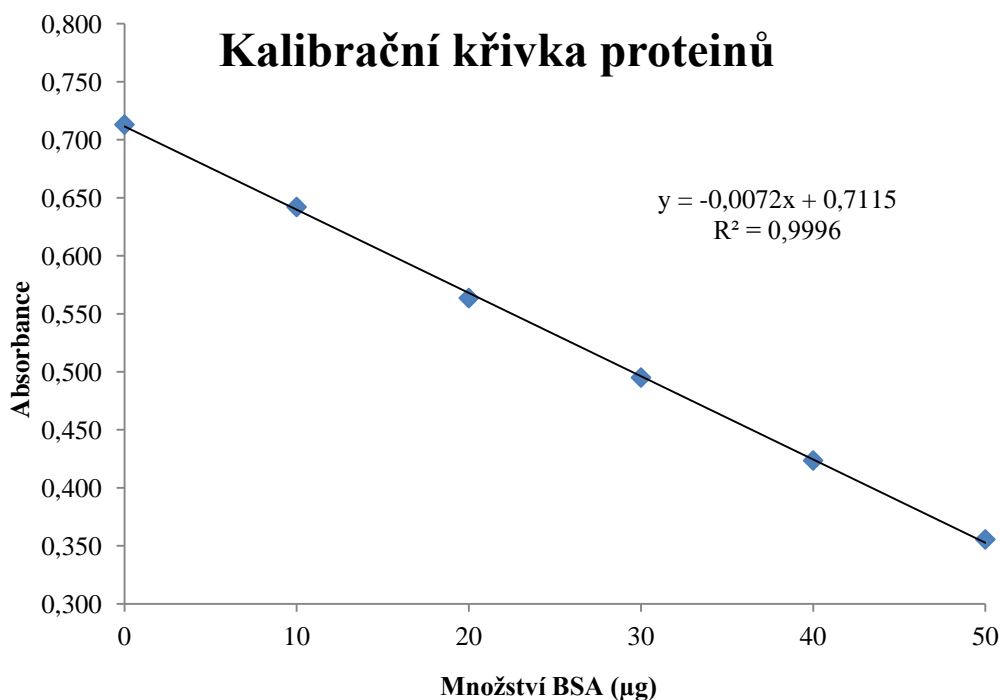
Tabulka č. 1: Schéma pipetování kalibrační řady

Číslo zkumavky	1	2	3	4	5	6
Objem roztoku BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	5	10	15	20	25
Množství proteinů ( $\mu\text{g}$ )	0	10	20	30	20	50

Ke vzorkům bylo pipetováno 500  $\mu\text{l}$  precipitantu a vzniklá směs byla krátce promíchána. Dále bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  Co-precipitantu s následným promícháním, poté byla provedena centrifugace po dobu 5 minut při 10000 g a teplotě  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení centrifugace byl supernatant odpipetován a k peletům bylo následně pipetováno 100  $\mu\text{l}$  roztoku obsahujícího měďnaté ionty a 400  $\mu\text{l}$  destilované vody. Po důkladném promíchání byl do všech vzorků přidán 1 ml pracovního roztoku, vzorky byly opět promíchány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 20 minut. Následovalo měření

absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 480 nm. Jako blank byla použita deionizovaná voda.

Vynesením závislosti naměřené absorbance na množství standardu BSA a její lineární regresí byla získána kalibrační přímka (Obr. 14), s jejíž pomocí bylo zjištěno množství proteinů v jednotlivých vzorcích. Takto charakterizované vzorky byly až do dalšího použití uskladněny při -20 °C.



Obrázek č. 14: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinů

### 4.6.3 SDS-PAGE

#### 4.6.3.1 Příprava gelů

Pro elektroforetickou separaci byl připraven roztok pro 10% dělicí gel (viz Tabulka č. 2). Pro zahájení polymerizace bylo k roztoku dělicího gelu přidáno 5 µl TEMED a 50 µl 10% (w/v) APS. Roztok byl rychle promíchán a pipetován do prostoru mezi skla upevněná v nalévacím rámu. Aby nedošlo ke vzniku nežádoucích bublin, byl gel převrstven cca 200 µl vodou saturovaného n-butanolu. Gel tuhnul přibližně 20 minut. Po ukončení polymerace byl n-butanol odsán pomocí filtračního papíru. Dále byl připraven roztok pro 5% zaostřovací gel (viz Tabulka č. 2). Pro zahájení polymerace, která byla provedena přidávkem 10 µl TEMED a 50 µl 10% (w/v) APS, byl tento roztok



opět rychle promíchán a pipetován mezi skla na povrch dělicího gelu. Na závěr byl mezi skla vložen hřebínek sloužící k vytvoření jamek pro vzorky. Po ukončení polymerace byla skla s připravenými gely vložena do elektroforetické cely, která byla poté naplněna elektrodoým pufrem.

Tabulka č. 2: Příprava polyakrylamidových gelů pro SDS-PAGE

Gel	Deionizovaná voda	AA/BIS (T 30%; C 2,67%)	Pufř *	10% SDS
5%	5,7 ml	1,7 ml	2,5 ml	0,1 ml
10%	4,1 ml	3,3 ml	2,5 ml	0,1 ml

\*Pro 10% dělicí gel byl použit pufř 1,5M Tris/HCl pH 8,8 a pro 5% zaostřovací gel byl použit pufř 0,5M Tris/HCl pH 6,8.

#### 4.6.3.2 Příprava vzorků

Objem vzorků, odpovídající požadovanému množství proteinů, byl smíchán se stejným objemem 2x koncentrovaného vzorkovacího pufřu a důkladně promíchán pipetováním. Takto připravený vzorek byl inkubován v Thermobloku při teplotě 100 °C po dobu 10 minut.

#### 4.6.3.3 Separace proteinů

Do první jamky zaostřovacího gelu byl pipetován marker molekulové hmotnosti. Připravené vzorky byly poté pipetovány do následujících jamek. Elektroforetická cela byla připojena ke zdroji vysokého napětí a separace byla zahájena při napětí 80 V (prvních 30 minut). Po zbylou dobu bylo napětí nastaveno na 125 V. Po skončení elektroforézy byl gel vyňat ze skel a separované proteiny byly vizualizovány pomocí zvolené barvicí metody (Laemmli 1970).

Pokud bylo cílem detekovat co nejmenší množství proteinů bez potřeby jejich další analýzy, bylo použito barvení pomocí dusičnanu stříbrného. V případě identifikace separovaných proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie pak byly proteiny v gelu barveny Coomassie Brilliant Blue.

#### **4.6.4 Barvení proteinů pomocí dusičnanu stříbrného**

Gel byl vložen do fixačního roztoku a inkubován po dobu 24 hodin za stálého míchání. Následující den byl fixační roztok odlit do odpadu. Gel byl poté 2x proplachován ve 20% (v/v) ethanolu po dobu 10 minut. Pak byl přenesen do nádoby s deionizovanou vodou a v ní byl 2x proplachován po dobu 10 minut. Následovně byl gel za stálého míchání postupně inkubován nejprve 1 minutu ve zcitlivujícím roztoku, následovně 2x 1 minutu v deionizované vodě a na závěr 20 minut v barvicím roztoku. Po ukončení inkubace byl gel krátce opláchnut v deionizované vodě a přenesen do nádoby s vyvíjecím roztokem, ve kterém byl inkubován za stálého míchání do doby, dokud nebyly zbarveny jednotlivé proteinové pásy. Poté byl gel převeden do nádoby se stop roztokem a v něm inkubován 30 minut. Na závěr byl gel krátce promyt destilovanou vodou (Chevallet a kol. 2006) a naskenován na laboratorním skeneru.

#### **4.6.5 Barvení proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue**

Pro barvení proteinů byl připraven barvicí roztok smícháním zásobního roztoku Coomassie Brilliant Blue a methanolu v objemovém poměru 4:1. Do něj byl gel po ukončení elektroforetické separace vložen a ponechán po dobu 24 hodin za stálého míchání. Následující den byl gel opláchnut destilovanou vodou a umístěn do odbarvovacího roztoku po dobu 30 minut za stálého míchání. Na závěr byl gel krátce promyt destilovanou vodou (Candiano a kol. 2004) a naskenován na laboratorním skeneru.

#### **4.6.6 Štěpení proteinů v roztoku**

Od vzorků rozpuštěných v močovinovém pufru bylo odebráno 30  $\mu$ l do nových mikrozkuvek. Poté bylo ke vzorkům přidáno 7,5  $\mu$ l redukčního činidla TCEP (výsledná koncentrace TCEP ve vzorku byla 5 mM). Následovala inkubace vzorků po dobu 45 minut při teplotě 25 °C. Po skončení inkubace bylo ke vzorkům přidáno 7,5  $\mu$ l alkylačního činidla IAM (výsledná koncentrace IAM ve vzorku byla 55 mM). Po přidání alkylačního činidla byly vzorky inkubovány po dobu 30 minut ve tmě. Poté bylo ke vzorkům přidáno 255  $\mu$ l 25mM pufru TEAB (25mM pufr TEAB byl připraven smícháním 25  $\mu$ l 1M TEAB s 975  $\mu$ l deionizované vody). Poté bylo změřeno pH vzorků pomocí kalibrovaných pH papírků a v případě potřeby bylo upraveno na pH 7,5 - 8,5 přidáním 1M TEAB. V posledním kroku byly ke vzorkům přidány 2  $\mu$ l štěpícího

roztoku. Následovala inkubace vzorků po dobu 16 hodin v Thermobloku při teplotě 37 °C (León a kol. 2013).

Po ukončení inkubace byla ke vzorkům přidána koncentrovaná kyselina mravenčí tak, aby její výsledná koncentrace byla 5% (v/v) (tzn. 16 µl). Vzorky byly následně přečištěny na C18 reverzní fázi pomocí kolon Micro SpinColumn (viz níže).

#### 4.6.7 Štěpení proteinů v gelu

Gel s nabarvenými proteiny byl opláchnut v destilované vodě a poté byl v Petriho misce umístěn na transluminátor. Příslušné proteinové pásy byly skalpelem vyříznuty a umístěny do 1,5-ml mikrozkušavek. Každý pás byl v mikrozkušavce rozdělen na menší kousky, ke kterým bylo pipetováno 300 µl odbarvovacího roztoku. V tomto roztoku byly gelové kousky inkubovány 15 minut za stálého míchání (800 rpm) v Thermomixeru při 25 °C. Supernatant byl poté odpipetován do odpadu a celý odbarvovací krok byl proveden ještě jednou. Poté bylo do mikrozkušavek pipetováno 300 µl acetonitrilu. Inkubace probíhala po dobu 5 minut za stálého míchání (1400 rpm) v Thermomixeru při 25 °C. Po ukončení inkubace byl acetonitril odstraněn.

Ke gelovým kouskům bylo přidáno následovně 100 µl redukčního činidla. V něm byly gelové kousky inkubovány 30 minut v Thermomixeru při 56 °C. Poté bylo redukční činidlo odstraněno. Dále bylo ke vzorkům přidáno 100 µl alkylačního činidla. Inkubace probíhala 20 minut ve tmě při teplotě 25 °C. Po uplynutí této doby bylo alkylační činidlo odstraněno a následně bylo ke gelovým kouskům pipetováno 500 µl deionizované vody. Vzorky byly vloženy do Thermomixeru, kde byly za stálého třepání (800 rpm) inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě 25 °C. Po skončení inkubace byla deionizovaná voda odstraněna a ke gelovým kouskům bylo dále přidáno 300 µl acetonitrilu. Vzorky byly opět vloženy do Thermomixeru a inkubovány za stálého míchání (1400 rpm) po dobu 5 minut při teplotě 25 °C. Poté byl acetonitril odstraněn s následným vysušením vzorků ve flow-boxu.

Pro vlastní enzymatické štěpení bylo použito 30 µl štěpícího pufru obsahujícího trypsin, který byl přidán ke gelovým kouskům. Enzymatické štěpení probíhalo v Thermomixeru po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C.

V dalším kroku byla provedena extrakce peptidů přidáním 100 µl extrakčního pufru ke kouskům gelu, poté probíhala inkubace po dobu 30 minut za stálého míchání (1400 rpm) v Thermomixeru při teplotě 37 °C. Následně byl supernatant od gelových

kousků odpipetován do čisté mikrozkuhavky. Ke kouskům gelu bylo opět přidáno 100  $\mu$ l extrakčního pufru a celý postup extrakce byl zopakován. Výsledný supernatant byl přidán k supernatantu z prvního kroku a získaný extrakt byl odpařen ve vakuové centrifugační odparce (Shevchenko a kol. 2006) a v dalším kroku purifikován pomocí vyrobených mikrokolonek obsahujících C18 reverzní fázi.

#### **4.6.8 Purifikace peptidů na reverzní fázi C18 pomocí kolon Micro SpinColumn**

Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l 5% (v/v) kyseliny mravenčí. Následovně byly vzorky přeneseny do ultrazvukové lázně, kde byly sonifikovány po dobu 5 minut. Dále byly vzorky přemístěny do Thermomixeru, kde byly inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 25 °C za stálého třepání (1500 rpm).

Pro přečištění peptidů byly použity komerční kolony (Micro SpinColumn), které byly upevněny ve 2-ml mikrozkuhavkách a aktivovány nanesením 200  $\mu$ l isopropanolu s následnou centrifugací po dobu 1 minuty při 120 g. Dále bylo do kolon přidáno 100  $\mu$ l 5% (v/v) kyseliny mravenčí a byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 120 g.

Do kolon upevněných v čistých mikrozkuhavkách byly napipetovány okyselené vzorky a následovala centrifugace po dobu 2,5 minut při 120 g. Proteklé vzorky byly do kolon napipetovány ještě jednou. Poté bylo provedeno promytí pomocí 100  $\mu$ l 5% (v/v) kyseliny mravenčí (opět byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 120 g).

Následně byly kolony opět přemístěny do čistých mikrozkuhovek a byla provedena eluce pomocí 100  $\mu$ l elučního roztoku a centrifugace po dobu 5 minut při 120 g. Eluát byl poté přenesen do skleněných vialek s kónickým dnem a odpařen ve vakuové odparce při teplotě 60 °C.

#### **4.6.9 Purifikace peptidů na reverzní fázi C18 pomocí vyrobených mikrokolonek**

Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l 5% (v/v) kyseliny mravenčí. Následovně byly vzorky přeneseny do ultrazvukové lázně, kde byly sonifikovány po dobu 5 minut. Dále byly vzorky přemístěny do Thermomixeru, kde byly inkubovány po dobu 5 minut při teplotě 25 °C za stálého třepání (1500 rpm).

Pro přečištění peptidů byly vyrobeny kolony z 3M Empore extrakčních disků C18, ze kterých byla vyseknuta fritka pomocí Hamiltonovy jehly o průměru 18G. Ta byla vpravena do zastřižené 200- $\mu$ l špičky, která byla upevněna v 1,5ml mikrozkuhavkách.

Kolonky byly aktivovány nanesením 50  $\mu$ l isopropanolu a centrifugovány po dobu 2,5 minut při 4000 g a 25 °C. Proces aktivace byl zopakován ještě jednou.

V dalším kroku byla provedena ekvilibrace přidavkem 50  $\mu$ l 5% (w/v) kyseliny mravenčí s následnou centrifugací po dobu 2,5 minut při 2000 g a 25 °C. Krok ekvilibrace byl následovně zopakován.

Ekvilibrované kolonky byly upevněny do čistých 1,5-ml mikrozkumavek. Na kolonky byly pipetovány vzorky rozpuštěné v kyselině mravenčí. Následovala centrifugace po dobu 6 minut při 1500 g a 25 °C. Poté bylo provedeno promytí pomocí 50  $\mu$ l 5% (w/v) kyseliny mravenčí s následnou centrifugací po dobu 2,5 minut při 2000 g a 25 °C. Proces promývání byl zopakován ještě jednou.

Kolonky se zachycenými a promytými peptidy byly upevněny do čistých 1,5-ml mikrozkumavek. V tomto kroku byla provedena eluce nanesením 50  $\mu$ l elučního roztoku a následnou centrifugací po dobu 10 minut při 1500 g. Eluce byla zopakována ještě jednou (Rappsilber a kol. 2007).

Eluát byl poté přenesen do skleněných vialek s kónickým dnem a odpařen ve vakuové odparce při teplotě 60 °C.

#### **4.6.10 LC-MS/MS analýza**

Vzorky, obsahující extrahované peptidy po štěpení proteinů v gelu, byly analyzovány pomocí systému kapilární chromatografie (nLC) (RSLCnano, Thermo, USA) online spojeného s tandemovým hmotnostním analyzátozem Q-TOF vybaveným nano-ESI ionizací (UHR-Q-TOF maXis, Bruker Daltonics, Německo). Připravené odpařené vzorky ve skleněných vialkách byly rozpuštěny v 16  $\mu$ l roztoku 5% FA modifikované 5% MeOH, sonikovány po dobu 5 minut a přeneseny do autosampleru chromatografického systému.

K analýze bylo odebráno 5  $\mu$ l vzorku a obsažené peptidy byly při průtoku 4  $\mu$ l/min zachyceny na předkoloně 75  $\mu$ m x 3 cm (IntegraFrit, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil GOLD C4, 5 $\mu$ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) pomocí vzorkovací pumpy a následně izokraticky promyty 21  $\mu$ l 2% FA. Dělení zachycených peptidů bylo provedeno dvousložkovou gradientovou elucí v průběhu 47 min na analytické kapilární koloně (50  $\mu$ m x 20 cm, SilicaTip, New Objective, CA, USA) naplněné reverzní fází (Reprosil AQ C18, 3  $\mu$ m, Dr. Maisch GmbH, Německo) při průtoku 180 nl/min. Eluční gradient byl tvořen mícháním mobilní fáze A (0,1% FA)

a mobilní fáze B (90% acetonitril modifikovaný 0,1% FA) se směrnicí míchání složek gradientu odpovídající nárůstu mobilní fáze B v mobilní fázi A s rychlostí 1,25% složky B/min v průběhu 20 min (celý gradient je uveden v Tab. 3).

Rozdělené peptidy eluované z analytické kolony byly ionizovány pomocí elektrosprej ionizace a charakterizovány metodou tandemové hmotnostní analýzy v uspořádání „data-dependent analysis (DDA)“ s kolizně indukovanou fragmentací peptidů v kolizní cele plněnou dusíkem. Nastavení hmotnostního analyzátoru bylo následující: zdroj (Source; capillary voltage 1650 V; Dry gas: 6 L/min; Dry temperature: 150 °C); Tune Page nastavení (Ion funnel RF 400 Vpp; Multipole RF 400 Vpp; Quadrupole ion energy 3,2 eV; collision energy 6 eV; Collision RF 1200 Vpp; transfer time 70 μs; pre-puls storage 12 μs); MS/MS nastavení (Auto MSMS on; Precursor Ions: 2s cycle time; threshold pro přepínání z MS na MSMS mód 500 cts; active exclusion po 2 spektrech po dobu následujících 30 s; excluded mass rozsah prekurzorů 100-350 Da). MS data byla sbírána v hmotnostním rozsahu 100 - 1600 m/z s dobou sběru (acquisition time) 500 ms pro MS a 100-300 ms pro MS/MS v závislosti na intenzitě prekurzoru.

Tabulka č. 3: Nastavení chromatografického dělení peptidů obsažených ve vzorcích pomocí 47 min. gradientu při průtoku 180 nl/min

Čas (min)	%A	%B
0	90	10
		(nástřík, nanášení a promývání vzorku na předkoloně)
10	90	10
		(start gradientu)
30	65	35
35	10	90
37	10	90
40	90	10
52	90	10

\*Složení mobilních fází bylo následující: pufr A: 0,1% FA ve vodě, pufr B: 90% acetonitrilu modifikovaného 0,1% FA

#### 4.6.11 Zpracování dat

Naměřená surová data byla zpracována programem DataAnalysis v. 4.3 (x64) (Bruker Daltonics, Německo), fragmentační spektra a měrné hmotnosti prekurzorů byly uloženy ve formátu mgf (Mascot generic file). Tato spektra byla importována do programu ProteinScape v2.2 ((Bruker Daltonics, Německo) a využita k identifikaci nejprve peptidů a následně proteinů pomocí databázového prohledávání pomocí Mascot algoritmu (in-house mascot server, Matrix Science, England, UK) proti databázi

obsahující 102338 proteinových sekvencí, která byla sestavena z proteinových sekvencí organismu *Pseudomonas* (referenční proteom, UniProt, staženo 20151113) doplněný o yeast proteom (referenční proteom, UniProt, staženo 20151113) a běžné kontaminanty.

Pro identifikaci peptidů a proteinů byly nastaveny tyto parametry: štěpící proteáza: chymotrypsin/trypsin; maximální povolený počet vynechaných štěpných míst (miss cleavage) 5, povolené modifikace peptidů: karbamidomethylace cysteinů jako pevná (fixed), acetylace N-konců proteinů, oxidace methioninu byly nastaveny jako variabilní; povolené odchylky pro MS prekurzorů: 50 ppm a pro MS/MS fragmentace peptidů 0,05 Da, minimální skóre pro identifikaci peptidů 25, pro identifikaci proteinů minimálně 1 peptid s identity skóre definovaným algoritmem MASCOT na základě velikosti databáze; minimální skóre pro identifikaci proteinů 30. Výsledky prohledávání a identifikace peptidů byly exportovány do formátu XLS a vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu MS Excel.

#### **4.6.12 Bioinformatická analýza získaných výsledků**

Pro bioinformatickou predikci sekretovaných proteinů z bakterií rodu *Pseudomonas* byly použity následující on-line aplikace: SignalP, SecretomP 2.0, Psortb a cello2go.

On-line aplikace SignalP umožňuje predikovat přítomnost a umístění štěpných míst tzv. signálních peptidů nacházejících se v aminokyselinových sekvencích proteinů různých organismů, jako jsou právě i gramnegativní bakterie (Petersen a kol. 2011).

SecretomeP 2.0 je on-line aplikace poskytující predikci pro sekreci proteinu tzv. neklasickou cestou. Takto se tedy dá predikovat, zda jsou proteiny sekretovány i bez účasti signálního peptidu (Bendtsen a kol. 2005).

Další použitou aplikací byla Psortb, která je přímo specializovaná na predikci lokalizace proteinů v grampozitivních a gramnegativních bakteriích. Pomocí této aplikace se teď dá predikovat, zda se jedná o proteiny pocházející z vnější nebo vnitřní membrány, dále proteiny z periplazmatického prostoru nebo extracelulární proteiny (Yu a kol. 2010).

Obdobnou aplikaci představuje cello2go, která také umožňuje predikci lokalizace proteinu v organismu, navíc ale i s funkční anotací genové ontologie (Yu a kol. 2014).

Pro vyhledání konzervovaných domén v sekvencích sekretovaných proteinů pak byla použita aplikace CD-search (Marchler-Bauer a Bryant 2004).

Veškeré analýzy byly prováděny s předem nastavenými parametry (příslušná cut-off skóre atd.).



## 5 VÝSLEDKY A HODNOCENÍ

### 5.1 Charakteristika biologického materiálu a návrh pracovního postupu

Tato bakalářská práce probíhala ve spolupráci s Mgr. Kateřinou Snopkovou z Biologického ústavu Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a jejím hlavním cílem bylo navrhnout a vyzkoušet vhodnou metodiku pro identifikaci sekretovaných proteinů z gramnegativních bakterií rodu *Pseudomonas*. Konkrétně se jednalo o kmeny *Pseudomonas prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433, které byly získány během polárních expedic 2007–2008 v blízkosti stanice Johanna Gregora Mendela ( $\varphi = 63^{\circ}48'02''$  S,  $\lambda = 57^{\circ}52'57''$  W) na ostrově Jamese Rosse blízko Antarktického poloostrova. Standardní biochemické testy určily vzorky jako fluorescentní pseudomonády. Následná druhová identifikace zařadila izolát 2673 jako *P. prosekii* (Kosina a kol. 2013), druhové určení izolátu 2433 zůstává nedokončeno, velmi pravděpodobně se jedná o nový druh (Kosina, osobní sdělení). Oba izoláty jsou uchovávány v České sbírce mikroorganismů (<http://www.sci.muni.cz/ccm/>).

Pseudomonády jsou ubikvitním rodem, který osidluje rozličné environmentální niky včetně velmi extrémních prostředí (Palleroni 2005). Jednotlivé druhy představují zemědělsky významné fytopatogeny (podílejí se na kažení potravin). Způsobují také nozokominální infekce (infekce vázané na nemocniční prostředí). Tyto infekce pak představují závažný problém zejména díky schopnostem pseudomonád odolávat standardní antibiotické léčbě (Livermore 2002; Zhang a kol. 2016), což vede k hledání nových anti-pseudomonádových látek (Brown a Wright 2016).

Bakteriociny jsou proteiny sekretované bakteriemi, které mají antibiotický účinek. Protože jsou cílené na úzké spektrum mikroorganismů, bez dopadu na ostatní mikroflóru (Cavera a kol. 2015; Gillor a kol. 2005), představují novou generaci antimikrobiálních látek s velkým potenciálem. Přestože jsou bakteriociny některých mezofilních (teplotní optimum  $>20$  °C) bakterií poměrně dobře prozkoumány, existuje pouze jen málo studií zabývajících se produkcí antimikrobiálních látek psychrofilními či psychrotolerantními bakteriemi (O'Brien a kol. 2004; Sánchez a kol. 2009; Barros a kol. 2013). Žádná studie také nebyla cílena specificky na antarktické pseudomonády, i když patří v tomto nehostinném prostředí mezi dominantní druhy (Scherer a Neuhaus 2006), a produkce bioaktivních látek pseudomonádami je již dlouho známa (např. biokontrolní kmeny využívané v zemědělství; Jayaseelan a kol. 2014, Ghequire a De Mot 2014; Chatterjee a kol. 2016). Kmeny *P. prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433 představují první

antarktické pseudomonády, u kterých byla navíc detekována produkce pyocinů. Pyociny jsou proteiny patřící mezi bakteriociny, které mají velký potenciál komerčního využití, protože vykazují inhibiční efekt vůči klinickým izolátům *P. aeruginosa*, anebo fytopatogenním zástupcům rodu *Pseudomonas* (Snopková, osobní sdělení). Celkově by tak mohla proteomická charakterizace „sekretomu“ těchto nově objevených druhů pseudomonád poskytnout zajímavé informace s přesahy do klinických oborů.

Pro identifikaci sekretovaných proteinů byla zvolena následující metodika. Biologický materiál, v tomto případě růstová média, byl precipitován ve čtyřnásobném nadbytku vychlazeného acetonu, aby došlo k maximálnímu vysrážení proteinů přítomných ve vzorku. Po precipitaci byly proteiny rozpuštěny v močovinovém pufru a následně kvantifikovány.

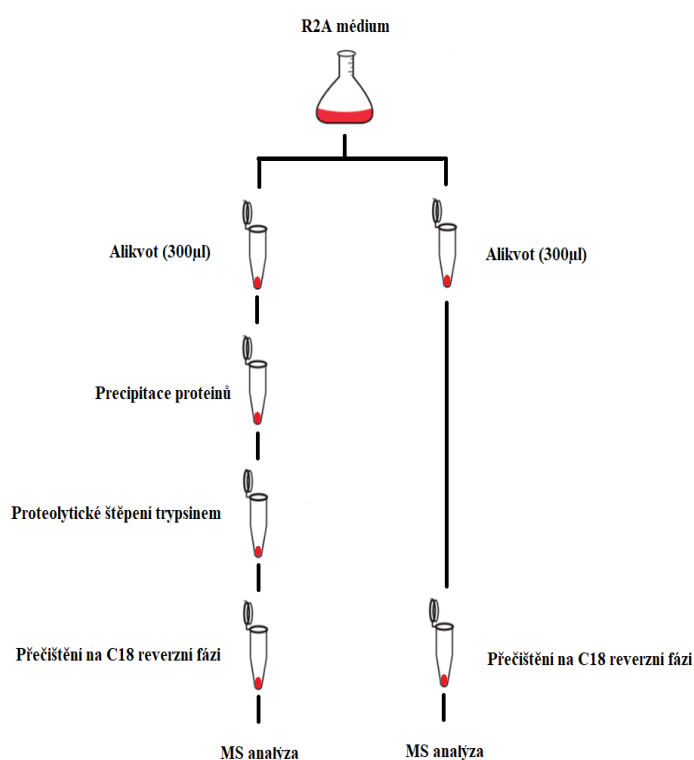
Po kvantifikaci vzorků byla provedena elektroforetická separace proteinů s použitím diskontinuální polyakrylamidové gelové elektroforézy za přítomnosti dodecylsírany sodného. Tato metoda umožňuje separaci proteinů na základě jejich molekulových hmotností a tím pádem i rozdělení jednoho vzorku na více frakcí, což vede k navýšení počtu identifikovaných proteinů. Další nespornou výhodou této metody je také odstranění nežádoucích kontaminantů, jakými jsou například nízkomolekulární látky (např. soli a detergenty z extrakčních pufrů). Po elektroforetické separaci byly proteiny vizualizovány barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250.

Pro následnou identifikaci proteinů byl zvolen tzv. bottom-up přístup. Tento přístup je charakteristický tím, že se provádí štěpení proteinů na peptidy specifickou proteázou, v tomto případě trypsinem. Ten štěpí proteinový řetězec za aminokyselinami argininem a lysinem směrem k C-konci (Aebersold a Mann 2016). Po proteolytickém štěpení bylo provedeno přečištění peptidů od interferujících látek pomocí C18 reverzní fáze.

Získané a přečištěné tryptické peptidy byly analyzovány pomocí kapilární kapalínové chromatografie spojené s on-line tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím ionizace na principu elektrospreje (Aebersold a Mann 2016) a metody „data-dependent analysis“ (Aebersold a Mann 2016). Ze získaných dat byly extrahovány listy peptidových prekurzorů a jejich fragmentační spektra, která byla následně využita k identifikaci proteinů bioinformatickým přístupem „peptidového sekvenování“ (Steen a Mann 2004). V tomto přístupu byly nejdříve identifikovány peptidy, které byly následně shlukovány do proteinových sekvencí.

## 5.2 Proteomická analýza R2A média

Výše zmíněné bakterie byly kultivovány v R2A médiu, které může potenciálně obsahovat jak peptidy, tak i proteiny. R2A médium se totiž skládá z glukózy, škrobu, pyruvátu sodného, hydrogenfosforečnanu draselného, heptahydrátu síranu hořečnatého, agaru, především ale také z kaseinového hydrolyzátu, dále z výtažku z kvasnic a peptonu (Reasoner a Geldreich 1985). Z tohoto důvodu byla před analýzou sekretovaných proteinů z bakterií provedena i analýza samotného R2A média, aby bylo vyloučeno případné zkreslení budoucích výsledků. Pro analýzu R2A média byly zvoleny dva následující postupy (Obr. 15).



Obrázek č. 15: Schéma štěpení R2A média

V prvním případě byly proteiny potenciálně přítomné v R2A médiu (aliquot o objemu 300 μl) nejprve vysráženy přebytkem vychlazeného acetonu (viz předchozí kapitola) a následně bylo provedeno proteolytické štěpení v roztoku pomocí trypsinu. Poté následovalo ještě přečištění získaných peptidů od interferujících látek na reverzní fázi C18 a MS analýza. Tímto způsobem měla být prokázána přítomnost proteinů potenciálně obsažených v R2A médiu.

Ve druhém případě byl alikvot R2A média (opět 300  $\mu$ l) přečištěn přímo na reverzní fázi C18 s navazující MS analýzou. Tento postup byl zvolen proto, aby bylo zjištěno, zda R2A médium neobsahuje také peptidy (Obr. 14).

Tabulka č. 4: Přehled identifikací precipitovaných proteinů a peptidů izolovaných přímo z R2A média

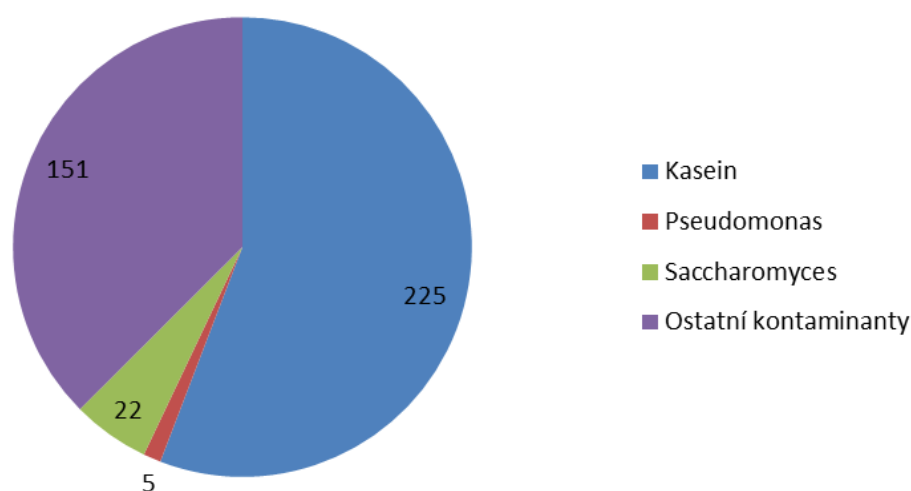
Protein (genové jméno)	Přístupový kód	Štěpené proteiny precipitované z R2A média			Peptidy izolované z R2A média		
		Skóre	Počet peptidů	PS <sup>#</sup> (%)	Skóre	Počet peptidů	PS <sup>#</sup> (%)
$\beta$ -kasein-Bos taurus *	P02666	464,7	11	24,4	389,7	8	27,3
(Bos taurus) similar to $\alpha$ -tubulin I isoform 1*	ENSEMBL: ENSBTA P00000016242	168,9	3	8,4	275,9	5	11,8
BMH1	P29311	40,5	1	3,7	41,4	1	3,7
KRT1	P04264	205,8	3	5,9	-	-	-
KRT2	P35908	124,0	2	3,7	-	-	-
KRT9	P35527	42,6	1	2,4	-	-	-
KRT10	P13645	78,7	1	3,2	-	-	-
PST_2422	A4VM73	41,9	1	1,7	-	-	-
OU5_1309	A0A024E7T1	42,6	1	4,2	43,1	1	4,2
SUC2	P00724-2	41,6	1	2,0	-	-	-
Chymotrypsinogen A *	P00766	43,8	1	6,1	-	-	-
CH92_21880	W8RCX1	-	-	-	40,0	1	5,2
TEF1	P02994	-	-	-	141,7	3	7,6
eno	A4XWS1	-	-	-	40,8	1	1,4
PSF113_1942	G8Q680	-	-	-	41,4	1	3,0
SSA4	P22202	-	-	-	117,3	2	2,8
CNN1	P43618	-	-	-	40,6	1	2,1
PSAKL28_14210	A0A077F581	-	-	-	43,6	1	3,1
CH92_00290	CH92_00290	-	-	-	40,7	1	2,1
PSPTO_4699	Q87W61	-	-	-	41,9	1	0,2
PSF113_4074	G8Q045	-	-	-	41,6	1	3,6
PA1663	Q9I362	-	-	-	42,7	1	1,4
OU5_5393	A0A024EI35	-	-	-	41,8	1	1,5
ACTB	P60712	-	-	-	579,8	11	24

\* proteiny, které nemají v použité databázi uvedené genové jméno; # pokrytí sekvence

Tímto způsobem bylo identifikováno celkem 28 proteinů. V případě štěpení proteinů precipitovaných z R2A média bylo identifikováno 11 proteinů (Tab. 4), z nichž byl nejhojněji zastoupen kasein (Obr. 16). V menší míře médium obsahovalo proteiny z kvasinek *Saccharomyces*. Během analýzy byly identifikovány i další kontaminanty, především se jednalo o lidské keratiny (Tab. 4; Obr. 16). Nejpravděpodobnějším důvodem této kontaminace je špatná manipulace se vzorkem během jeho přípravy pro MS analýzu. V menší míře byly vzorky kontaminovány i proteiny z *Pseudomonas*, které se do média dostaly patrně v průběhu jeho přípravy. Běžnou příčinou může být opakované používání stejného laboratorního skla, které nebylo patřičně vypláchnuto a vydesinfikováno.

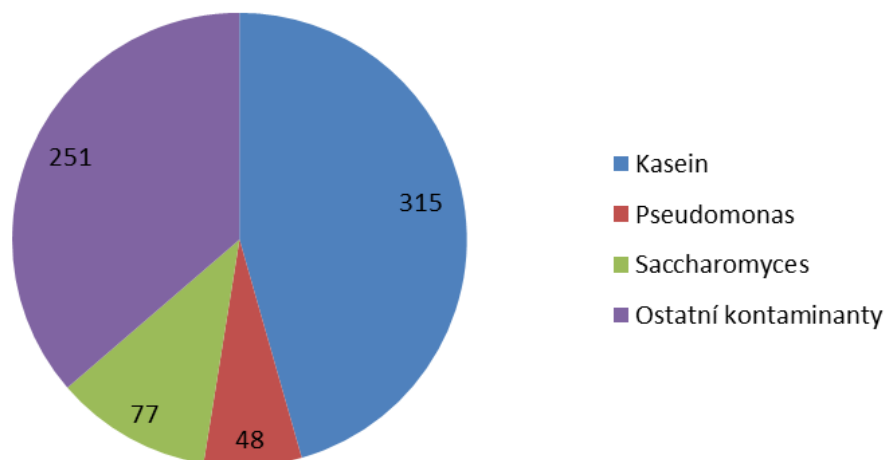
V druhém případě, kdy byla provedena přímá izolace peptidů z R2A média, bylo identifikováno 17 proteinů (Tab. 4). Z toho byl opět nejhojněji zastoupeným proteinem kasein, v menší míře proteiny z kvasinek *Saccharomyces* a *Pseudomonas* (Obr. 17). V tomto médiu byly také identifikovány kontaminanty, opět šlo hlavně o keratiny (Tab. 4).

### Štěpené proteiny precipitované z R2A média



Obrázek č. 16: Graf znázorňující zastoupení jednotlivých proteinů u štěpených proteinů precipitovaných z R2A média na základě počtu spekter přiřazených jednotlivým proteinům

## Peptidy izolované z R2A média



Obrázek č. 17: Graf znázorňující zastoupení jednotlivých peptidů izolovaných z R2A média na základě počtu spekter přiřazených jednotlivým proteinům

Jak ukazují výsledky analýzy, R2A médium opravdu obsahuje jak peptidy, tak i proteiny s tím, že nejvíce zastoupeným proteinem je kasein. Analýzou R2A média byla tedy prokázána přítomnost proteinů, které odpovídají složení samotného média. Jak vyplývá z grafů (Obr. 16; 17), při analýze peptidů přímo izolovaných z R2A média bylo dosaženo vyšších počtů spekter přiřazených jednotlivým identifikovaným proteinům, což naznačuje, že R2A médium obsahuje proteinové složky v jejich hydrolyzované formě.

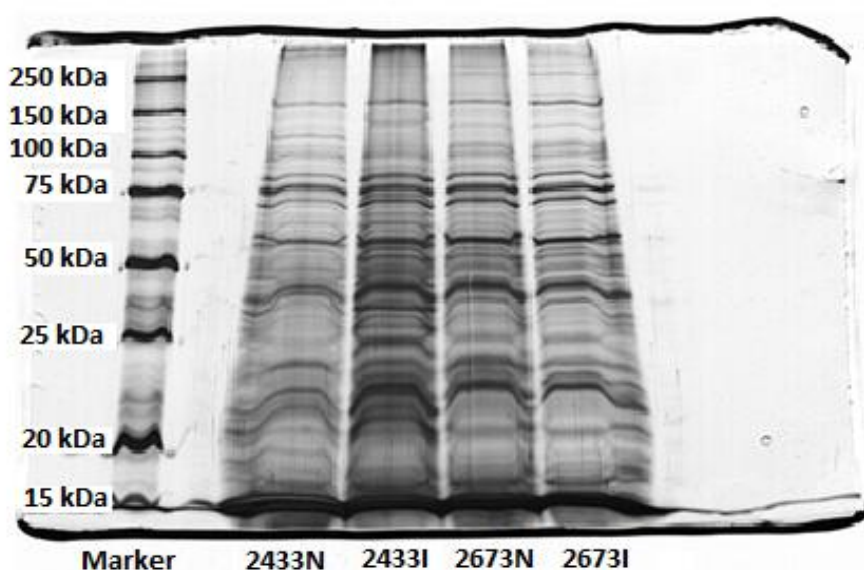
Celkově se ale na základě počtu peptidů a proteinů a jim přiřazených spekter dá říct, že by složení média nemělo mít větší vliv na výsledky analýzy sekretovaných proteinů z bakterií rodu *Pseudomonas*.

### 5.3 Proteomická analýza složení R2A média po kultivaci bakterií z rodu *Pseudomonas*

Jak již bylo napsáno výše, tato bakalářská práce se zabývala analýzou sekretovaných proteinů z gramnegativních bakterií rodu *Pseudomonas*, konkrétně kmenů *Pseudomonas prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433.

Oba kmeny byly k dispozici ve dvou paralelních vzorcích. K jednomu z nich byl přidán mitomycin C, zatímco druhý vzorek byl ponechán bez zásahu (u obou kmenů). Mitomycin C vyvolává poškození DNA, které se používá i u bakterií při produkci pyocinů (Briand a Baysse 2002). Jedná se o sekretované bakteriální proteiny, které

působí na receptory citlivých bakterií a tím způsobují jejich smrt (Abdi-Ali a kol. 2004). Molekuly bakteriocinu mohou ale navíc napadat také receptory savčích buněk, což je někdy příčinou letálních příhod (Abdi-Ali a kol. 2004). Bylo dokázáno, že použití mutagenních činidel způsobuje zvýšenou syntézu pyocinu (Michel-Briand a Baysse 2002). Toho lze dosáhnout buď ultrafialovým zařením (Higerd, Barchler a Berk 1967), anebo právě pomocí mitomycinu C (Kageyama 1964). Každý z dostupných vzorků pak byl analyzován ve dvou biologických opakováních, přičemž na polyakrylamidové gely bylo pro každý vzorek nanášeno vždy 20 µg.



Obrázek č. 18: Separované proteiny ze vzorků *Pseudomonas* sp. 2433 (N - neindukovaný, I - indukovaný) a *Pseudomonas prosekii* 2673 (N - indukovaný, I - indukovaný)

Jak vyplývá z Tabulky č. 5, dohromady bylo identifikováno přes 1500 proteinů. Tento výsledek je porovnatelný s nedávnou studií, která byla zaměřena na analýzu sekretomu u gramnegativní bakterie *Escherichia Coli*, a ve které bylo identifikováno dohromady 1241 proteinů (Niguroji 2017).

Z celkového počtu dosažených identifikací 42 proteinů tvořilo kontaminanty, přičemž 17 proteinů pocházelo ze *Saccharomyces*, pravděpodobně byly součástí R2A média. Zbývající kontaminace představovaly především lidské keratiny. Fakt, že pouze 1,12 % z celkového počtu identifikací náleželo proteinům z kultivačního média, odpovídá výsledkům komentovaným v předchozí kapitole.

Tabulka č. 5: Identifikované proteiny z bakteriálních kmenů *Pseudomonas prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433

Kmen	Replikát	Kultivace	Počet identifikovaných proteinů	Průměrný počet přiřazených spekter	Průměrný počet pokrytí sekvence (%)	Celkový počet identifikovaných proteinů (kmen)	Celkový počet identifikovaných proteinů z Pseudomonád	Celkový počet identifikovaných proteinů (celá studie)
2673	1	Bez mitomycinu	651	11,4	7,5	1167	1472	1514
		S mitomycinem	597	11,5	6,9			
	2	Bez mitomycinu	504	8,8	6,0			
		S mitomycinem	469	9,1	6,0			
2433	1	Bez mitomycinu	511	9,4	6,5	1034		
		S mitomycinem	554	10,8	7,0			
	2	Bez mitomycinu	394	6,1	4,4			
		S mitomycinem	502	9,7	6,1			



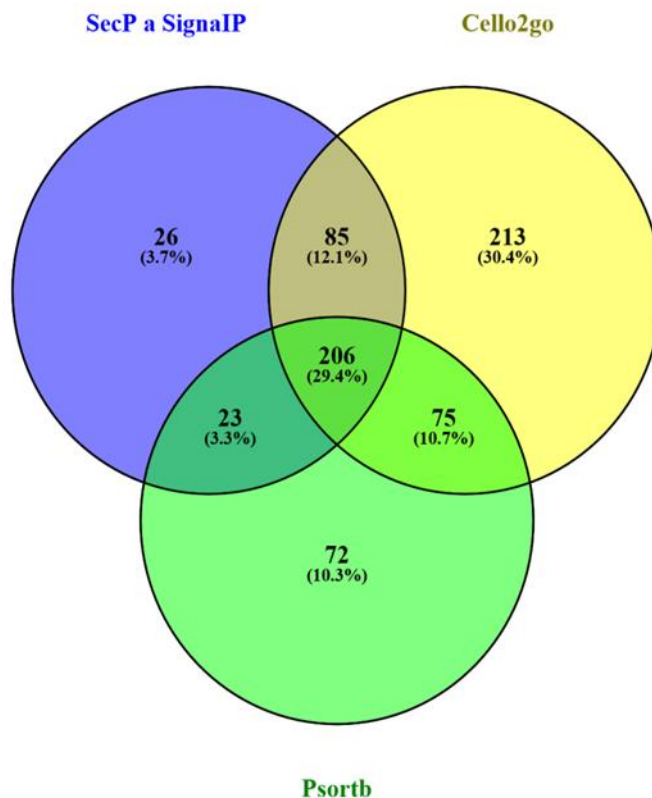
Celkově lze říci, že jak počty identifikací, tak i zbylé charakteristiky (počty přiřazených spekter, pokrytí sekvence), byly srovnatelné pro oba kmeny i obě biologické opakování (Tab. 5). Při detailnějším pohledu ale můžeme konstatovat, že u kmene *Pseudomonas prosekii* 2673 bylo identifikováno nepatrně více proteinů, než u *Pseudomonas* sp. 2433 (diference byla 133 identifikací). Dále bylo zjištěno, že bakterie *Pseudomonas prosekii* 2673, které byly kultivovány bez mitomycinu C, poskytly více identifikovaných proteinů. Naproti tomu u bakterií *Pseudomonas* sp. 2433 bylo identifikováno více proteinů ve vzorcích, u nichž byla provedena indukce mitomycinem C. Vysvětlením těchto rozdílů může být genetická diference analyzovaných kmenů a tím pádem i odlišnost v jejich fyziologii.

#### **5.4 Predikce sekretovaných proteinů a jejich další anotace**

Dohromady bylo identifikováno 1472 bakteriálních proteinů, nelze ale předpokládat, že se jedná pouze o sekretované proteiny. Přítomnost dalších proteinů může být vysvětlena buněčnou lyzí při kultivaci, jak už bylo dříve publikováno (Niguroji a kol. 2017; Jabbour a kol. 2014). Pro predikci sekretovaných proteinů z gramnegativních bakterií rodu *Pseudomonas* bylo proto využito několik on-line aplikací, které byly vybrány na základě rozdílného algoritmu (SecretomeP, SignalP, Cello2go a Psortb).

SignalP predikuje klasicky sekretované proteiny, které obsahují tzv. signální peptid. Oproti tomu neklasicky sekretované proteiny predikované SecretomeP tento signální peptid ve své aminokyselinové sekvenci postrádají. Dohromady bylo těmito algoritmy predikováno 340 proteinů, z nichž bylo 195 označeno jako klasicky sekretované a zbylých 145 bylo kategorizováno jako neklasicky sekretované proteiny. Dále byla použita aplikace Cello2go, která kromě predikce buněčné lokalizace proteinu umožňuje navíc i anotaci genové ontologie. Poslední použitou aplikací byl Psortb, který je specializován na predikci lokalizace proteinů v bakteriální buňce. Tyto aplikace predikovaly 579 (Cello2go) a 376 (Psortb) potenciálně sekretovaných proteinů.

Celkový počet proteinů predikovaných jako sekretované byl 700 (Obr. 19), což představuje 48 % z celkového počtu identifikací. Tento výsledek je téměř totožný s výsledkem z výše citované studie od Niguroji a spoluautorů, kde byl podíl predikovaných sekretovaných proteinů 46 % (Niguroji a kol. 2017).

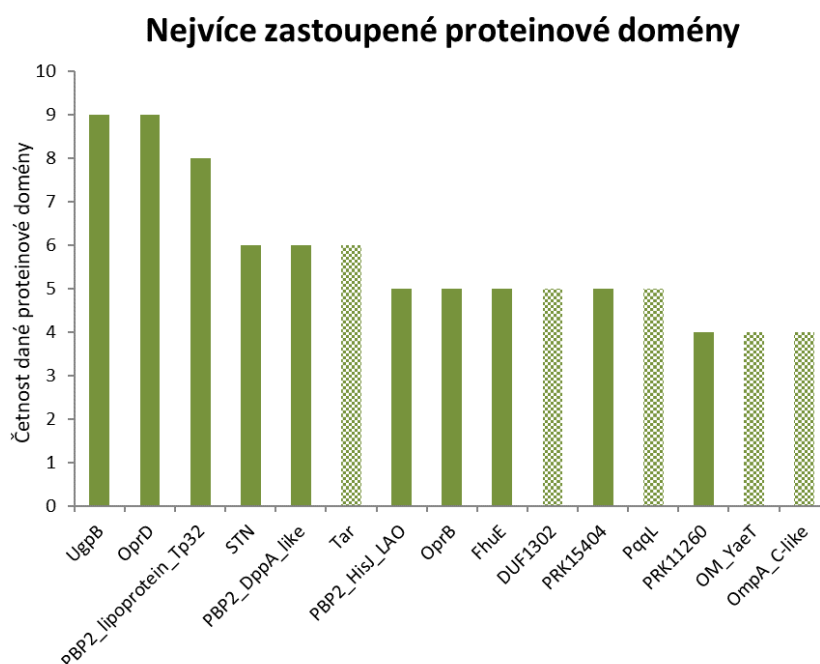


Obrázek č. 19: Vennův diagram sekrétovaných proteinů predikovaných online - aplikacemi SecretomeP (SecP), SignalP, Cello2go a Psortb

Jak již bylo uvedeno dříve, aplikace SecretomeP, SignalP a Psortb poskytly porovnatelné počty predikcí, zatímco aplikace Cello2go poskytla o více než 200 predikcí více. Zajímavý je fakt, že 213 predikcí bylo pro tuto aplikaci opravdu unikátní (Obr. 19). Společným prvkem všech použitých aplikací je vyhledávání proteinů na základě jejich sekvence a fyzikálně-chemických vlastností. Aplikace Cello2go však navíc funguje i na základě vyhledávání homologie (algoritmus BLAST) (Yu a kol. 2014). Tím může být vysvětlen rozdíl v počtu predikcí.

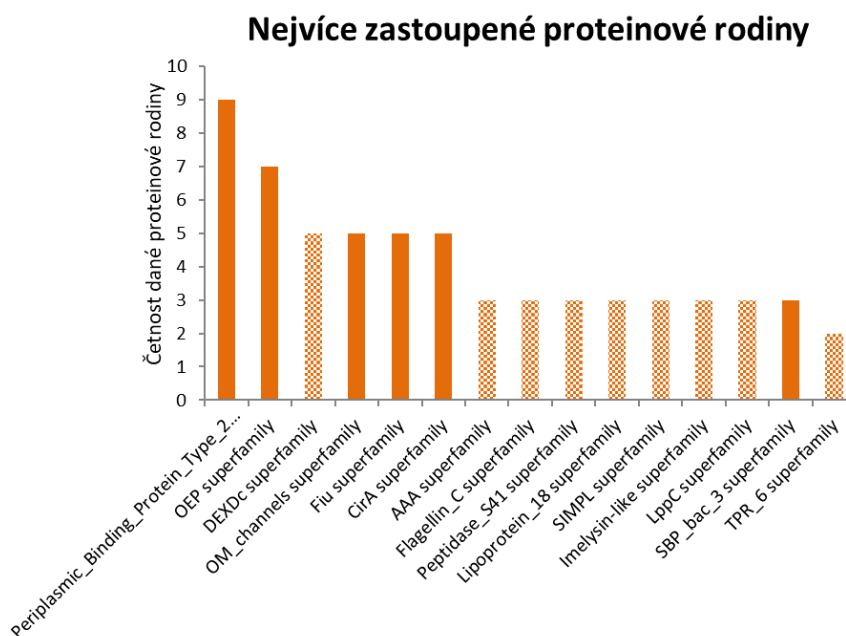
Minimálně dvěma nezávislými aplikacemi bylo jako sekrétované predikováno 389 proteinů a u této skupiny je proto vyšší pravděpodobnost, že predikce byla správná. Pro charakterizaci těchto proteinů byla vyhledána dostupná anotace z databáze UniProt. Tato databáze však neposkytovala dostatečné množství informací (například buněčná lokalizace byla dostupná pouze pro 81 proteinů). Pro další specifikaci potenciálně sekrétovaných proteinů proto byla vybrána aplikace CD-search, která umožňuje vyhledávání konzervovaných domén v sekvenci proteinu (Marchler-Bauer a Bryant 2004), a tak poskytuje informace o jeho funkci. Navíc byly také využity dostupné

informace z aplikace Cello2go, přesněji se jednalo o pojmy genové ontologie pro kategorie molekulární funkce a biologický proces.



Obrázek č. 20: Nejččetněji zastoupené proteinové domény u potenciálně sekretovaných proteinů.

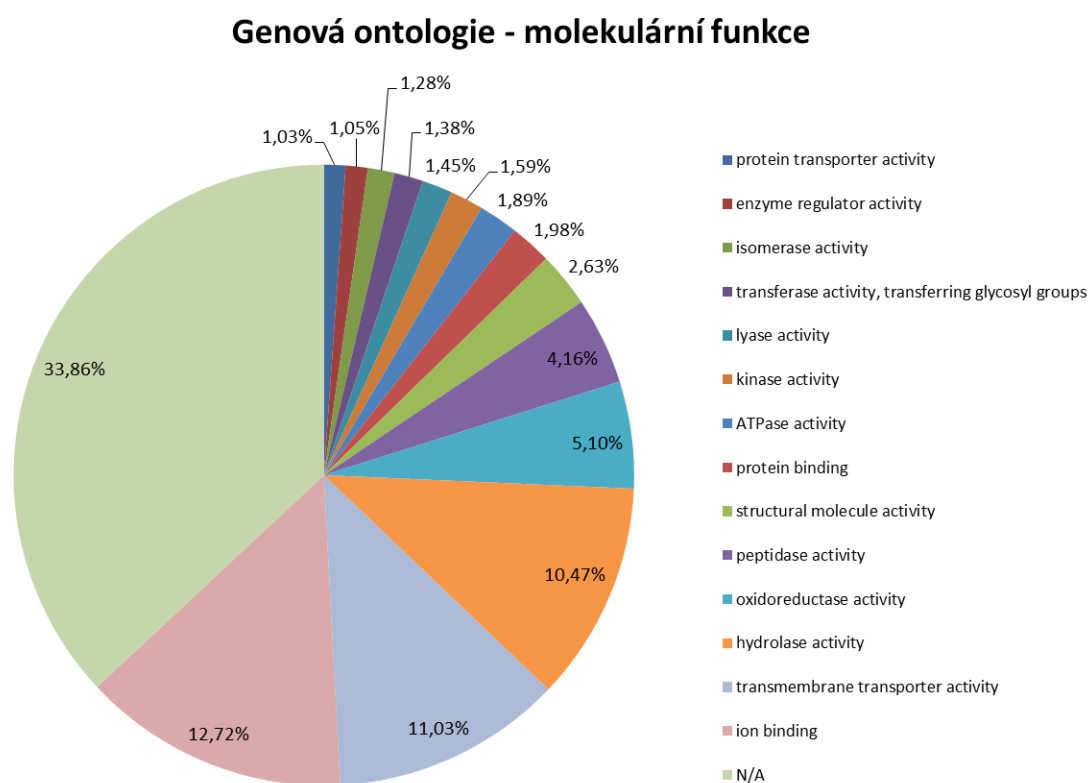
Souvislá výplň prezentuje domény s transportní funkcí



Obrázek č. 21: Nejččetněji zastoupené proteinové rodiny u potenciálně sekretovaných proteinů.

Souvislá výplň prezentuje rodiny s transportní funkcí

Ze sloupcového grafu na Obrázku č. 20 lze vidět nejčteněji zastoupené proteinové domény, které plní převážně transportní funkci (Obr. 20). Tomu také odpovídá další graf s nejčtenějšími proteinovými rodinami (Obr. 21), které opět zprostředkovávají převážně transport přes buněčnou stěnu bakterií. Mimo jiné se zde ale vyskytuje i několik dalších rodin, které plní i jiné úlohy (Obr. 21). Mezi takové proteinové rodiny se řadí například flagelliny, což jsou proteiny, které se podílejí na utváření bakteriálního bičíku. Dalšími proteinovými rodinami jsou Imelysin-like superfamily a Peptidase S41 superfamily. Obě tyto rodiny se řadí mezi hydrolázy, navíc imelysin byl poprvé objeven právě u gramnegativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Jeho funkce spočívá ve štěpení fibrinogenu, čímž by se mohl podílet na patogenicitě (Fricke a kol. 1999).

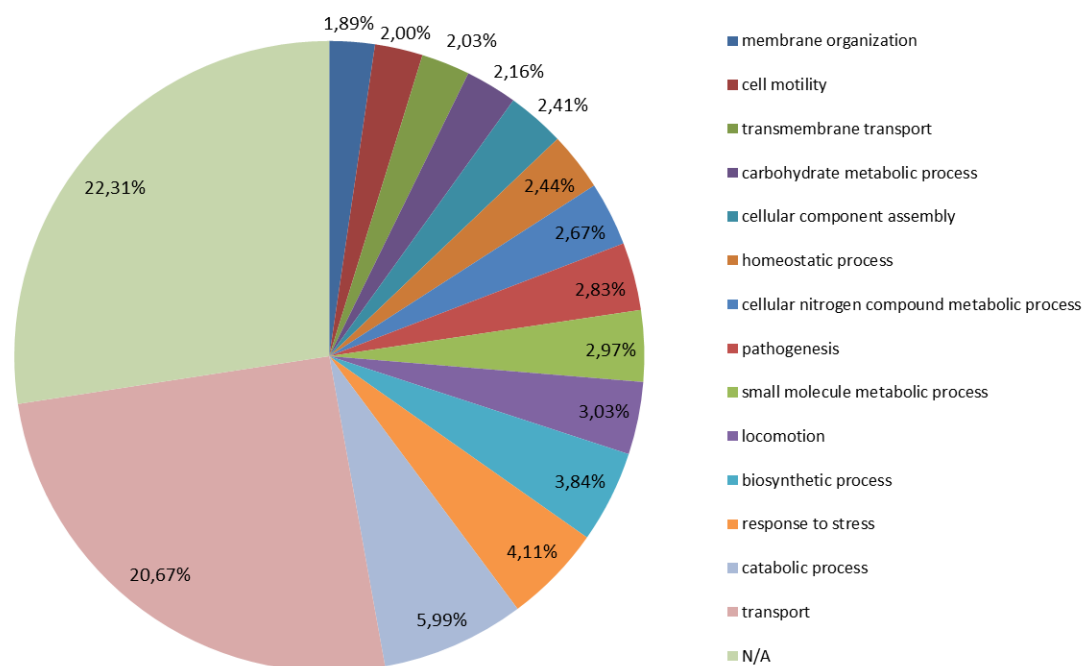


Obrázek č. 22: Nejčtenější pojmy genové ontologie v kategorii molekulární funkce u potenciálně sekretovaných proteinů

Analýze proteinových rodin a domén odpovídají i informace získané z rozboru genové ontologie. To lze dokázat například čítným zastoupením proteinů s hydrolázovou, respektive s peptidázovou aktivitou (Obr. 22). Mezi nejčtenějšími

biologickými procesy byla navíc prokázána i patogenicitu další z pojmů zmiňovaných výše (Obr. 23). Nadto pak nejvíce proteinů vykazuje transportní funkci (Obr. 22 a 23).

### Genová ontologie - biologický proces



Obrázek č. 23: Nejčetnější pojmy genové ontologie v kategorii biologický proces u potenciálně sekretovaných proteinů

Při hlubší analýze získaného datasetu bylo zjištěno, že se mezi identifikovanými proteiny bohužel nenachází žádné bakteriociny. Tento fakt může být vysvětlen například jejich nízkou koncentrací a současně i poměrně silnou kontaminací analyzovaného kultivačního média proteiny z cytoplazmy bakteriální buňky. Při MS analýze tak mohly být signály peptidů náležících bakteriocinům potlačeny signály peptidů jiných koncentrovanějších proteinů. Mohlo dojít také k sekvenčním rozdílům, tím pádem nemusely být peptidy těchto proteinů správně přiřazeny.

## 5.5 Příklady proteinů sekretovaných bakteriemi z rodu *Pseudomonas*

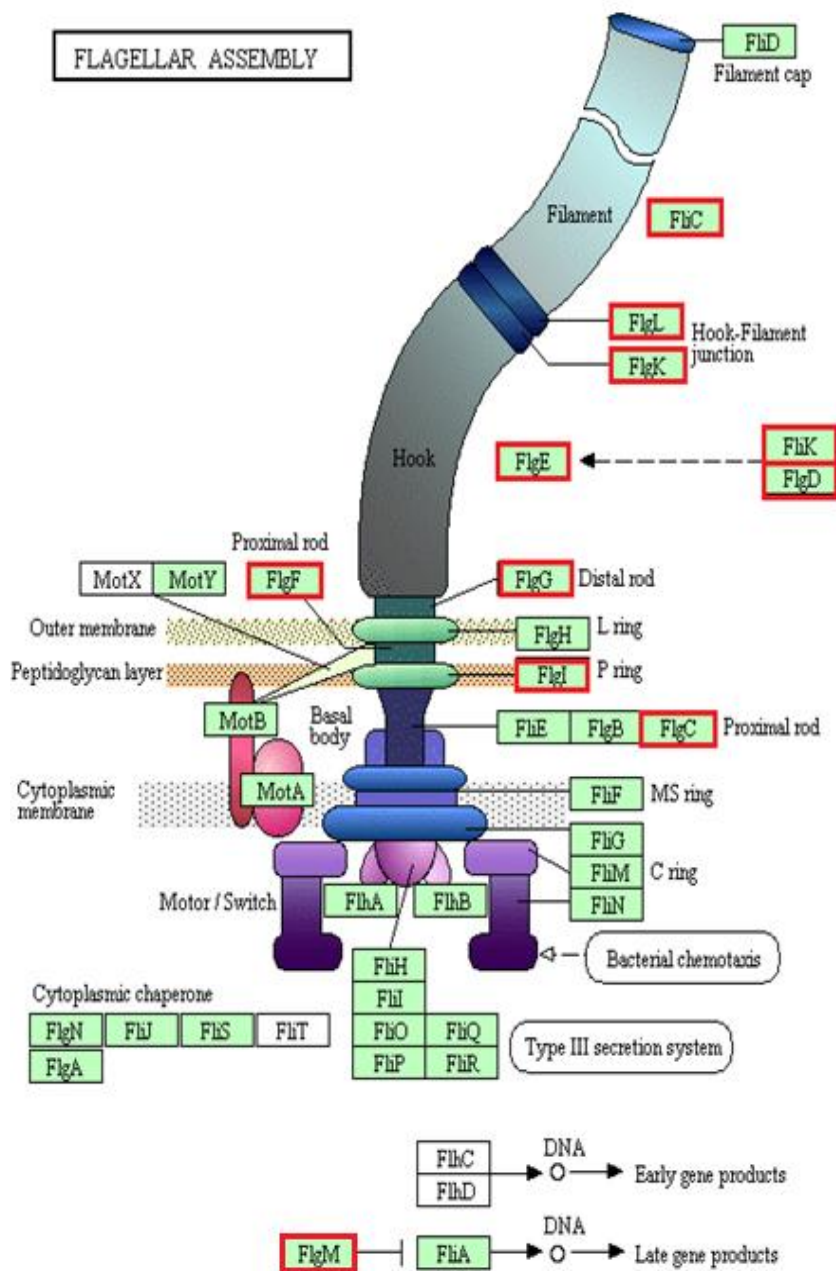
Diskutovat veškeré identifikované sekretované proteiny by bylo nad rámec této práce, ne-li zcela nemožné. Z tohoto důvodu bylo z datasetu 389 sekretovaných proteinů vybráno několik zástupců, u nichž byly detailněji popsány jejich hlavní funkce.

Jak bylo zmíněno v minulé kapitole, celkově nejzastoupenější byly proteiny účastnící se transportu (Obr. 20 - 23). Do této skupiny můžeme zařadit například proteiny TolC, BamA, FtsY a TonB. TolC je sekretovaný protein, jenž se v gramnegativních bakteriích vyskytuje ve vnější bakteriální membráně v rámci T1SS. Jeho hlavní molekulární funkcí je především transport toxinů a antimikrobiálních látek z buňky. Hraje tak klíčovou roli v rezistenci a je také důležitý pro přežití patogenu v průběhu infekce (Koronakis a kol. 2004).

Dalším sekretovaným proteinem z bakterií *Pseudomonas* je BamA, který se vyskytuje v T5SS. Je součástí komplexu vnějších membránových proteinů (Bam) a konkrétně se podílí na vkládání a sestavování  $\beta$ -barelových proteinů do vnější membrány, čímž umožňuje export tzv. „passenger“ domén (detailněji popsáno výše v teoretické části) (Tomassen 2010).

Dále byl detekován protein FtsY. Ten je součástí sekreční dráhy Sec, která v rámci TSS5 přímo spolupracuje s Bam komplexem. FtsY je částečně lokalizován jak v membráně tak i v cytosolu. Podílí se na vkládání nově vznikajících membránových proteinů do cytoplazmatické membrány, v tomto procesu přesněji působí jako receptor pro komplex tvořený částicemi SRP (signal recognition particle) a RNC (ribosome-nascent chain). Interakcí komplexu SRP-RNC-FtsY dochází k transportu částice RNC na Sec translokázu, která ho vkládá do membrány. Hydrolýzou GTP pak dochází k disociaci komplexu na jednotlivé složky (Tsirigokati a kol. 2016). Mezi molekulárními funkcemi přiřazenými FtsY tak bylo možno nalézt GTPázovou a hydrolázovou aktivitu.

Mezi další sekretované proteiny patří také TonB protein (TonB-dependent hemin, ferrichrome receptor). Jedná se o bakteriální protein, který se u gramnegativních bakterií vyskytuje na vnější straně bakteriální membrány. Tento protein zajišťuje především přenos velkých substrátů, jako jsou například tzv. siderofory. Tyto substráty vážou železo, které je nezbytné pro metabolismus a růst bakterií (Noinja a kol. 2010).



Obrázek č. 24: Schématické znázornění proteinové skladby bakteriálního flagelárního systému. Červeně jsou zvýrazněny proteiny, které byly v této práci přímo detekovány (schéma převzato z: [http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight\\_pathway?scale=1.0&map=map02040&keyword=flagellar assembly](http://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map02040&keyword=flagellar%20assembly)).

Mezi nejčastější biologické procesy, kterých se identifikované sekretované proteiny účastní, byly pohyb, buněčná motilita a patogenicita (Obr. 23). Všech těchto

dějí se účastní proteiny z rodiny flagellinů, které, jak bylo uvedeno výše, vytvářejí organelu zvanou bičík. Proto jsou také molekulárními funkcemi, které jsou s těmito proteiny spojeny, především strukturní molekulová aktivita, vazba proteinů a hydrolázová aktivita spojená s buněčným pohybem. Bičík je v membráně utvářen až 29 různými proteiny (Obr. 24) a jeho úloha je pohyb a adheze buněk (Rossez a kol. 2015). Z tohoto rozsáhlého proteinového komplexu bylo detekováno 11 proteinů, přičemž se tyto proteiny nacházely převážně na povrchu bakteriální buňky (Obr. 24). To odpovídá předpokladům, protože analyzované kultivační médium by mělo obsahovat především sekretované proteiny a proteiny z povrchu bakteriální buňky.

Signal peptidase I (SPasa I) je sekretovaný protein s hydrolázovou, konkrétně peptidázovou, aktivitou. Je zodpovědný za štěpení signálního peptidu z translokovaných preproteinů. Umožňuje tedy uvolnění sekretovaných proteinů z bakteriální membrány a následovně jejich správné složení. Bylo prokázáno, že akumulace preproteinů na membráně je pro růst bakterií škodlivá, a proto jsou enzymy jako SPasa I nezbytné pro přežití buněk (Auclair, Bhanu a Kendall 2012).

Adhesin/hemagglutinin, HecA se řadí mezi hemagglutininové adheziny produkované různými patogenními bakteriemi. Přispívají k připojení, agregaci a zabíjení epidermálních buněk. Hemagglutininové adheziny jsou obecně významnými faktory virulence u rostlinných i živočišných patogenů (Rojas a kol. 2002).



## 6 ZÁVĚR

V současné době je věnováno velké úsilí výzkumu sekretomu bakterií, jak to například dokládá nedávná studie sekretomu gramnegativní bakterie *E. coli* (Niguroji a kol. 2017). Sekretované proteiny totiž představují virulentní faktory, které jsou hlavní příčinou bakteriální patogeneze. Mimo to vykazují některé sekretované proteiny (konkrétně bakteriociny) antimikrobiální účinky a jeví se tak jako slibná antibiotika. Tato práce byla zaměřena na studium sekretomu gramnegativních bakterií rodu *Pseudomonas*, konkrétně kmenů *Pseudomonas prosekii* 2673 a *Pseudomonas* sp. 2433. Tyto kmeny sice nepředstavují významné patogeny, ale i přesto mohou poskytnout užitečné informace využitelné v řadě klinických oborů. Produkují totiž výše zmíněné bakteriociny a jejich identifikace by tak mohla vést k dalšímu vývoji nových terapeutik.

Experimentální část této práce proto byla zaměřena na sestavení pracovního postupu, který by byl použitelný pro identifikaci bakteriálních sekretovaných proteinů. V první fázi navrženého protokolu bylo provedeno vysrážení proteinů z kultivačního média pomocí acetonu. V následujícím kroku byla směs proteinů podrobena elektroforetické separaci (SDS-PAGE), pomocí níž bylo ze vzorků získáno více proteinových frakcí. Získané proteinové frakce byly poté štěpeny trypsinem na peptidy. Na závěr bylo provedeno měření na hmotnostním spektrometru za využití ionizační techniky ESI, která je vhodná pro analýzu vysokomolekulárních látek. Za pomoci tohoto postupu bylo dohromady identifikováno 1472 proteinů, z nichž bylo 389 proteinů predikováno jako sekretovaných. Predikce byla provedena pomocí 3 aplikací (SecretomeP, SignalP, Cello2 a Psortb), které pracují na základě rozdílného algoritmu. Na závěr byla ještě použita aplikace CD-search, která poskytuje vyhledávání proteinových domén a tím pádem hlubší charakterizaci identifikovaných proteinů.

Tato bakalářská práce probíhala v rámci spolupráce Oddělení biochemie proteinů a proteomiky Centra regionu Haná a Oddělení mikrobiologie Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, kde se téma charakterizace nových bakteriocinů (pyocinů) aktuálně řadí mezi hlavní výzkumné cíle. I když v této práci žádné bakteriociny identifikovány nebyly, výše zmíněné výsledky naznačují, že navržený postup je pro identifikaci proteinů sekretovaných bakteriemi použitelný a do budoucna by tak mohl přinést požadované výsledky. Cíle práce byly splněny.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdi-Ali A., Worobec E.A., Deezagi A., Malekzadeh F. (2004) Cytotoxic effects of pyocin S2 produced by *Pseudomonas aeruginosa* on the growth of three human cell lines. *Can J Microbiol*, 50(5): 375 - 381.

Aebersold R., Mann M. (2016) Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, 537(7620): 347 - 355.

Auclair S.M., Bhanu MK, Kendall DA. (2012) Signal peptidase I: cleaving the way to mature proteins. *Protein Sci*, 21(1): 13 - 25.

Ball G., Antelmann H., Imbert P.R.C., Gimenez M.R., Voulhoux R., Ize B. (2016) Contribution of the Twin Arginine Translocation system to the exoproteome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep.*, 6: 27675.

Barros J., Becerra J., González C., Martínez M. (2013) Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia Microbiol (Praha)*, 58(2): 127 - 133.

Bednář M. a kol. (1996) *Lékařská mikrobiologie : bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Marvil, 558 s. ISBN 8023802976.

Bendtsen J.D., Kiemer L., Fausbøll A., Brunak S. (2005) Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology*, 5: 58

Boja E.S., Fales H.M. (2001) Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Anal Chem*, 73: 3576 - 3582.

Bönemann G.; Pietrasiuk A.; Diemand A.; Zentgraf H.; Mogk A. (2009) "Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion". *EMBO Journal*, (28): 315 – 325.

Brodský J.L. (2007) The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J*, 404(3): 353 - 363.

Brandon L.D., Goehring N., Janakiraman A., Yan A.W., Wu T., Beckwith J., Goldberg M.B. (2003) IcsA, a polarly localized autotransporter with an atypical signal peptide, uses the Sec apparatus for secretion, although the Sec apparatus is circumferentially distributed. *Molecular Microbiology*. 50(1): 45 – 60

Brown L., Wolf J.M. (2015) Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 13(10): 620 - 630.

Brown E.D., Wright G.D. (2016) Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. 2016, 529(7586): 336 - 343.

Büttner D. (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly and regulation of type III secretion systems from plant-and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2): 262 - 310.

Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B. (2007) Type III Secretion Systems and Disease. *Clin Microbiol Rev*; 20(4): 535 – 549.

Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L. (2004) Righetti PGBlue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9): 1327 - 1333.

Costa T.R., Felisberto - Rodrigues C., Meir A., Prevost M.S., Redzej A., Trokter M., Waksman G. (2015) Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*; 13(6): 343 - 359.

Cavera V.L., Arthur T.D., Kashtanov D., Chikindas M.L. (2015) Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*, 46(5): 494 - 501.

Cox J., Mann M. (2011) Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annu Rev Biochem*, 80: 273 - 299.

dos Santos K.V., Diniz C.G., Veloso Lde C., de Andrade H.M., Giusta Mda S., Pires Sda F., Santos A.V., Apolônio A.C., de Carvalho M.A., Farias Lde M. (2010) Proteomic analysis of *Escherichia coli* with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam. *Res Microbiol*, 161(4): 268 - 275.

Diepold A., Amstutz M., Abel S., Sorg I., Jenal U., Cornelis G.R. (2010) Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J*, 29(11): 1928 - 1940.

Edman P. (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem*, 22(3): 475.

Fenn J.B., Mann M., Meng C.K. a kol. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large bio molecules. *Science*, 246(4926): 64 – 71.

Feltcher M.E., Braunstein M. (2012) Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat Rev Microbiol*, 10(11): 779 - 789.

Fricke B., Parchmann O., Kruse K., Rücknagel P., Schierhorn A., Menge S. (1999) Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. *Biochim Biophys Acta*, 1454(3): 236 - 250.

Fyfe J.A., Harris G., Govan J.R. (1984) Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*, 20(1): 47 - 50.

Ghequire MG, Dillen Y, Lambrichts I, Proost P, Wattiez R, De Mot R. (2015) Different Ancestries of R Tailocins in Rhizospheric *Pseudomonas* Isolates. *Genome Biol Evol*, 7(10): 2810 - 2828.

Ghequire M.G., De Mot R. (2014) Ribosomally encoded antibacterial proteins and peptides from *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*, 38(4): 523 - 568.

Giacomodonato M.N., Uzzau S., Bacciu D., Caccuri R., Sarnacki S.H., Rubino S., Cerquetti M.C. (2007) SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology*, 153(Pt 4): 1221 - 1228.

Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. (2005) Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Curr Pharm Des*, 11(8): 1067 - 1075.

Gram H.C. (1884) Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medizin*, 2: 185 – 189.

Green E.R., Meccas J. (2016) Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectrum*, 4(1).

Grifantini R., Bartolini E., Muzzi A., Draghi M., Frigimelica E., Berger J., Randazzo F., Grandi G. (2002) Gene expression profile in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* upon host-cell contact: from basic research to vaccine development. *Ann N Y Acad Sci*, 975: 202 - 216.

Han M.J., Lee S.Y. (2006) The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(2): 362 - 439.

Havlasová J., Hernychová L., Halada P., Pellantová V., Krejsek J., Stulík J., Macela A., Jungblut P.R., Larsson P., Forsman M. (2002) Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics*, 2(7): 857 - 867.

Higerd T.B., Barchler C.A., Berk R.S. (1967) In vitro and in vivo characterization of pyocin. *J. Bacteriol*, (93): 1976 – 1986.

Chatterjee M., Anju C.P., Biswas L., Anil Kumar V., Gopi Mohan C., Biswas R. (2016) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol*, 306(1): 48 - 58.

- Chaussee M.A., McDowell E.J., Rieck L.D., Callegari E.A., Chaussee M.S. (2006) Proteomic analysis of a penicillin-tolerant rgg mutant strain of *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother*, 58(4): 752 - 759.
- Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc*, 1(4): 1852 - 1858.
- Chong P.M., Lynch T., McCorrister S., Kibsey P., Miller M, Gravel D., Westmacott G.R., Mulvey M.R. (2014) Proteomic analysis of a NAP1 *Clostridium difficile* clinical isolate resistant to metronidazole. *PLoS One*, 9(1): e82622.
- Jabbour R.E., Deshpande S.V., McCubbin P.E., Wright J.D., Wade M.M., Snyder APOD. (2014) Extracellular protein biomarkers for the characterization of enterohemorrhagic and enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *J Microbiol Methods*, 98: 76-83.
- Jayaseelan S., Ramaswamy D., Dharmaraj S. (2014) Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*, 30(4): 1159 - 1168.
- Jensen O.N. (2006) Interpreting the protein language using proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(6): 391 - 403.
- Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Zimny - Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann S.H. (1999) Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol*, 33(6): 1103 - 1117.
- Kadurugamuw J.L., Beveridge T.J. (1996) Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol*, 178(10): 2767 – 2774.
- Kageyama M. (1964) Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. *J Biochem*, 55: 49 - 53.

Kosina M., Barták M., Mašlaňová I., Pascutti A., Sedo O., Lexa M., Sedláček I. *Pseudomonas prosekii* sp. nov., a novel psychrotrophic bacterium from Antarctica. *Curr Microbiol.* 2013, 67(6): 637 - 646.

Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680 - 685.

Langmeier M a kol. (2009) *Základy lékařské fyziologie*. Praha: Grada Publishing a.s., 19 s. ISBN 9788024770246.

Lavander M., Ericsson S.K., Broms J.E., Forsberg A. (2006) The twin arginine translocation system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*, 2006, 74: 1768 – 1776.

Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A., Portnoy D.A. (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(21): 12432 - 12437.

León I.R., Schwämmle V., Jensen O.N., Sprenger R.R. (2013) Quantitative assessment of in - solution digestion efficiency identifies optimal protocols for unbiased protein analysis. *Mol Cell Proteomics*, 12(10): 2992 - 3005.

Lillington J., Geibel S., Waksman G. (2015) Reprint of “Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili”. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 554 – 564.

Livermore D.M. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin. Infect*, 34: 634 – 640.

Makarov A., Hu Q., Noll R.J., Li H., Hardman M., Graham Cooks R. (2005) The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J Mass Spectrom*, 2005 Apr, 40(4): 430 - 443.

Mallick P., Kuster B. (2010) Proteomics: a pragmatic perspective. *Nat Biotechnol*, 28(7): 695 - 709.

Mancini R., Aebi M., Helenius A. (2003) Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J Biol Chem*, 278(47): 46895 - 46905.

Marchler - Bauer A., Bryant. (2004) CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*, 1;32(Web Server issue): W327 - 331.

Michel - Briand Y, Baysse C. (2002) The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, 84(5 - 6): 499 - 510.

Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L., Gooley A.A. (2000) Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem*, 267(10): 2871 - 2881.

Neubert H., Bonnert T.P., Rumpel K., Hunt B.T., Henle E.S., James I.T. (2008) Label - free detection of differential protein expression by LC/MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res*, 7(6): 2270 - 2279.

O'Brien A., Sharp R., Russell N.J., Roller S. (2004) Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiol Ecol*, 48(2): 157 - 167.

O'Farrell P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250(10): 4007 - 4021.

Ochsner U.A., Snyder A., Vasil A.I., Vasil M.L. (2002) Effects of the twinarginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(12): 8312 - 8317.

Palleroni N.J. (2005): Genus I. *Pseudomonas*. In: Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. [eds.]: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. pp. 323 – 379.

Petersen T.N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*; 8(10): 785 - 786



Pinto E., Anselmo M., Calha M., Bottrill A., Duarte I., Andrew P.W., Faleiro M.L. (2017) The intestinal proteome of diabetic and control children is enriched with different microbial and host proteins. *Microbiology*, 163(2): 161 - 174.

Pradel N., Ye C.Y., Livrelli V., Xu H.G., Joly B., Wu L.F. (2003) Contribution of the twin arginine translocation system to the virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 71: 4908 – 4916.

Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. (2007) Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*, 2(8): 1896 - 1906.

Reasoner D.J., Geldreich E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol*, 49(1): 1 - 7.

Rossez Y., Wolfson E.B., Holmes A., Gally D.L., Holden N.J. (2015) Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog*, 11(1): e1004483.

Rojas C.M., Ham J.H., Deng W.L., Doyle J.J., Collmer A. (2002) HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(20): 13142 - 13147.

Sánchez L.A., Gómez F.F., Delgado O.D. (2009) Cold-adapted microorganisms as a source of new antimicrobials. *Extremophiles*, 13(1): 111 - 120.

Sedláček I., Pantůček R., Králová S., Mašlaňová I., Holochová P., Staňková E., Sobotka R., Barták M., Busse H.J., Švec P. (2017) *Mucilaginibacter terrae* sp. nov., isolated from Antarctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 67(10): 4002 - 4007.

Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1(6): 2856 - 2860.

Scherer S., Neuhaus K. (2006) Life at Low Temperatures. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. [eds.]: The Prokaryotes. Volume 2: Ecophysiology and Biochemistry. 3rd ed. Pp 210 - 262.

Šebela M., Štosová T., Havliš J., Wielsch N., Thomas H., Zdráhal Z. and Shevchenko A. (2006) Thermostable trypsin conjugates for high-throughput proteomics: synthesis and performance evaluation. *Proteomics*, 6, 2959 - 2963.

Steen H., Mann M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Rev Mol Cell Biol*, 5(9): 699 - 711.

Tsirigotaki A., De Geyter J., Šoštaric N., Economou A., Karamanou S. (2016) Protein export through the bacterial Sec pathway. *Nat Rev Microbiol*, 15(1): 21 - 36.

Unlü M., Morgan M.E., Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, (11): 2071 - 2077.

Van Delden C. (2004) Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* In: Ramos J.L. [eds.], *Pseudomonas: Volume 2: Virulence and gene regulation*. 3 – 22. Kluwer Academic, New York.

van der Linde K., Lim B.T., Rondeel J.M., Antonissen L.P., de Jong G.M. (1999) Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. *Nephrol Dial Transplant*, 14 (10): 2433 – 2437.

van Ulsen P., Rahman S.U., Jong W.S.P., Daleke-Schermerhorn M.H., Luirink J. (2014) Type V secretion: from biogenesis to biotechnology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1843: 1592 – 1611.

Votava M., Broukal Z. (2007) *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. 2. přepr vydání. Brno: Neptun. ISBN 9788086850030.

Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J. Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(45): 7342 - 7372.

- Wu K.H., Tai P.C. (2004) Cys32 and His105 are the critical residues for the calcium-dependent cysteine proteolytic activity of CvaB, an ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem*, 279(2):901 – 909.
- Wright K.J., Seed P.C., Hultgren S.J. (2007) Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol.* 9, 2230 – 2241.
- Wurpel D.J., Moriel D.G., Totsika M., Easton D.M., Schembri M.A. (2015) Comparative analysis of the uropathogenic *Escherichia coli* surface proteome by tandem mass-spectrometry of artificially induced outer membrane vesicles. *J Proteomics*, 2115:93 - 106.
- Yates J.R., Ruse C.I., Nakorchevsky A. (2009) Proteomics by mass spectrometry: approaches, advantages, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*, 11: 49 – 79.
- Yu C.S., Cheng C.W., Su W.C., Chang K.C., Huang S.W., Hwang J.K., Lu C.H. (2014) CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *Plos One*, 9(6): e99368.
- Yu N.Y., Wagner J.R., Laird M.R., Melli G., Rey S., Lo R., Dao P., Sahinalp S.C., Ester M., Foster L.J., Brinkman F.S. (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13): 1608 - 1615.
- Zhang Y., Chen X.L., Huang A.W., Liu S.L., Liu W.J., Zhang N., Lu X.Z. (2016) Mortality attributable to carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a meta-analysis of cohort studies. *Emerg Microbes Infect*, 23. 5: e27.
- Zhou J., Hao D., Wang X., Liu T., He C., Xie F., Sun Y., Zhang J. (2006) An important role of a probable ATP-binding component of ABC transporter" during the process of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to fluoroquinolone. *Proteomics*, 6(8):2495 - 2503.

Yashroy R. (1993) Electron microscope studies of surface pilli and vesicles of Salmonella 3,10:r:- organisms. Indian Journal of Animal Sciences, 63 (2): 92 - 102.

Zimmermann R., Eyrisch S., Ahmad M., Helms V. (2011) Protein translocation across the ER membrane. Biochim Biophys Acta, 1808(3): 912 - 924.

Zumsteg A.B., Goosmann C., Brinkmann V., Morona R., Zychlinsky A. (2014) IcsA Is a Shigella flexneri Adhesion Regulated by the Type III Secretion System and Required for Pathogenesis. Cell Host & Microbe, 15(4): 435 – 445

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ACN	acetonitril
APS	persíran amonný
BIS	N',N'-methylenbisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
DTT	dithiothreitol
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
IAM	iodacetamid
LC-MS/MS	kapilární chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí

MeOH	methanol
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
nLC	nanokapilární kapalinová chromatografie
Q-TOF	hybridní tandemový hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu
rpm	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforetická separace v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Sec	sekreční dráha-Secretory translocaze, sekreční translokáza
Tat	sekreční dráha- Twin-arginine targeting, translokáza transportující proteiny s motivem zdvojeného argininu
T1SS	sekreční systém typu I (Type I secretion systém)
T2SS	sekreční systému typu II (Type II secretion systém)

T3SS	sekreční systém typu III (Type III secretion system)
T4SS	sekreční systém typu IV (Type IV secretion system)
T5SS	sekreční systém typu V (Type V secretion system)
T6SS	sekreční systém typu VI (Type VI secretion system)
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEAB	bikarbonát triethylamonný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan