

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Analýza proteinů a peptidů bakterie *Francisella tularensis* za
účelem výběru identifikačních a typizačních markerů**

Bc. Jana Udržalová

Diplomová práce
2009

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

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

Název tématu: **Analýza proteinů a peptidů bakterie Francisella tularensis
za účelem výběru identifikačních a typizačních markerů**

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

- 1) Teoretická část:
 - a) Infekce Francisella tularensis - popis epidemiologie, taxonomie a patogenese
 - b) Použití proteinů pro identifikační a typizační účely bakterií
 - c) Metody proteomického výzkumu
 - d) Zdroje informací - genomické a proteomické databáze
- 2) Praktická část:
 - a) Kultivace bakterií
 - b) Příprava celobuněčných lyzátů a acetonitrilových extraktů
 - c) Stanovení koncentrace bílkoviny
 - d) Měření a identifikace proteinů pomocí LCMS
 - e) Tvorba databáze dat
 - f) Zpracování výsledků

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

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Martin Hubálek, Ph.D.**
FVZ UO Hradec Králové
Konzultant diplomové práce: **doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **1. října 2008**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


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

V Pardubicích dne 27. února 2009

Prohlašuji:

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

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4. 5. 2009

Jana Udržalová

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Martinu Hubálkovi, Ph. D. za jeho vedení po celou dobu práce, za jeho odborné rady a také za kritické, ale správné připomínky při zpracování této práce.

Dále děkuji celému kolektivu pracovníků FVZ UO Hradec Králové za jejich pomoc a rady při řešení úkolů, se kterými jsem se v průběhu práce musela potýkat.

V neposlední řadě děkuji Bc. Janu Duškovi za neocenitelnou pomoc při zpracovávání dat a celé své rodině, která mě v práci podporovala.

Anotace

Analýza proteinů a peptidů intracelulární bakterie *Francisella tularensis* pomocí hmotnostní spektrometrie odhalila identifikační a typizační markery, které mohou pomoci k rychlé detekci tohoto potencionálního bojového agens.

Proteiny byly získány z bakteriálních acetonitrilových extraktů a celobuněčných lyzátů. Štěpením proteinů proteolytickým enzymem trypsinem byly získány peptidy, které byly následně analyzovány kombinací separační techniky vysokoúčinné kapalinové chromatografie s analýzou tandemovou hmotnostní spektrometrií. Naměřená data byla poté zpracována databázovým vyhledávacím programem Phenyx. Použitými nástroji pro nalezení identifikačních a typizačních markerů byly databáze DataProt a UniProt.

Těmito metodami se podařilo detekovat a identifikovat velké množství proteinů a peptidů. Zpracováním dat bylo v této datové sadě objeveno 34 peptidů *Francisella tularensis holarctica* LVS a 63 peptidů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4, které se vyskytovaly v 80 % všech vzorků (bez ohledu na metodu přípravy vzorků). Porovnáním sekvencí proteinů mezi různými kmeny dané bakterie se podařilo určit 11 peptidů obsažených v 80 % vzorků, v jejichž sekvenci se nachází odlišné aminokyselinové místo v závislosti na daném kmenu bakterie. Tyto peptidy se mohou stát vhodnými kandidáty pro identifikaci a typizaci *Francisella tularensis*.

Klíčová slova

tandemová hmotnostní spektrometrie, databáze, proteiny, peptidy,
Francisella tularensis

Title

Analysis of proteins and peptides of bacterium *Francisella tularensis* in order to select markers for identification and typing.

Summary

Analysis of proteins and peptides of intracellular bacterium *Francisella tularensis* by mass spectrometry was selected for identification and typization markers which can help for rapid characterization of this potential warfare agents.

Proteins were identified in acetonitrile extracts and whole cell lysates. The proteins were digested by trypsin and peptides separated by high-pressure liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry. Measured data was processed by databases search engine Phenyx. Databases DataProt and UniProt were used as a tool for selecting markers for identification and typing.

Large amount of the proteins and peptides were detected and identified by such approach. In this, 34 peptides of *Francisella tularensis holarctica* LVS and 68 peptides of *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 that were present in 80% of all samples (regardless of preparing samples methods) were identified. 11 peptides present in 80 % of all samples were found to contain amino acid sequence differences among *Francisella tularensis* strains. These peptides can be suitable candidates for *Francisella tularensis* identification and typing.

Keywords

tandem mass spectrometry, databases, proteins, peptides, *Francisella tularensis*

Cíl práce

Cílem této práce je analýza proteinů a peptidů bakterie *Francisella tularensis*, které by mohly sloužit jako identifikační a typizační markery pro její přesnou a rychlou detekci. K tomuto účelu byly použity proteomické metody, především techniky tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) spojené s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií.

Použité zkratky

2-DE	dvoudimenzionální gelová elektroforéza
ACN	acetonitrilové extrakty nebo acetonitril
AMK	aminokyselina
BCA	kyselina bicinchoninová
BSA	hovězí sérový albumin
BSL	stupeň biologické ochrany (Biosafety Level)
CD	diferenční antigeny (Cluster of Differentiation)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision induced dissociation)
DDA	na analýze závislá data (Data Dependent Analysis)
DTT	dithiothreitol
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
HLB	kolonky Hydrophilic-Lipophilic Balanced
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high pressure liquid chromatography)
IAA	iodoacetamid
LAMP	membránový protein asociovaný s lysozomy (lysosomal-associated membrane protein)
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LPS	lipopolysacharid
LVS	živý vakcinační kmen <i>Francisella tularensis holarctica</i> (live vaccine strain)
MALDI	ionizace/desorpce laserem za účasti matrice
MCP	multikanálový detektor (multichannel plate)
MRM	multiple reaction monitoring
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MSMS	tandemové hmotnostní spektrum
NADPH	redukováná forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
PMF	metoda peptidového mapování (peptid mass fingerprinting)

PTM	posttranslační modifikace
Q	kvadrupól (quadrupole)
Q-TRAP	hmotnostní spektrometr s kvadrupólem a iontovou pastí
RP	obrácená fáze (reverse phase)
TCEP-HCl	tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochlorid
TFA	kyselina trifluoroctová
TIC	celkový iontový proud (total ion count)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
WCL	celobuněčný lyzát (whole cell lysate)

Obsah

1	ÚVOD	16
2	TEORETICKÁ ČÁST	17
2.1	FRANCISELLA TULARENSIS	17
2.1.1	Epidemiologie a taxonomie	18
2.1.2	Tularémie	21
2.1.3	Faktory virulence	24
2.1.4	Laboratorní diagnostika	27
2.2	PROTEINY	29
2.2.1	Základní chemické a fyzikální vlastnosti	30
2.2.2	Posttranslační modifikace	31
2.3	METODY PROTEOMIKY	32
2.3.1	Příprava vzorků	33
2.3.2	Stanovení koncentrace bílkoviny	34
2.3.3	Enzymatické štěpení proteinů	34
2.4	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	36
2.4.1	Součásti hmotnostního spektrometru	36
2.4.1.1	Iontové zdroje	37
2.4.1.2	Hmotnostní analyzátoři	39
2.4.1.3	Detektory	42
2.4.2	Spojení LC-MS	43
2.5	ZPRACOVÁNÍ DAT	45
2.5.1	Data tandemové hmotnostní spektrometrie	45
2.5.2	Databáze	45
2.5.2.1	Databázové vyhledávací programy	46
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
3.1	KULTIVACE BAKTERIÍ	49
3.1.1	Materiál, chemikálie a roztoky	49
3.1.2	Technické vybavení	50
3.1.3	Postup	50
3.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ	50
3.2.1	Acetonitrilové extrakty	51
3.2.1.1	Chemikálie a roztoky	51
3.2.1.2	Technické vybavení	51
3.2.1.3	Postup	51
3.2.2	Celobuněčné lyzáty	52
3.2.2.1	Chemikálie a roztoky	52
3.2.2.2	Technické vybavení	52
3.2.2.3	Postup	53
3.3	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY	53
3.3.1	Chemikálie a roztoky	53
3.3.2	Technické vybavení	54
3.3.3	Postup	54
3.4	ŠTĚPENÍ TRYPSINEM	56
3.4.1	Acetonitrilové extrakty	56
3.4.1.1	Chemikálie a roztoky	56
3.4.1.2	Technické vybavení	56

3.4.1.3	Postup.....	56
3.4.2	Celobuněčné lyzáty.....	57
3.4.2.1	Chemikálie a roztoky.....	57
3.4.2.2	Technické vybavení.....	57
3.4.2.3	Postup.....	57
3.5	MĚŘENÍ VZORKŮ POMOCÍ LC/MS.....	58
3.5.1	Příprava acetonitrilových vzorků.....	58
3.5.1.1	Chemikálie a roztoky.....	58
3.5.1.2	Technické vybavení.....	58
3.5.1.3	Postup.....	58
3.5.2	Příprava celobuněčných lyzátů.....	59
3.5.2.1	Chemikálie a roztoky.....	59
3.5.2.2	Technické vybavení.....	59
3.5.2.3	Postup.....	59
3.5.3	Nastavení softwaru pro měření.....	60
3.6	SOFTWAREVÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	62
3.6.1	MassLynx.....	62
3.6.2	Phenyx.....	63
3.6.3	DataProt.....	66
3.6.4	UniProt.....	66
4	VÝSLEDKOVÁ ČÁST.....	67
4.1	STANOVENÍ KONCENTRACE BÍLKOVINY.....	67
4.2	MĚŘENÍ NA HMOTNOSTNÍM SPEKTROMETRU.....	70
4.3	VYHLEDÁVACÍ DATABÁZE PHENYX.....	71
4.4	ZPRACOVÁNÍ DAT POMOCÍ DATAPROTU.....	72
4.5	POROVNÁVÁNÍ SEKVENCÍ PROTEINŮ POMOCÍ METODY MNOHOČETNÉHO SROVNÁVÁNÍ V UNIPROTU.....	74
5	DISKUZE.....	77
6	ZÁVĚR.....	82
	POUŽITÁ LITERATURA.....	83

Seznam příloh

A. Seznam vždy se vyskytujících proteinů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS a počet unikátních peptidů v jednotlivých vzorcích dané metody	1
B. Seznam vždy identifikovaných proteinů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4 a počet unikátních peptidů v jednotlivých vzorcích dané metody	2
C. Seznam vždy identifikovaných peptidů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS	3
D. Seznam vždy identifikovaných peptidů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4	4
E. Seznam proteinů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS identifikovaných v 80 % vzorků	5
F. Seznam proteinů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4 identifikovaných v 80 % vzorků	6
G. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS v 80 % vzorků. 8	
H. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4 v 80 % vzorků	10
I. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS identifikovaných ve všech vzorcích, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny	13
J. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4 identifikovaných ve všech vzorcích, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny	14
K. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS identifikovaných v 80 % vzorků, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny.....	15
L. Seznam peptidů <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4 identifikovaných v 80 % vzorků, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny.....	16
M. Kmeny <i>Francisella tularensis</i> pro vyhledání Chaperone protein, groEL (gi 89256983/FTL_1714; gi 56708705/FTT1696)	17
N. Příklad porovnání sekvencí pomocí databáze UniProt: Chaperone protein, groEL (gi 89256983/FTL_1714; gi 56708705/FTT1696).....	18

Seznam obrázků a grafů

Obr. 1 Zařazení <i>Francisella tularensis</i> do evolučního stromu na základě 16S rDNA sekvenční analýzy [3]	20
Obr. 2 Obecné schéma spojení dvou aminokyselin za vzniku peptidické vazby [26].....	31
Obr. 3 Základní části hmotnostního spektrometru [38]	37
Obr. 4 Schéma tandemového hmotnostního spektrometru QqTOF [39]...	41
Obr. 5 Fragmentační série peptidů [41].....	42
Obr. 6 Porovnání experimentálních a teoretických dat pomocí databázových vyhledávacích programů [46]	47
Graf 1 Kalibrační přímky stanovení koncentrace bílkoviny v neznámých vzorcích	68
Graf 2 Srovnání výtěžnosti vzorků podle metod – porovnání <i>Francisella tularensis</i> LVS a <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4.....	70
Graf 3 Průměrný počet proteinů identifikovaných danou metodou – porovnání <i>Francisella tularensis holarctica</i> LVS a <i>Francisella tularensis tularensis</i> Schu S4	71

Seznam tabulek

Tab. 1 Biochemické vlastnosti <i>Francisella tularensis</i> [5]	18
Tab. 2 Poddruhy <i>Francisella tularensis</i> [7]	19
Tab. 3 Formy tularémie [5].....	22
Tab. 4 Kalibrační řada standardů BSA.....	55
Tab. 5 Gradient pufru B vzhledem k času analýzy	60
Tab. 6 Parametry vzorků pro vyhledávání v databázi Phenyx.....	64
Tab. 7 Přehled parametrů proteinů v databázi Phenyx	65
Tab. 8 Přehled parametrů peptidů v databázi Phenyx	65
Tab. 9 Rovnice kalibračních přímk 68	68
Tab. 10 Seznam vzorků a jejich průměrná naměřená koncentrace bílkoviny	69
Tab. 11 Parametry pro vyhledání seznamu proteinů v DataProtu	72
Tab. 12 Parametry pro vyhledání seznamu peptidů v DataProtu	73
Tab. 13 Seznam sekvencí peptidů, jejich pracovní označení, náboj, teoretická m/z a identifikátor databáze UniProt, které se vyskytují ve všech vzorcích	75
Tab. 14 Rozdíly v sekvencích peptidů z Tab. 13 podle kmenů <i>Francisella tularensis</i> , které se vyskytují ve všech vzorcích.....	75
Tab. 15 Seznam sekvencí peptidů, jejich pracovní označení, náboj, teoretická m/z a identifikátor databáze UniProt, které se vyskytují v 80 % vzorků	76
Tab. 16 Rozdíly v sekvencích peptidů z Tab. 15 podle kmenů <i>Francisella tularensis</i> , které se vyskytují v 80 % vzorků.....	76

1 ÚVOD

Snaha identifikovat a typizovat bakterie je stále aktuální oblastí výzkumu a vývoje. Vedle klasických mikrobiologických metod se ve světě používají metody založené na principu analýzy DNA nebo metody založené na principu reakce antigenu s protilátkou. Rozvoj proteomických metod, zejména hmotnostní spektrometrie, umožnil využít k těmto účelům i různorodost na úrovni proteinů. Metoda MALDI-TOF se již úspěšně zařadila mezi metody používané k identifikaci bakterií na základě specifických spekter povrchových proteinů.

Tato práce zahrnuje použití tandemové hmotnostní spektrometrie k identifikaci a typizaci bakterií na základě rozdílů v aminokyselinové sekvenci na úrovni peptidů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 *Francisella tularensis*

Bakterie rodu *Francisella tularensis* je původcem tularémie, známé pod názvem zaječí nemoc. Tularémie je typickou infekcí s přírodní ohniskovostí, která je přenášena ze zvířat na člověka.

Pro svoji vysokou virulenci, nízkou infekční dávku při přenosu aerosolem a schopnost způsobit závažné klinické příznaky končící při neléčení i smrtí, je *Francisella tularensis* řazena mezi potencionální biologické zbraně [1].

Francisella tularensis je malý, gramnegativní, aerobní kokobacil. *Francisella* není pohyblivá a netvoří spóry. V časně kultuře je opouzdřená (pouzdro neboli kapsule je bohaté na lipidy) a vykazuje značný pleomorfismus (proměnlivý tvar). Nejčastěji se vyskytuje jako tyčinka, jejíž délka nepřesáhne 0,7 μm . V přímých nátěrech z patologického materiálu mají bakterie charakter kokobacila, ve starších kulturách tvoří charakteristické puchýřkovité útvary a vláknité formy. Francisely se dobře barví podle Giemsey (modrofialové zbarvení), kdežto podle Grama zůstávají slabě růžové.

Francisella tularensis má velké nároky na kultivační podmínky. Nelze ji kultivovat na běžných půdách, vyžaduje přítomnost železa a sloučenin obsahujících –SH skupiny (cystein, thioglykolát sodný) [2]. Pro záchyt je také dobrá půda z koagulovaných žloutků. Kolonie na kultivačních půdách vyrůstají po dvou a více dnech.

Francisella tularensis je obligátně aerobní (mikroaerofilní podmínky podporují růst), fakultativně intracelulární bakterie, která roste při teplotním optimu 37 $^{\circ}\text{C}$. Jednotlivé poddruhy francisely se vyznačují různými biochemickými vlastnostmi, které zahrnují fermentaci glycerolu za vzniku kyselin, citrulin ureidázovou aktivitu (konverze L-citrulinu na ornithin) a fermentaci některých cukrů. K těmto vlastnostem se řadí i citlivost k antibiotiku erythromycinu (Tab. 1 – taxonomie rodu je vysvětlena v dalším textu). Identifikovat jednotlivé poddruhy lze také na základě obsahu lipidů (*Francisella tularensis tularensis* má vyšší podíl lipidů než *Francisella tularensis holarctica*) [3, 4].

Tab. 1 Biochemické vlastnosti *Francisella tularensis* [5]

Název bakterie	biovar	Citrulin ureidázová aktivita	Ferm. glycerolu	Ferm. glukosy	Senzitivita na erythromycin
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	N	+	+	+	+
<i>Francisella tularensis holarctica</i>	I	-	-	+	+
	II	-	-	+	-
	<i>japonica</i>	-	+	+	+
<i>Francisella tularensis mediasiatica</i>	N	+	+	- (slabě)	+
<i>Francisella novicida</i>	N	N	N	+	N

N – není určeno

2.1.1 Epidemiologie a taxonomie

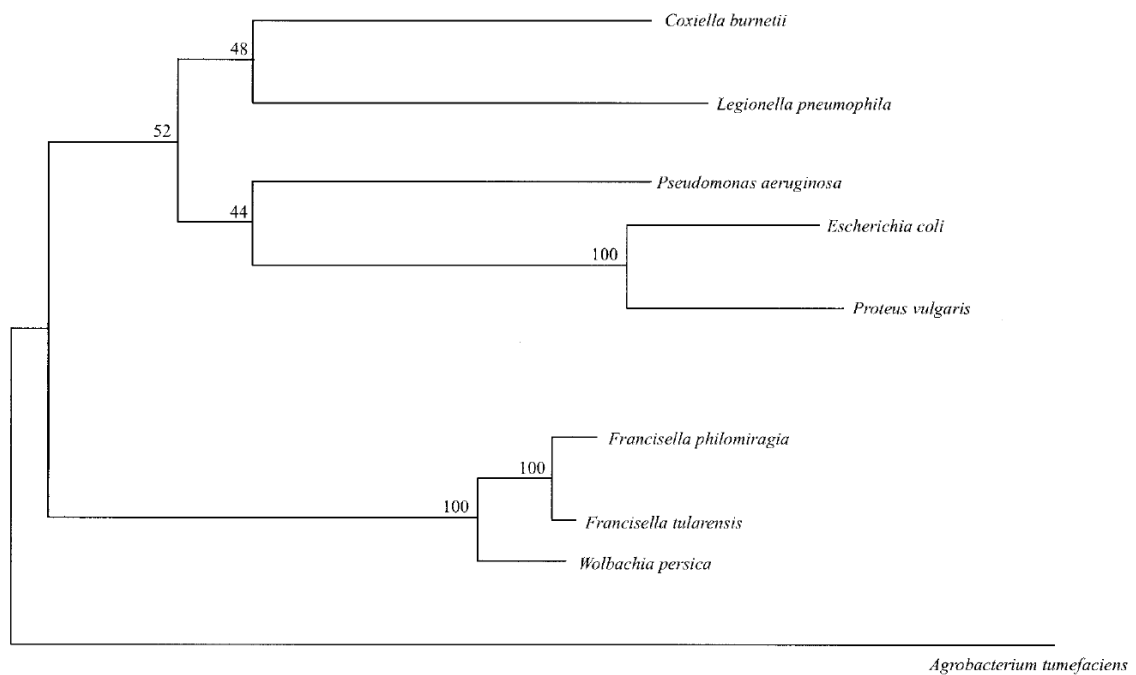
Původce tularémie se poprvé objevil v roce 1911 u hlodavců v Tulare County v Kalifornii, kteří trpěli nemocí podobnou moru. V roce 1912 McCoy a Chapin izolovali malou, gramnegativní bakterii a nazvali ji *Bacterium tularense* podle místa nálezu. O několik let později se Edward Francis zasloužil o izolaci agens z krve pacientů a o objev schopnosti bakterie přetrvávat v životním prostředí po dlouhou dobu a způsobovat onemocnění u lidí [1]. Na jeho počest byla bakterie pojmenována *Francisella tularensis*. V roce 1959 Olsufjev a kol. publikovali první práci, ve které doložili výskyt více než dvou typů původců tularémie. Agens vyvolávající onemocnění v Severní Americe nazvali *Francisella tularensis tularensis* a agens vyvolávající mírnější onemocnění v Evropě a Asii získalo jméno *Francisella tularensis palaeartica*, které se dnes nazývá *holarctica*. V roce 1961 Jellison a kol. prokázali výskyt obou typů onemocnění na území Severní Ameriky, proto se rozhodli označovat původce jako subtyp A a subtyp B. V roce 1966 Aikimbaev prokázal výskyt ještě třetího poddruhu, a to *Francisella tularensis mediasiatica* vyskytující se ve střední Asii [2]. Posledním klasifikovaným poddruhem je *Francisella tularensis novicida*, která byla izolována ze vzorku vody v Utahu v roce 1950 [6]. Tab. 2 uvádí jednotlivé poddruhy *Francisella tularensis*.

Tab. 2 Poddruhy *Francisella tularensis* [7]

Poddruh	Starší pojmenování		Výskyt
<i>Francisella tularensis tularensis</i>	<i>Francisella tularensis nearctica</i> (Olsufjev)	<i>Francisella tularensis</i> typ A (Jellison)	Severní Amerika
<i>Francisella tularensis holarctica</i>	<i>Francisella tularensis palaeartica</i> (Olsufjev)	<i>Francisella tularensis</i> typ B (Jellison)	Evropa, Rusko, Japonsko a Severní Amerika
<i>Francisella tularensis mediasiatICA</i>	<i>Francisella tularensis</i>		Kazachstán, Uzbekistán
<i>Francisella tularensis novicida</i>	<i>Francisella novicida</i>		Severní Amerika

V současné době rodina *Francisellaceae* obsahuje pouze jeden rod *Francisella*, který se řadí ke γ -podtřídě *Proteobacteria* na základě analýzy 16S rDNA sekvencí [3]. *Proteobacteria* také zahrnují endosymbionta členovců a červů *Wolbachia persica*, se kterým je *Francisella* v těsném příbuzenském vztahu. Na základě DNA podobnosti a obsahu mastných kyselin jsou definovány dva druhy rodu *Francisella*, a to *tularensis* a *philomiragia* (Obr. 1). *Francisella tularensis* obsahuje čtyři poddruhy: *tularensis* (subtyp A), *holarctica* (subtyp B), *mediasiatICA* a *novicida*, která je stále ještě považována za třetí druh rodu *Francisella*. *Francisella tularensis holarctica* má ještě tři biovary [3, 4]: biovar I (erythromycin senzitivní), biovar II (erythromycin rezistentní) a biovar *japonica*. Biovar I se primárně vyskytuje v Evropě, Kazachstánu, na Sibiři a v Severní Americe. Biovar II obývá celou Evropu a Asii a *japonica* se vyskytuje na území Japonska.

Nedávné studie rodiny *Francisellaceae* na základě biochemických a genetických odlišností přišly na další rozdělení *Francisella tularensis tularensis* na dva typy A.I a A.II. Typ A.I je prokazatelně virulentnější než typ A.II a vyskytuje se převážně na středozápadě Spojených Států, v Kalifornii a Massachusetts. Typ A.II je detekován v Kalifornii a v horských amerických státech [8].



Obr. 1 Zařazení *Francisella tularensis* do evolučního stromu na základě 16S rDNA sekvenční analýzy [3]

Na území České republiky se *Francisella tularensis* vyskytla roku 1936 na jižní Moravě, která se stala hlavní oblastí výskytu tularémie. Vhodnou oblastí pro tularémii jsou také Střední Čechy a Polabí, ale v přírodních ohniscích se vyskytuje po celém území České republiky. Hlavním přírodním rezervoárem nákazy je pro člověka především zajíc polní (*Lepus europaeus*), ale potenciální nebezpečí hrozí i od malých hlodavců, migrujících prasat divokých (*Sus scrofa*) a od lovné zvěře (srnci, jeleni, mufloni, daňci) [9, 10, 11, 12].

Francisella tularensis přežívá v životním prostředí pomocí rezervoárů, kterými jsou suchozemští i vodní savci. V Severní Americe jsou to především králíci, zajíci, veverky, krysy, myši, ondatry a bobři. V Evropě patří mezi nejvýznamnější rezervoáry zajíci, hraboši, křečci, myši a dokonce i ptáci [5].

Infekce člověka může být získána od členovců jako vektorů, kteří se žijí na infikovaných zvířatech. Nejdůležitějšími artropogenními vektory jsou klíšťata, ovádi, blechy a komáři. *Francisella tularensis* se v těchto vektorech přenáší jak transstadiálně (skrz vývojová stadia larvy, nymfy a dospělé), tak transovariálně (přenos na další generaci). Bakterie u klíšťat přežívá ve střevech, tkáních a hemolymfě. Infekci tedy klíšťata přenáší kousnutím, kontaminací poraněné kůže fekáliemi nebo rozmačkáním klíšťat mezi nehty (popř. zuby u zvířat) [5].

Dalším způsobem přenosu infekce na člověka je přenos z prostředí (voda, prach, seno). Uvažuje se také o přenosu kontaminovanou vodou, v níž se vyskytují jednobuněčné organismy, které mohou vyvolat vznik epidemie tohoto onemocnění [2].

2.1.2 Tularémie

Francisella tularensis je původcem tularémie, zoonózy s přírodní ohniskovostí, která je přenosná na člověka. Tularémie se může vyskytovat v několika formách, a to v závislosti na vstupní bráně, kudy může bakterie proniknout do lidského těla.

Klinické příznaky nemoci jsou rozdílné podle virulence bakterie, místě vstupu agens a stavu hostitelské imunity. Za nejvirulentnější subtyp je považován *Francisella tularensis tularensis* (subtyp A), který způsobuje závažné klinické příznaky již při infekční dávce 1 až 10 mikrobů [2]. Podle vstupu agens do hostitele se rozlišuje několik forem tularémie (Tab. 3). Nejběžnější formou onemocnění je ulceroglandulární tularémie (asi 80 % všech případů), která vzniká po proniknutí infekce poraněnou kůží (infekční dávka je 10-50 jednotlivých bakterií). Typická inkubační doba je 3 až 6 dní. Poté onemocnění začíná příznaky chřipky, a to vysokou horečkou, zimnicí, bolestí hlavy a celkovou bolestí svalů a kloubů. V místě průniku infekce do těla se bakterie pomnožují a vytváří vřed (lokální lézi), který ještě přetrvává po několik měsíců. Z tohoto místa se bakterie rozšiřují do lymfatického systému a zvětšují regionální mízní uzliny podobné bubonické formě moru. Odtud se dále mohou šířit do dalších tkání, např. do sleziny, jater, ledvin, plic, centrálního nervového systému a kosterního svalstva. Tato fáze bakteriémie je přechodná a objevuje se v infekčním procesu relativně brzo. V tkáních vytváří nekrotická ložiska, abscesy a dokonce granulomy, které mohou zřídka zesírovatět [5].

Méně se vyskytující formy jsou glandulární a okuloglandulární tularémie. Glandulární forma je velmi podobná formě ulceroglandulární, nevyskytují se však kožní nebo slizniční léze, ale jsou zvětšené skupiny regionálních uzlin. Iniciačním místem okuloglandulární formy je spojivka, na kterou byla infekce vnesena nejčastěji konečky prstů. Na spojivce se objevují vřídky a uzliny, ze kterých se bez léčby bakterie šíří dále do lokálních lymfatických uzlin.

Požítí kontaminované potraviny nebo vody může způsobit orofaryngeální nebo gastrointestinální příznaky tularémie podle místa kolonizace bakterií. Projevuje se bolestivým vředem a zvětšením krčních mandlí v případě orofaryngeální formy. U gastrointestinální formy závisí klinické příznaky na velikosti požití infekční dávky (dosahuje až 10^8 jednotlivých bakterií). Potíže mohou být od mírného, ale přetrvávajícího průjmu, až po akutní smrtelné onemocnění s rozsáhlou tvorbou vředů ve střevech.

Tyfoidální nebo septická tularémie se prezentuje náhlým septickým syndromem často s nelokalizovaným příznakem. Není postiženo lymfatické ústrojí.

Nejzávažnější formou je pak forma plicní vyvolaná vdechnutím kontaminovaných částic, která při neléčení může způsobit úmrtnost 30-60 % pacientů s touto formou tularémie [3].

Tab. 3 Formy tularémie [5]

Forma tularémie	incidence	Klinické příznaky
ulceroglandulární	45-85 % případů	kožní ulcerace (hlavně na rukách) s otevřenou lymfadenopatií
glandulární	10-25 % případů	regionální lymfadenopatie s nezjevným kožním ložiskem
okuloglandulární	<5 % případů	konjunktivitida, nenápadné vředy, příušnice nebo submandibulární lymfadenopatie, zánět očního víčka, edém očního víčka
orofaryngeální	<5 % případů	exsudativní faryngitida (možnost záměny s diftérií), cervikální lymfadenopatie
tyfoidální	<5 % případů	horečka, zimnice
pneumonie	<5 % případů	bronchopneumonie, pleuritida, hilová lymfadenopatie

Zduřené uzliny nebo místa infekce v kůži asi u 60 % pacientů přechází do fáze otevřeného vředu, který je velký přibližně 0,4 až 3 cm v průměru. Zhojení otevřených vředů trvá až tři roky.

Rekonvalescence po prodělaném onemocnění je velmi dlouhá a důsledky v podobě vegetativní nerovnováhy mohou přetrvávat i několik let. Úmrtnost při onemocnění způsobeném subtypem *Francisella tularensis tularensis* je v případě neléčení až 60%, při onemocnění *Francisella tularensis*

holarctica 1 až 10 %. Při léčbě antibiotiky se úmrtnost v případě subtypu A snižuje pod 10 %, u subtypu B je prakticky nulová [5].

Francisella tularensis je citlivá k široké škále bakteriostatik. Běžně se proti infekci podává streptomycin a gentamicin (aminoglykosidová antibiotika). Další volbou jsou tetracykliny chloramfenikol a doxycyklin. Výhodou chloramfenikolu je nižší toxicita než mají aminoglykosidy, nevýhodou je pozdější riziko relapsu onemocnění. U doxycyklinu je důležité dodržovat dobu léčby, aby se vyvinula dostatečná odpověď imunitního systému proti bakterii. Jako alternativní léčba se navrhuje fluorochinolony, které mají dobrou baktericidní schopnost v in vitro systémech [3]. Použitím fluorochinolonů (např. ciprofloxacin) jako léčebného prostředku u pacientů se objevuje riziko vytvoření rezistence bakterie proti tomuto antibiotiku. Ciprofloxacin se však ukázal vhodný k použití u dětí. Betalaktamová antibiotika nejsou efektivní při léčbě tularémie [13].

Preventivním opatřením proti nákaze tularémií je očkování. Ve 30. letech 20. století se vyvinula neživá vakcína, která měla ochránit proti tularémii rizikové laboratorní pracovníky. Studie na imunizovaných myších a primátech však ukázaly, že mrtvé bakteriální buňky poskytují nízký stupeň ochrany proti plně virulentní *Francisella tularensis*. Ačkoliv mrtvá celobuněčná vakcína snižovala výskyt a vážnost onemocnění, výsledky použití vakcíny nebyly reprodukovatelné. Proto se vědci zaměřili na vývoj živých atenuovaných (oslabených) vakcinačních kmenů, které byly použity k očkování několika desítek milionů obyvatel bývalého Sovětského svazu do 60. let 20. století. V 50. letech 20. století byly některé z těchto vakcinačních kmenů převezeny do Spojených států a z nich se postupně vyvinul živý vakcinační kmen *Francisella tularensis holarctica* LVS. Klinické testy tohoto vakcinačního kmene ukázaly, že nízké inhalované dávky vysoce virulentního kmene *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 u většiny dobrovolníků nevyvolaly příznaky plicní tularémie, u ostatních se tularémie projevila jen mírně. Kdežto vysoká dávka Schu S4 podaná inhalačně u většiny vyvolala mírné příznaky a u ostatních se vyvinula plnohodnotná plicní pneumonie. Ačkoliv výskyt tularémie u laboratorních pracovníků sedminásobně klesl po zavedení očkování LVS, stále se vyskytují případy nakažení [7].

V současnosti se obnovil zájem o nalezení účinné vakcíny proti *Francisella tularensis* kvůli možnosti jejího využití jako potencionální biologické zbraně. Vědci hledají podjednotkovou vakcínu, ačkoliv jsou známy pouze některé antigeny obsažené ve *Francisella tularensis*, které jsou zodpovědné za spuštění ochranné reakce organismu proti této bakterii. U lidí hlavním antigenem vyvolávajícím protilátkovou odpověď je bakteriální lipopolysacharid, který indukuje ochranu proti méně virulentním kmenům *Francisella tularensis*. Možnou podjednotkovou vakcínu proti tularémii by mohl být lipopolysacharid konjugovaný s antigenem schopným vyvolat T-buněčnou imunitu. U myších modelů onemocnění se jako účinné antigeny ukázaly být 17-kDa lipoprotein, 43-kDa vnější membránový protein a heat shock protein 60 [14].

2.1.3 Faktory virulence

Francisella tularensis je fakultativní intracelulární patogen schopný proliferace jak uvnitř profesionálních fagocytů (neutrofilů, makrofágy), tak uvnitř neprofesionálních fagocytů (hepatocyty, endotelie, fibroblasty). Patogenita bakterie je způsobena faktory, které se souhrně nazývají faktory virulence. Úlohou těchto faktorů je zabezpečit bakteriím adhezi na hostitelské buňky a průnik do těchto buněk, proliferaci v intracelulárním prostoru, únik před obrannými mechanismy imunitního systému a zabezpečit další pochody životního cyklu.

Divoké kmeny francisely a *Francisella tularensis* LVS mají na svém povrchu polysacharidovou kapsulu. V porovnání s ostatními gramnegativními bakteriemi kapsule francisel obsahuje neobvykle vysokou koncentraci lipidů. Procentuelní zastoupení lipidů v kapsule je charakteristické pro jednotlivé druhy *Francisella tularensis* [1]. Kapsule chrání bakterii proti jejímu zničení sérovým komplementem hostitele. Nicméně úloha kapsule ve virulenci francisel dosud nebyla zcela přesně odhalena. Ve stádiu výzkumu je možnost uplatnění kapsule v procesu vakcinace [15].

Další povrchovou strukturou bakterie, řazenou mezi faktory virulence, je lipopolysacharid (LPS, endotoxin), který je hlavní součástí vnější membrány gramnegativních bakterií. Skládá se z jádrové oblasti (centrální sacharid), lipidu A a polysacharidového O-antigenu, který určuje antigenní strukturu (O-antigen *F. tularensis* subsp. *tularensis* a *holarctica* jsou shodné, ale O-antigen *F.*

tularensis subsp. *novicida* se již liší) [16]. LPS je do membrány ukotven pomocí lipidu A, který je považován za virulentní faktor pro jeho vliv na schopnost růstu bakterie v intracelulárním prostředí [3]. Zbytek LPS vyčnívá z povrchu buňky do vnějšího prostoru. LPS u *Francisella tularensis* nemá vlastnosti jako klasický endotoxin. Vykazuje mimořádně nízkou toxicitu *in vivo* a *in vitro*. Jeho schopnost indukovat tvorbu interleukinu 1 (IL-1) a faktoru nekrotizující nádory α (TNF- α) u mononukleárních buněk je 1000krát nižší než např. u LPS *Escherichia coli*. Bylo také objeveno, že existuje antigenní shift (zásadní změna v antigenní struktuře) LPS *Francisella tularensis*, který ovlivňuje účinnost imunitní reakce hostitele. Regulace délky řetězce O-antigenu je nezbytná při růstu bakterie v makrofázích a také ovlivňuje rezistenci bakterie vůči sérovému komplementu [15].

Na povrchu *Francisella tularensis* se také objevuje pilus typu IV (Tfp), který je kódovaný *pil* geny. Tfp jsou multifunkční, povrchová vlákna, která se objevují u mnoha různých bakterií jako *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Escherichia coli* a *Vibrio cholerae*. Funkcí Tfp je připojení bakterie k hostitelským buňkám, „twitching“ pohyb a tvorba biofilmů. Poruchou Tfp dochází k redukci virulence [8].

Francisella vstupuje do makrofágů bez spuštění respiračního vzplanutí, za což zřejmě odpovídá schopnost kyselé fosfatázy (AcpA) inhibovat toto vzplanutí. Řadí se tak mezi virulentní faktory. Po vstupu do makrofágů jsou bakterie obsaženy uvnitř fagosomu a již brzy se vytváří markery pozdních fagozomů LAMP-1 a CD63. Markery pozdních fagozomů rychle mizí, fagozomální membrána se rozpadá a bakterie se postupně uvolňují do cytoplazmy makrofágů, kde dochází k jejich masivnímu množení. *Francisella* nakonec indukuje apoptózu (buněčnou smrt) makrofágů, bakterie se uvolňují z mrtvých buněk a napadají další neinfikované buňky [17]. Na rozdíl od tohoto mechanismu jsou jiné fagocytované bakterie a cizí částice zničeny fúzí fagozomů s lysozomy bohatými na enzymy hydrolázy. Přesné pochody úniku *Francisella* před mechanismy makrofágů rovněž nejsou známy.

Dříve se předpokládalo, že okyselení fagozomu pomocí ATPasové pumpy (přenos protonů) je nezbytné pro to, aby se *Francisella* mohly pomnožit. Kyselá pH totiž podporuje uvolnění železa z transferinu hostitele (železo je pro *Francisella* nezbytným růstovým faktorem). Nicméně nedávné studie ukázaly, že

fagozomy obsahující LVS mají pH na vysoké hodnotě 6,7 [17]. Předpokládá se, že toto vysoké pH je způsobeno již rozpadající se membránou fagosomu a dochází tak k ustavení rovnováhy mezi prostředím fagosomu a cytosolu [18]. Mechanismus získávání železa by mohl záviset i na schopnosti makrofágů zacházet s chloridem amonným. Ten blokuje okyselení endozomu, a tím redukuje schopnost bakterií růst [19].

Za množení uvnitř makrofágů zřejmě odpovídají geny *iglA* a *iglC* (intracellular growth locus), které jsou hlavní součástí unikátní oblasti „*Francisella* pathogenicity island“ (FPI). Pod vlivem oxidativního stresu se exprimuje 23-kDa protein, který se nazývá IgIC [19]. Neméně důležitý podíl na množení bakterií uvnitř makrofágů mají i geny *mgIA* a *mgIB* (macrophage growth locus) umístěné blízko FPI, které produkují proteiny MglA a MglB, jejichž úkolem je kontrolovat expresi genů FPI [1].

Na imunitní reakci hostitele se podílí určitou měrou všechny složky imunity (nespecifické i specifické). Nespecifickými prostředky obrany proti infekci je komplement přítomný v krvi, a to především jeho C3 složka (CD11b/CD18), která bakterie opsonizuje. Opsonizované bakterie mohou reagovat s neutrofily, které následně bakterie fagocytují a spouštějí respirační vzplanutí (děje zahájené aktivací NADPH-oxidázy za spotřeby kyslíku pro zabíjení bakterií) [20]. Ukazuje se ale, že během primární infekce tento mechanismus zabíjení bakterií není tolik účinný na divoké kmeny *Francisella tularensis*. Více citlivý k tomuto mechanismu je LVS. Dalšími nástroji nespecifické imunity jsou sekreční produkty fagocytů cytokiny, z nichž nejdůležitější jsou interleukin 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ) a faktor nekrotizující nádory α (TNF- α). Konečné řešení infekce *Francisella tularensis* je dáno buňkami specifické imunity, ať už T-lymfocyty nebo B-lymfocyty. CD4+ a CD8+ T-lymfocyty (označení povrchových receptorů) jsou důležité v boji proti *Francisella tularensis* Schu S4 (vysoce virulentní kmen). O B-lymfocytech se ví, že myši, kterým byly B-buňky odstraněny, podléhají již subletálním dávkám LVS [1]. U lidí je buněčně zprostředkovaná imunita řízena hlavně proti proteinovým antigenům [5]. Úloha buněčně specifické imunity je však stále oblastí výzkumu.

2.1.4 Laboratorní diagnostika

Kultivace bakterií patří k tradičním metodám identifikace mikroorganismů, mezi něž patří i *Francisella tularensis*. Pro správný průkaz francisel ale tato metoda není postačující, využívá se kombinace více technik. Ke kultivačním metodám se přidávají metody sérologické, přímá stanovení pomocí imunofluorescence a molekulární metody.

Při odběru materiálu a při jeho zpracování je třeba postupovat podle zásad platných pro práci s vysoce virulentními organismy.

Na kultivační vyšetření se odebírá materiál z primárních lézí, sputa, punktátu z lymfatických uzlin, pleurální tekutiny nebo z žaludečního aspirátu. Lze odebírat i krev pro záchyt bakterie při přechodné fázi bakteriémie. Materiál se kultivuje na obyčejných půdách (krevní agar, Endův agar a další) pro vyloučení jiné infekce s podobnými klinickými příznaky. Na půdy pro tularemii se většinou neočkuje, protože možnost záchytu je minimální. Vhodnější je infikovat vnímavé laboratorní hlodavce (myš, křeček, morče). Po uhynutí zvířete se odebere materiál z tkáňových lézí a kultivuje se na půdách obsahujících cystein a krev (lidská, králičí). V minulosti se vyvinulo několik kultivačních půd vhodných pro francisely. Na počátku to byla vaječná půda nebo krevní agar s přidavkem cystinu (McCoy a Francis). V roce 1927 vyvinul McLeod čokoládový agar, který obsahoval peptony a kvasinkové extrakty [21]. Dalšími rutinně používanými půdami je agar s ovčí krví a Thayer-Martin agar [3]. Vhodná je inokulace materiálu do žloutkového vaku kuřecího embrya [22]. Viditelně bakterie vyrůstají na vhodném médiu již po 18 hodinách, ale jednotlivé kolonie se objevují až po 2 až 4 dnech inkubace při 37 °C. V tekutých půdách neroste tak dobře, i když obsahují cystein. K viditelnému růstu dochází za 3 až 7 dní. Pro pomnožení se používá mozkosrdcový bujón, modifikovaný Mueller-Hintonův a thioglykolátový bujón. Nejrozšířenější syntetickou růstovou půdou je Chamberlainovo médium [3].

Detekce protilátek je nejčastější metodou získání specifické diagnózy. Jedná se o tzv. sérologickou diagnostiku. Protilátky namířené proti LPS a dalším sacharidovým antigenům a aglutinační protilátky IgG, IgM a IgA se objevují během druhého a třetího týdne infekce. Protilátky setrvávají po nejméně dalších osm let, minoritně se objevují po dalších 25 let. Nejběžněji

používané techniky pro průkaz protilátek jsou aglutinace, mikroaglutinace, imunofluorescence, western blot a ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), která rozlišuje jednotlivé třídy protilátek (IgA, IgG a IgM). Své místo zaujímá i průtoková cytometrie [21]. Může se také provést tzv. tularinový test, což je vyvolání alergické reakce na tularemický antigen, který bývá pozitivní již 4.-5. den nemoci. Při pozitivitě sérologických reakcí je zde možnost zkřížených reakcí s *Brucella* spp., *Yersinia* spp. a *Proteus* OX19, jelikož jde o antigenní příbuznost francisel s těmito agens [22].

Detekce genomu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je používána pro identifikaci a diagnostiku *Francisella tularensis* za použití primerů navržených proti genům kódujícím vnější membránové proteiny (17- nebo 43-kDa protein), jako je *tul4* nebo *fopA* [3]. PCR je nejběžnější metodou pro amplifikaci DNA. Pro odlišení *Francisella tularensis tularensis* a *holarctica* slouží také analýza 16S rRNA (malá podjednotka ribozomální RNA) [3, 21].

Bakterie lze identifikovat i na základě proteomických přístupů. Stejně jako jsou rozdíly u jednotlivých poddruhů na genetické úrovni, je jasné, že rozdílný bude i výskyt proteinů (peptidů). Vhodnou metodou analýzy proteinů je MALDI-TOF (ionizace laserem za účasti matrice s hmotnostním analyzátozem doby letu), kde jsou proteiny předem naštěpeny proteolytickým enzymem (nejčastěji se používá trypsin) na kratší peptidy. Jelikož tato metoda není schopná rozeznat, o který peptid se jedná, na analýzu navazuje identifikace peptidů metodou peptidového mapování (PMF). Při ní se porovnávají experimentálně zjištěné hodnoty efektivních hmotností m/z (poměr hmotnosti a náboje) s teoreticky vypočtenými m/z , a to vše pomocí databází.

Výhodnějším uspořádáním je např. MALDI-TOF/TOF (tandemové uspořádání), které je schopné selektivně měřit peptidy přiřazené metodou PMF nebo peptidy, které touto metodou rozeznány nebyly [41]. K plnohodnotnému rozpoznání sekvencí peptidů je však vhodnější použít jiných metod analýz. Takovou metodou je např. ESI-MS/MS (hmotnostní spektrometr s ionizací elektrosperem a tandemovým hmotnostním analyzátozem) spojená se separací kapalinovou chromatografií.

Rychlou metodou bakteriální klasifikace a identifikace je analýza celých bakteriálních buněk pomocí MALDI-TOF. Bakteriální kolonie (bez předchozí extrakce proteinů) jsou přímo nanášeny s matricí na MALDI destičku

a principem laserové ionizace analyzovány analyzátozem doby letu (TOF). Tato metoda poskytuje bohaté hmotnostní spektrum a vyznačuje se vysokou reprodukovatelností [23]. K rychlé identifikaci slouží také metoda extrakce bakteriálních povrchových proteinů acetonitrilem (ACN) a následná analýza MALDI-TOF. Výhodou této metody je, že lze měřit vzorky neobsahující živé infekční bakterie.

Vysokou rozlišovací schopnost v proteomice zaujímají 2-dimenzionální gelová elektroforéza (2-DE) a následná detekce proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. 2-DE separuje proteiny v gelu podle jejich izoelektrického bodu a velikosti (molekulové hmotnosti), vytváří tzv. proteinovou mapu. Vyříznutý protein z gelu je poté naštěpen proteolytickým enzymem a následuje hmotnostní spektrometrie (MS), která analyzuje, o který protein (peptid) se jedná na základě stanovení sekvence aminokyselin. Ovšem 2-DE není tolik používanou metodou především pro její časovou náročnost.

2.2 Proteiny

Proteiny, neboli bílkoviny, jsou vysokomolekulární sloučeniny, které jsou nazývané biopolymery. Mezi biopolymery se dále řadí nukleové kyseliny, polysacharidy a také lipidy (malé molekuly lipidů se spontánně spojují ve struktury o vysoké molekulové hmotnosti) [24].

Bílkoviny jsou přítomny ve všech organismech (od virů až po člověka), kde mohou vykonávat mnoho různých funkcí. Tvoří jednak stavební materiál buněk, jednak obstarávají většinu buněčných funkcí. Fungují jako enzymy katalyzující chemické reakce buňky, podílí se na řízení růstu a diferenciaci buněk, zajišťují transport přes buněčné membrány, jsou přenašeči specifických signálů (vnitrobuněčných i mezibuněčných) a v neposlední řadě tvoří receptory v buněčných membránách [25].

Četnost jejich funkcí vyplývá z velkého počtu konformací (konečná trojrozměrná struktura), které mohou v prostoru nabývat. Konformace určují funkce proteinů a vyplývají ze snahy proteinů dosáhnout co nejnižšího energetického stavu (základní pravidlo v přírodě). Veškerá informace potřebná k určení trojrozměrného tvaru proteinu je uložena v pořadí aminokyselin, které tvoří protein, a jejich chemických vlastnostech. Toto pořadí aminokyselin se nazývá aminokyselinová sekvence neboli primární struktura. Primární struktura

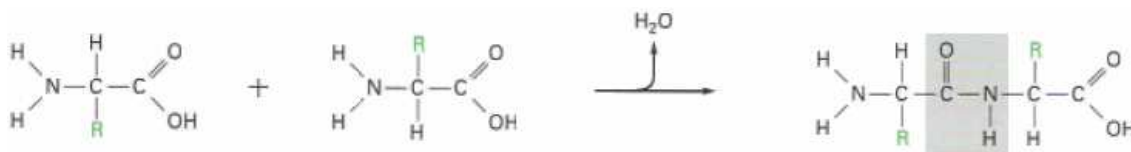
zahrnuje také polohu disulfidických můstků -S-S- mezi molekulami aminokyseliny cysteinu [26]. Sekundární struktura je tvořena pravidelnými konformacemi řetězce aminokyselin, α -šroubovicí a β -skládaným listem, které mohou vzájemně vytvářet tzv. supersekundární struktury („ β -meandr“, „klíč“ nebo „ β - α - β “), jinak nazývané domény. Organizování sekundárních a supersekundárních struktur do větších prostorových celků je základem terciární struktury (trojrozměrná konformace). Kvartérní struktura se vyskytuje u těch proteinů, které jsou tvořeny dvěma a více aminokyselinovými řetězci vzájemně spojenými nekovalentními vazbami [27].

2.2.1 Základní chemické a fyzikální vlastnosti

Z chemického hlediska jsou proteiny tvořeny atomy uhlíku, vodíku, kyslíku, dusíku popř. síry a selenu (aminokyselina selenocystein). Jejich základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny obsahující asymetrický uhlík, na nějž jsou navázány následující skupiny: organický zbytek -R, vodík -H, aminoskupina -NH₂ a karboxylová skupina -COOH. Proteiny jsou tvořeny 21 kódovanými aminokyselinami (AMK) vzájemně spojenými kovalentní peptidickou vazbou -CONH- (Obr. 2) do dlouhého lineárního řetězce zvaného polypeptid. AMK získávají jiné chemické vlastnosti podle navázaných postranních řetězců -R. Konec nesoucí volnou aminoskupinu (-NH₂) se nazývá aminový konec nebo N-konec, druhý konec polypeptidu nesoucí volnou karboxylovou skupinu (-COOH) se nazývá karboxylový konec nebo C-konec.

V závislosti na pH může mít polypeptidový řetězec pozitivní, negativní nebo nulový celkový náboj [26]. Na celkovém náboji se podílí jednak N- a C-konec polypeptidu, jednak vlastnosti postranních řetězců aminokyselin. AMK se řadí mezi látky amfoterního charakteru (amfolyty). Je-li výsledný náboj aminokyseliny nulový, amfolyt se vyskytuje ve formě amfiontu (bipolární ion) a neputuje v elektrickém poli. Hodnota pH prostředí, v němž se vytváří amfiont, se nazývá izoelektrický bod pI. Amfoterního charakteru se využívá při separaci a identifikaci aminokyselin a při určování kovalentní struktury proteinů a peptidů [24]. Pro strukturu bílkoviny je také důležitá polarita postranních řetězců aminokyselin. Podle polaritě postranních řetězců dělíme aminokyseliny na nepolární (hydrofobní), polární nabité (pozitivní, negativní náboj) a polární (nenabité). To určuje jejich rozpustnost ve vodě a podíl na hydrofobních

interakcích bílkovin. V izoelektrickém bodě mají aminokyseliny nejmenší rozpustnost [24, 26].



Obr. 2 Obecné schéma spojení dvou aminokyselin za vzniku peptidické vazby [26]

2.2.2 Posttranslační modifikace

Posttranslační modifikace (PTM) proteinů mohou být fyziologickou součástí syntézy proteinů (proteosyntézy) stejně tak, jako se mohou vyskytnout nepřírozeně vlivem např. chemických činidel. Modifikované a nemodifikované formy proteinů mohou mít odlišnou biologickou aktivitu nebo topologii a modifikace polypeptidových řetězců může způsobit i odlišné fyzikální vlastnosti jako jsou rozpustnost, viskozita a další [28].

V dnešní době je známo asi 300 různých PTM, z nichž nejvíce uplatňovaných v přírodě je pouze několik. Přírozeně se vyskytující PTM katalyzované enzymy jsou především následující tři modifikační reakce. Glykosylace (zavedení sacharidů do struktury proteinu) může stabilizovat konformaci proteinů a tyto sacharidové složky proteinů se mohou účastnit rozpoznávacích interakcí (např. imunitní rozpoznávání). Fosforylace/defosforylace (enzymové připojení/odpojení fosfátové skupiny na aminokyselinové zbytky serinu, threoninu a tyrozinu) často vytváří aktivní a neaktivní formy proteinů zapojené do kaskád přenosu signálu. Acetylace lysinu (zavedení acetylu na $-\text{NH}_2$ skupinu lysinu) snižuje jeho bazicitu a zeslabuje tak iontové interakce. Acetylovány mohou být všechny volné $-\text{NH}_2$ skupiny polypeptidového řetězce.

Vlivem oxidačního stresu na buňky může také dojít k modifikaci proteinů. Příkladem jsou aminokyseliny cystein či methionin [29].

Nepřírozeně se vyskytující PTM mohou vznikat např. vlivem přísad chemických činidel při přípravě vzorků (alkylace). Jedná se o vznik karbamidomethylu cysteinu, deamidaci kyseliny glutamové resp. asparagové nebo vznik pyroglutamové kyseliny.

Se všemi posttranslačními modifikacemi je potřeba počítat při analýze proteinů hmotnostní spektrometrií, jelikož ovlivňují molekulovou hmotnost proteinů, na jejímž základě jsou proteiny identifikovány.

2.3 Metody proteomiky

Proteomika je vědní obor zabývající se hodnocením proteomu. Proteom je soubor proteinů produkovaný určitou buňkou, tkání nebo organismem za určitých podmínek v určitém čase [30]. Existuje několik proteomických přístupů, které identifikují proteiny a jsou schopné stanovit jejich přítomnost a koncentraci v různých buňkách daného organismu, jejich posttranslační modifikace, vzájemné interakce, vztah mezi strukturou a funkcí a jejich lokalizaci v různých buněčných organelách.

Na základě různých přístupů k hlediskům, podle kterých lze proteiny identifikovat, se vyvinulo několik odvětví proteomiky. Studium struktury bílkovin se zabývá *strukturní proteomika*. Používá krystalografii, nukleární magnetickou rezonanci (NMR), hmotnostní spektrometrii a další techniky pro pochopení strukturního chování bílkovin. *Analytická proteomika* identifikuje proteiny, stanovuje přesnou molekulovou hmotnost, určuje pořadí aminokyselin, hledá posttranslační modifikace, ale také se zabývá umístěním proteinů v buňce a jejich funkcí. Separuje bílkoviny ze složitých biologických směsí a následně je identifikuje.

Strukturní a analytická proteomika se může dále rozdělit podle následujících přístupů. Sledováním změn složení bílkovin při různých stavech organismu se zabývá *diferenční (srovnávací) proteomika*. Jejím cílem je nalézt a identifikovat rozdílně se vyskytující bílkoviny po jejich separaci ze složitých směsí bílkovin, a to na základě porovnání např. dvou subtypů bakterie. *High-throughput proteomika* se zaměřuje na získávání velkého množství informací o bílkovinách, čehož se využívá především ve zdravotnictví, zemědělství a kontrole potravin. *Bottom-up proteomika* představuje „klasický“ postup identifikace bílkovin. Protein je nejprve izolován ze směsi, potom enzymově rozštěpen na směs peptidů, které jsou nakonec analyzovány hmotnostní spektrometrií (určení molekulové hmotnosti či sekvence). *Shotgun proteomika* neseparovanou směs bílkovin nejprve enzymaticky rozštěpí na směs peptidů. Poté následuje separace vhodnou metodou, ke které se nejčastěji využívá

vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Nakonec se pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie určí sekvence peptidů. *Proteomika top-down* nevyužívá ke štěpení proteinů enzymy, ale bílkoviny izolované ze směsi jsou přímo fragmentovány v hmotnostním spektrometru [31].

2.3.1 Příprava vzorků

Příprava vzorků je jednou z nejdůležitějších částí proteomické analýzy. Má velký vliv na množství extrahovaných proteinů. Při kultivaci bakterií by se mělo zamezit kontaminaci kultury a dbát na všechna bezpečnostní opatření při manipulaci s patogeny. Bakterie by se měly promýt ve fyziologickém pufru, a poté by se měla chemicky nebo mechanicky provést extrakce proteinů.

Extrakcí proteinů se myslí získání určité frakce z celkového množství proteinů v bakteriální buňce. Mnoho postupů extrakce proteinů využívá organická rozpouštědla, jenž jsou schopná určitým způsobem uvolnit proteiny z buněk do roztoku. Příkladem je extrakce acetonitrilem (ACN), po jehož přidání k bakteriálním buňkám se uvolní do roztoku proteiny vyskytující se na povrchu bakteriálních membrán.

Proteiny se mohou získat a extrahovat z buněk také pomocí mechanické síly, která je schopná bakteriální buňky rozbít. Získají se tak celobuněčné lyzáty obsahující proteiny vyskytující se i uvnitř buněk. Jednou z metod mechanického rozbití buněk je FRENCH® Press (Thermo Scientific). Principem tohoto přístroje je působení vysokého tlaku na buňky uzavřené do ocelové cely. Stlačením pístu vzrůstá tlak uvnitř cely, a tím i uvnitř buněk, až na požadovanou hodnotu. Uvolněním kohoutku se vzorek nechá pomalu odkapávat vývodovou ocelovou trubičkou. V momentě, kdy je stěna buňky vystavena vnějšímu atmosférickému tlaku, dochází k prasknutí membrány. To je způsobeno vysokým rozdílem mezi tlakem uvnitř cely a tlakem vnějšího prostředí [32]. Vzorky celobuněčných lyzátů obsahují rozmanitou škálu bakteriálních komponent, které mohou ovlivnit následnou analýzu proteinů. Obsah nukleových kyselin zvyšuje viskozitu roztoku, proto je vhodné přidat např. benzonázu, která rozkládá nukleové kyseliny. Ve vzorcích je také obsažena spousta proteolytických enzymů, které mohou působit autolyticky. Jejich aktivitu je možné potlačit např. nízkou teplotou nebo přidáním inhibitorů proteáz.

2.3.2 Stanovení koncentrace bílkoviny

Znát koncentraci bílkoviny ve vzorcích je vhodné pro následnou analýzu hmotnostní spektrometrií spojenou s kapalinovou chromatografií, jelikož kolona kapalinového chromatografu je schopná pojmout jen určité množství bílkoviny. Jednou z možností stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích je použít metodu pracující na principu biuretovy reakce. Principem stanovení bílkoviny je důkaz přítomnosti peptidické vazby $-\text{CO}-\text{NH}-$, která je charakteristická pro všechny typy proteinů. V alkalickém prostředí reagují měďnaté ionty Cu^{2+} s peptidickou vazbou a dochází k redukci na měďné ionty Cu^+ . K detekci Cu^+ se může použít unikátní metoda s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Chelatací dvou molekul BCA s jedním iontem Cu^+ vzniká charakteristické modrofialové zbarvení komplexu. Barevný komplex je ve vodě rozpustný a silně absorbuje při vlnové délce (λ) 562 nm. Intenzita zbarvení se měří spektrofotometricky a je přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku.

Za tvorbu barevného komplexu s BCA je odpovědný počet peptidových vazeb a přítomnost třech aminokyselin (cysteinu, tryptofanu a tyrosinu). Studie s di-, tri- a tetrapeptidy ukázaly, že použitím BCA je stupeň zbarvení vyšší oproti intenzitě zbarvení, která by vznikla součtem intenzit poskytnutých jednotlivými funkčními skupinami [33].

2.3.3 Enzymatické štěpení proteinů

Proteolytické enzymové štěpení se stalo běžným postupem zahrnutým do přípravy vzorků. Proteolytické enzymy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb v proteinech a peptidech za uvolnění tepla (exergonní reakce). Mohou se dále rozdělovat na proteinázy, které štěpí proteiny, a na peptidázy štěpící pouze krátké peptidy. Pojem peptidáza byl ale použit i v širším slova smyslu jako enzym hydrolyzující peptidové vazby. V závislosti na místě působení se peptidázy rozdělují na dvě skupiny. Endopeptidázy štěpí peptidové vazby uvnitř polypeptidového řetězce, exopeptidázy odštěpují koncové aminokyseliny.

Pokud není možné v některých specifických případech použít enzymatické štěpení proteinů, používají se také chemické metody štěpení. Příkladem je použití bromkyanu (BrCN) pro štěpení ve vodě nerozpustných nebo membránových proteinů (BrCN specificky působí na zbytky methioninu)

nebo hydrolyza proteinů zředěnou kyselinou mravenčí působící v místech zbytků kyseliny asparagové [30].

Nejvíce používaným proteolytickým enzymem se stal trypsin. Trypsin (EC 3.4.21.4) se řadí k endopeptidázám, které mají serinová charakteristická vazebná místa. Dalšími skupinami peptidáz mohou být cysteinové, aspartátové, threoninové a peptidázy obsahující kovový iont jako kofaktor. Trypsin je vylučován u obratlovců z pankreatu do dvanácterníku ve formě neaktivního trypsinogenu. Hovězí trypsinogen se aktivuje kaskádou enzymových reakcí za vzniku aktivního trypsinu o délce 101 aminokyselin.

Trypsin štěpí AMK sekvenci proteinů na specifických místech, a to od C-konce za lysinem a argininem, pokud za nimi nenásleduje aminokyselina prolin. Díky četnosti lysinu a argininu v proteinových sekvencích poskytuje trypsin peptidy, které jsou svojí velikostí vhodné pro analýzu hmotnostní spektrometrií. Správná účinnost trypsinu závisí na reakčních podmínkách. Je nutné správně zvolit složení a pH reakčního pufru, poměr enzym/substrát, teplotu a dobu inkubace. Optimální pH pro trypsin se pohybuje v rozmezí 7 až 9, což umožňuje práci s levným těkavým pufrem hydrogenuhličitanem amonným (pH 7,8). Ke štěpení postačuje poměr enzymu a substrátu v rozmezí 1:50 až 1:200. Optimální teplota štěpení je 37 °C po dobu 4-24 hodin, nej častěji přes noc [30].

Aby byly proteiny přístupné ke štěpení trypsinem a neobsahovaly disulfidické můstky -S-S-, je potřeba vzorky redukovat a alkylovat. K redukci disulfidických můstků na skupiny -SH se může použít Tris(2-karboxyethyl)-fosfinhydrochlorid (TCEP-HCl) nebo dříve používaný dithiothreitol (DTT) a další [34]. Skupiny -SH se poté stabilizují alkylací např. pomocí iodoacetamidu (IAA). IAA je v rozpuštěném stavu citlivý na světlo, proto je nutné naváženou chemikálii rozpustit v příslušném množství vody těsně před použitím a po dobu reakce udržovat vzorky ve tmě. K alkylaci se mohou použít i další činidla jako 4-vinylpyridin a akrylamid [35].

V současné době se zkoumá vliv imobilizovaného trypsinu na magnetických částicích na možnost zkrácení doby inkubace, která by významně dopomohla k redukci celkové doby analýzy vzorků bílkovin.

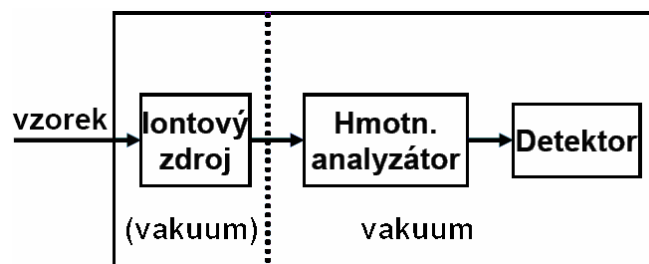
2.4 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) byla vyvinuta počátkem 20. století a stala se po dlouhou dobu hlavní metodou analýzy ropných produktů a těžkých organických látek. Za posledních 20 let se MS rozšířila do mnoha přírodních oborů (geologie, chemie, biologie, životní prostředí, farmacie a medicína). V roce 2002 byla udělena Nobelova cena za hmotnostní spektrometrii Koichi Tanakovi a Johnu Fennovi, kteří vynalezli ionizační techniky schopné analyzovat i velmi velké a složité molekuly, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Jednalo se o techniku desorpce a ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) a ionizaci elektrosprejem (ESI). Objev těchto technik velmi výrazně podpořil vznik proteomiky, vědy zabývající se studiem bílkovin z hlediska jejich identifikace a funkcí [36].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti molekul a jejich fragmentů. Nejprve převádí nenabitě molekuly na nabitě ionty. Ty jsou dále rozlišeny na základě jejich efektivních hmotností, což je označení poměru hmotnosti a náboje iontu (m/z). Při detekci takto separovaných iontů se zaznamenává hmotnostní spektrum, které vyjadřuje závislost četnosti vzniklých iontů na hodnotách m/z . Přístroj se nazývá hmotnostní spektrometr. MS patří k destruktivním analytickým metodám, při nichž je vzorek znehodnocen, ale výhodou je jeho minimální spotřeba. Tato metoda je schopna rozeznat primární strukturní informace analyzovaných látek spolu s dalšími údaji (např. posttranslační a chemické modifikace polypeptidového řetězce, neposkytuje však informace o sekundární a terciární struktuře proteinu). Velkou výhodou MS je její citlivost. Metoda umožňuje detekovat látky v množství menším než 10^{-12} g [37].

2.4.1 Součásti hmotnostního spektrometru

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Obr. 3).



Obr. 3 Základní části hmotnostního spektrometru [38]

Každý přístroj musí mít alespoň jeden vstupní systém pro zavádění vzorků do iontového zdroje. Používají se různé systémy podle typu přístroje a podle skupenství a těkavosti vzorku. Pro těkavé látky se používá přívod vzorku skleněnou kapilárou do iontového zdroje. Velmi málo těkavé látky jsou nejprve převedeny na těkavější deriváty (např. methylace, acetylace atp.), a až poté zavedeny do iontového zdroje (využití u elektronové nebo chemické ionizace). Málo těkavé a vysokomolekulární látky jsou zaváděny do iontového zdroje pomocí kovového terčíku, na který se vzorek nadávkuje spolu s matricí, a takto vzniklá sonda se zavede do iontového zdroje (využití u ionizace urychlenými atomy (FAB) nebo desorpce a ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)) [37]. Kontinuální přívod vzorku zajišťuje spojení MS s určitou separační technikou. Spojení může být s kapalinovou chromatografií (LC/MS), plynovou chromatografií (GC/MS) nebo kapilární elektroforézou (CE/MS).

Vakuový systém pump je další důležitou součástí hmotnostního spektrometru, který je nutný pro hmotnostní analyzátor a detektor. Hmotnostní analyzátor musí vždy pracovat za vysokého vakua, jehož hodnota se liší podle typu analyzátoru a pohybuje se v rozmezí 10^{-3} až 10^{-10} Pa. Vysoké vakuum je důležité pro správnou analýzu iontů, protože jim zaručuje dostatečně dlouhou střední dráhu letu od ionizace po detekci, při které nedochází ke kolizním srážkám mezi ionty a neutrálními molekulami [38]. Kromě ionizačních technik pracujících za atmosférického tlaku musí být ve vakuu umístěn i iontový zdroj.

Nedílnou součástí je také spojení přístroje s počítačem, který nastavuje pracovní podmínky analýzy, plní řadu řídicích funkcí přístroje a usnadňuje zpracování naměřených hmotnostních spekter [37].

2.4.1.1 Iontové zdroje

Iontové zdroje slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě ionty. Tento proces se nazývá ionizace. V současnosti existuje několik způsobů

ionizace. Obecně se tyto způsoby dělí na měkké a tvrdé ionizační techniky. Měkké techniky dodávají molekule malý přebytek energie a primárně vzniklý ion málo fragmentuje. V hmotnostním spektru pozorujeme vzniklé protonované molekuly $[M+H]^+$ při záznamu kladných iontů a deprotonované molekuly $[M-H]^-$ při záznamu záporných iontů. Tvrdé ionizační techniky poskytují molekulám dostatečnou energii k tomu, aby mohla proběhnout rozsáhlá fragmentace nově vzniklého iontu na menší části. Tvrdou ionizační technikou je např. elektronová ionizace (EI) poskytující tzv. EI hmotnostní spektra. Používá se např. u spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Existují rozsáhlé knihovny EI spekter látek, proti nimž lze porovnávat nově naměřená EI spektra neznámých látek. Volba ionizační techniky závisí na vlastnostech analyzované látky (těkavost, tepelná stabilita, molekulová hmotnost) [38].

Měkké ionizační techniky, ionizace elektrosprejem (ESI) a MALDI, se nejčastěji využívají pro analýzu velkých a složitých molekul, např. proteinů [37].

ESI patří mezi techniky ionizace pracující za atmosférického tlaku a bývá velmi často spojena s výstupem z kapalinového chromatografu. Na kovovou kapiláru přivádějící vzorek z kapalinového chromatografu do ESI je vloženo vysoké napětí (3-5 kV), které vytváří silné elektrostatické pole. Vlivem tohoto pole a pomocí zmlžujícího plynu (nejčastěji dusík) se z analytu rozpuštěném ve vhodném eluentu tvoří mlha kapiček (aerosol), které nesou velké množství povrchových nábojů. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje, až při dosažení kritické hodnoty nastává tzv. Coulombická exploze, při níž se rozdělí původní náboj mezi nově vzniklé ještě menší kapičky. Tento děj se opakuje až do té doby, než se uvolní nabitě ionty molekul analytu. Ty jsou poté vtaženy do hmotnostního analyzátoru systémem fokusačních a urychlujících elektrod [35]. Jelikož hmotnostní analyzátor potřebuje vysoké vakuum, při transportu iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakua dochází k velkému ochlazení iontů a nežádoucí tvorbě klastrů. Preventivním opatřením je buď vyhřátí iontového zdroje, nebo protiproud dusíku jako sušícího plynu [38].

MALDI pracuje na principu ionizace desorpcí laserem za účasti matrice. Vzorek se nanáší po smíchání s vhodnou matricí na terčíky MALDI destičky. Po odpaření směsi na destičce se destička vloží do přístroje a k terčíku s odpařeným vzorkem se přivede krátký laserový impuls, který je absorbován

matricí. Matrice energii laserového pulsu přenese na molekuly analyzované látky, které přecházejí do plynné fáze. Dochází tak k ionizaci, při níž vznikají ionty s jedním nebo dvěma kladnými náboji. Nejčastěji používanými lasery jsou dusíkové UV lasery. Pro analýzu iontů biopolymerů (proteiny, glykoproteiny, polynukleotidy a polysacharidy) se velmi často používá spojení s analyzátozem doby letu (TOF) [37].

Dalšími ionizačními technikami jsou chemická ionizace (CI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI) (spolu s ESI tvoří skupinu ionizačních technik za atmosférického tlaku, API), desorpční ionizace elektrosprejem (DESI) a přímá analýza v reálném čase (DART). Ke starším ionizačním technikám se řadí ionizace termosprejem (TSI), ionizace urychlenými atomy (FAB) a ionty (FIB), ionizace polem (FI), desorpce polem (FD) a desorpce plazmou ^{252}Cf [38].

2.4.1.2 Hmotnostní analyzátory

Separaci iontů v plynném stavu umožňují hmotnostní analyzátory podle efektivních hmotností m/z (poměr hmotnosti a náboje iontu). Analyzátor je umístěn za iontovým zdrojem, který převedl neutrální molekuly na nabitě ionty, a před detektorem, do něhož vstupují ionty rozdělené podle m/z . Separace lze dosáhnout na základě různých fyzikálních principů.

Kvadrupólový analyzátor (Q) pracuje na principu separace iontů pomocí čtyř kovových tyčí kruhového průřezu. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí a na všechny ještě vysokofrekvenční střídavé napětí. Je-li ion přiveden do středu osy kvadrupólu, začne oscilovat. Pro určitý poměr stejnosměrného napětí a amplitudy (U/V) jsou oscilace stabilní pouze pro ion s určitou hodnotou m/z , který projde analyzátozem až na detektor. Ostatní ionty mají pro tuto hodnotu U/V nestabilní oscilace, a tudíž jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu. Plynulou změnou poměru U/V (skenováním) jsou postupně na detektor propuštěny všechny ionty ze vzorku.

Iontová past (IT) pracuje na podobném principu jako kvadrupól. Ionty jsou pulzně přivedeny do pastí, kterou tvoří jedna kruhová a dvě koncové elektrody. Zde jsou ionty zachyceny pomocí vhodných poměrů napětí na kruhové a dvou koncových elektrodách (stabilní oscilace). Postupnou změnou

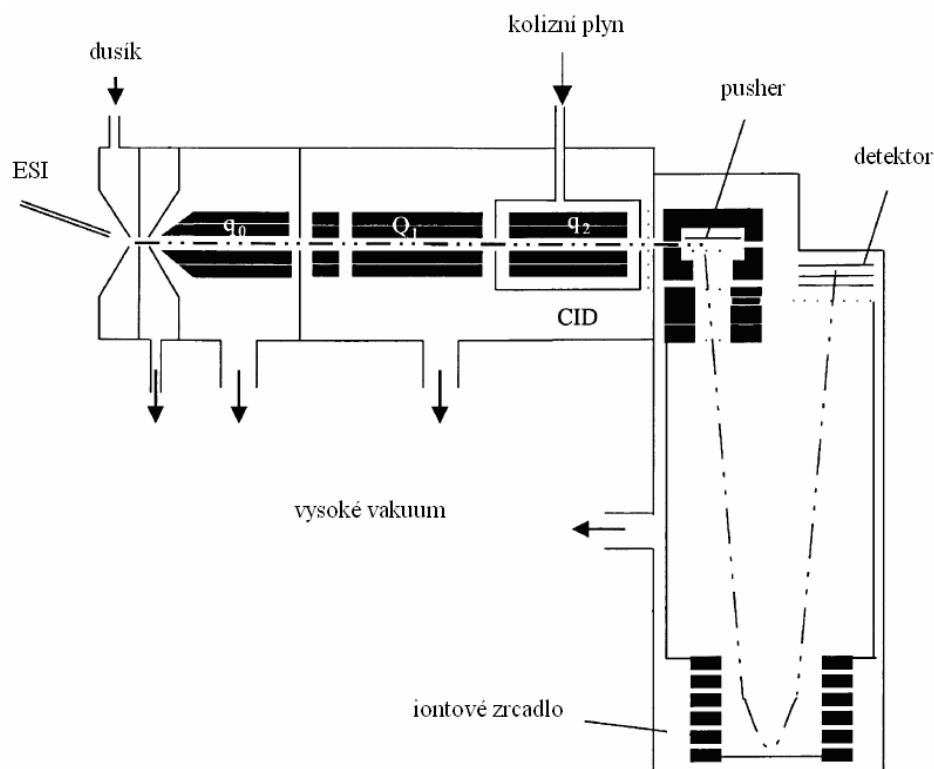
napětí podléhají ionty nestabilním oscilacím a jsou vypuzovány na detektor podle jejich m/z .

Analyzátor doby letu (TOF), nebo také průletový analyzátor, využívá různé rychlosti letu iontů v oblasti bez elektrického pole. Ionty s menší hodnotou m/z o stejné kinetické energii se pohybují rychleji než ionty s vyšší hodnotou m/z . Jde o pulzní hmotnostní analyzátor. Nejdříve jsou ionty při vstupu do analyzátorové trubice urychleny krátkým elektrickým pulzem, a poté je měřen čas, za který dolétnou k detektoru. Tento čas určuje jejich m/z . Skenování je velice rychlé a lze určit i m/z větší než 10^6 Da (Dalton). Zvýšení rozlišení u TOF analyzátorů lze dosáhnout použitím reflektoru nebo opožděnou extrakcí iontů. Reflektor, neboli iontové zrcadlo, slouží k vyrovnání různých kinetických energií iontů se stejnou hodnotou m/z . Ionty s větší kinetickou energií jsou schopné proniknout hlouběji do odrazového elektrického pole, čímž dojde k jejich zpoždění oproti iontům s menší kinetickou energií. Vyrovná se tím celková dráha iontů se stejnou m/z . Při opožděné extrakci iontů jsou ionty z iontového zdroje extrahovány s malým zpožděním, čímž dojde díky vzájemným srážkám ke sjednocení jejich kinetických energií.

Dalšími druhy hmotnostních analyzátorů jsou magnetické či elektrostatické analyzátory s jednoduchou nebo dvojitou fokusací iontů (sektorové hmotnostní spektrometry), iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a nejnovější typ hmotnostního analyzátoru Orbitrap [38].

Hmotnostní spektrometr nemusí obsahovat pouze jeden hmotnostní analyzátor, ale lze použít i více analyzátorů umístěných za sebou. Takové přístroje se nazývají tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS). Slouží k bližší charakterizaci analyzované látky. Konkrétně u peptidů (proteinů) zahrnuje např. určení aminokyselinové sekvence peptidů (proteinů) nebo nalezení míst posttranslačních modifikací.

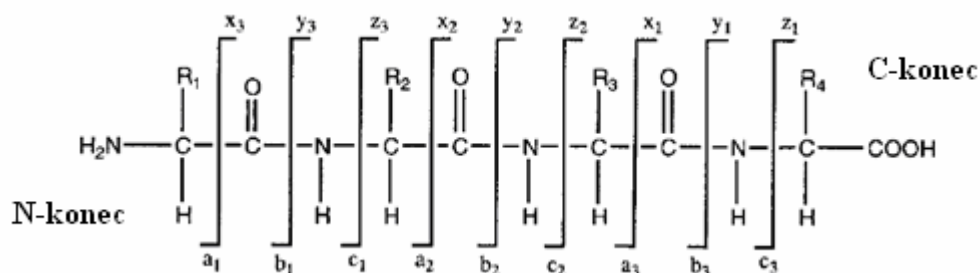
Tandemové hmotnostní spektrometry mohou kombinovat analyzátory pracující na různých principech (tandemové hybridní hmotnostní spektrometry). Příkladem je spojení kvadrupólu (Q) s průletovým analyzátozem (TOF), mezi nimiž je další kvadrupól mající úlohu kolizní cely (q). QqTOF (Obr. 4) se stal dobrou volbou pro spojení HPLC-MS/MS za ionizace ESI [39].



Obr. 4 Schéma tandemového hmotnostního spektrometru QqTOF [39]

Postup fragmentace peptidů pomocí MS/MS v uspořádání QqTOF je následující. Z iontového zdroje přicházejí vzniklé ionty do prvního hmotnostního analyzátoru. V něm jsou ionty separovány na základě fyzikálního principu daného analyzátoru, který je zde přítomen, a ostatními dvěma analyzátory ionty pouze prolétají a dopadají na detektor. Pomocí softwaru jsou vybrány pro tandemovou analýzu pouze ionty s hmotou, která odpovídá zadaným parametrům měření. Ionty s vybranou hmotou jsou poté fragmentovány ve druhém analyzátoru označovaném jako kolizní cela. Ta fragmentuje vybrané ionty pomocí kolizní energie a srážek s neutrálními atomy kolizního plynu (collision induced dissociation, CID). Fragmentací peptidů technikou CID nejčastěji vznikají y-iontové (od C-konce) a b-iontové (od N-konce) série fragmentů (Obr. 5). Rozdíl m/z mezi sousedními y-ionty nebo b-ionty odpovídá molekulové hmotnosti určité aminokyseliny (AMK). Kromě CID fragmentací existují také disociace proteinů záchytem elektronů (electron capture dissociation, ECD) nebo přenosem elektronů (electron transfer dissociation, ETD). Ty vyvolají fragmentaci peptidů za dusíkem peptidové vazby a vznikají c-ionty a z-ionty [40]. Fragmentované ionty popsané výše uvedenými technikami jsou separovány ve třetím hmotnostním analyzátoru, dopadají na

detektor a jsou zaznamenány v tandemovém hmotnostním spektru (MSMS spektrum). Tak lze z MSMS spekter určit AMK sekvenci peptidů.



Obr. 5 Fragmentační série peptidů [41]

K určení proteinové struktury se také používá přímá sekvenace metodou Edmanova odbourávání, kterým se postupně odštěpují N-koncové aminokyseliny peptidové sekvence. V dnešní době se ale sekvenace proteinů provádí především technikami hmotnostní spektrometrie. V proteomice se již Edmanovo sekvenování tolik nepoužívá. Přesto je stále využíváno tam, kde použití hmotnostní spektrometrie není vhodné, nebo tam, kde je k dispozici malý počet proteinů ve vzorku [41].

2.4.1.3 Detektory

Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci hmotnostním analyzátozem podle m/z a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů. Poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Dnes již nepoužívanými typy detektorů jsou detektory pro přímá měření, které detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem stanovovaných iontů [38].

V současnosti nejčastěji používanými detektory v hmotnostní spektrometrii jsou násobičové detektory. Ty se skládají ze soustavy jednotlivých dynod nebo z jedné souvislé dynody. U soustavy jednotlivých dynod kladně nabitě ionty o určité m/z dopadají na první dynodu, na kterou je vloženo záporné napětí (princip přitahování opačných nábojů). Dopadající ionty emitují sekundární elektrony nárazem na kovový povrch dynody. Pokud se zvýší elektrické napětí mezi dynodami, získá se průměrně vyšší počet emitovaných elektronů na náraz. Na dynody následující po první se vkládá postupně nižší napětí (potenciálový spád) a dochází tak k urychlení proudu elektronů. Tento typ detektorů není vhodný pro vzorky, které poskytují velmi slabý a přerušovaný

proud iontů. Nehodí se také pro proud iontů, ve kterém se hodně rychle mění hodnoty m/z (např. u TOF analyzátoru, který celé spektrum získá během asi 100 μs).

Další možností uspořádání násobičových detektorů je plochá skleněná destička, v níž je sada kanálů. Označuje se jako multikanálový detektor (multichannel plate, MCP). Destička umístěná v ohniskové vzdálenosti od analyzátoru umožní iontům s určitou hodnotou m/z projít MCP a dopadnout až na fosforeskující vrstvu. Ta vysílá světelný signál na pole fotodiod [39].

2.4.2 Spojení LC-MS

Metody separace látek z bohatých vzorků hrají významnou roli při jejich analýze. Na úspěšné separaci mnohdy závisí správnost a přesnost celého stanovení. V proteomice se k separaci proteinů a peptidů využívají především elektromigrační separační metody (např. 2-DE a kapilární elektroforéza) a chromatografické techniky (téměř všechny chromatografické separační techniky s kolonami, hydrofobní a hydrofilní interakční chromatografie, gelová permeační chromatografie, afinitní chromatografie, izotachoforéza). Často je nutné pro dělení směsí použít i několik separačních technik najednou [42].

Kapalinová chromatografie (LC) je jednou z mnoha metod, pomocí níž lze separovat proteiny a peptidy. V proteomice používaným uspořádáním pro separaci proteinů a peptidů se stalo spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). LC slouží k separaci látek na základě jejich interakce se stacionární a mobilní fází. Vhodným provedením je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která vyniká lepší účinností oproti klasické kapalinové chromatografii. K účinné separaci používá drobných částíček pevného sorbentu (stacionární fáze), kterými je naplněna chromatografická kolona. Tyto částice kladou protékající kapalině (mobilní fázi) značný odpor, proto HPLC čerpá mobilní fázi pumpami a pracuje tak za vysokého tlaku.

Uspořádání kapalinové chromatografie je dvojího typu. Probíhá buď na normálních fázích (NP), nebo na fázích obrácených (RP). Uspořádání s normální fází obsahuje polární stacionární fázi (např. voda na silikagelu) a nepolární mobilní fázi (např. hexan). Nejméně polární analyt je eluován jako první, protože se nejméně mísí se stacionární fází. Normální fáze je vhodnější

pro separaci polárních vzorků, ale může nastat stav, kdy interakce polárních molekul bude se stacionární fází tak silná, že se budou v koloně zdržovat po velmi dlouhou dobu (dlouhý retenční čas). Jelikož nebylo možné zajistit reprodukovatelnost retenčních časů látek, byla vyvinuta metoda na obrácených fázích (RP), kde jsou polarity fází opačné. Stacionární fáze je nepolární (např. uhlovodíky nebo alkyly vázané na silikagelu) a mobilní fáze je polární (např. voda, acetonitril). Nejvíce zdržované látky v tomto uspořádání jsou látky nepolární. Tato separace se hodí pro látky jakékoliv polarity [43].

Peptidy získané štěpením proteinů se nejčastěji separují pomocí HPLC s náplňovou chromatografickou kolonou v uspořádání s obrácenými fázemi (RP-HPLC). Tato metoda dělí peptidy na základě různě silných hydrofobních interakcí s chromatografickou náplní. Nejpoužívanější nepolární stacionární fází se stala tzv. C₁₈ (alkylové řetězce o délce osmnácti uhlíků navázané na pevných silikagelových částicích). Jako mobilní fáze se používá polární kapalina (např. vodný roztok kyseliny mravenčí nebo octové, trifluoroctová kyselina není pro hmotnostní spektrometr příliš vhodná, jelikož zůstává v detektoru). Eluční činidlo tvoří méně polární organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril), které snižuje zdržování látek na koloně. Nízký obsah organického rozpouštědla v mobilní fázi umožňuje zdržení peptidů na koloně, ale postupným zvyšováním podílu tohoto organického rozpouštědla se peptidy uvolňují z kolony podle jejich polarity (eluze např. gradientem acetonitrilu) [44]. S oblibou se využívá zařazení předkolony, která zadrží peptidy, umožní vymytí nežádoucích sloučenin, a poté zvýšením gradientu uvolní peptidy na samotnou kolonu. Z kolony se peptidy dostávají do iontového zdroje hmotnostního spektrometru a následuje analýza hmotnostní spektrometrií.

V posledních letech se stala trendem miniaturizace separačních technik. V oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie se zkracují kolony a zmenšují velikosti částic sorbentu, zmenšuje se také vnitřní průměr kolon. Důvody k miniaturizaci jsou zrychlení analýz bez ztráty separační účinnosti, zlepšení finančního provozu laboratoří a současně ekologické hledisko (snižuje se spotřeba mobilních fází obsahujících organická rozpouštědla). Dalším důvodem je omezené množství vzorku, jehož objem nelze navýšit (např. v proteomice) [45].

2.5 Zpracování dat

Nedílnou součástí analýzy látek tandemovou hmotnostní spektrometrií je konečné zpracování naměřených dat. Při analýzách bohatých směsí látek (např. proteiny a peptidy, nukleové kyseliny) je nutné vzhledem k obsáhlosti získaných dat použít k vyhodnocování počítač. Ten je schopný informace hromadit, uchovávat, analyzovat a hledat souvislosti mezi biologickými daty rychle a efektivně pomocí specializovaného softwaru.

2.5.1 Data tandemové hmotnostní spektrometrie

V proteomice data získaná z tandemové hmotnostní spektrometrie obsahují efektivní hmotnosti m/z a intenzity píků příslušející jak jednotlivým iontům, tak jejich fragmentům. Tato „surová“ data se ukládají do souborů různých formátů. Formát raw používají např. počítačové programy MassLynx (Waters) a Xcalibur (Thermo Electron), formát baf je používán MassLynx (Bruker). V závislosti na použitém programu se ze „surových“ dat extrahují pouze některá do textového formátu určitého typu, např. mgf (MASCOT), dta (SEQUEST) nebo pkl (ProteinLynx, Micromass). V textovém souboru jsou obsaženy hodnoty molekulových hmotností, nábojů a intenzit iontů ve spektru [46].

2.5.2 Databáze

Biologické databáze obsahují data z různých molekulárně biologických odvětví. Primární databáze obsahují proteinové nebo nukleotidové sekvence doplněné o další informace. Primární nukleotidovou databází je např. EMBL nebo GenBank. K proteinovým primárním databázím se řadí SwissProt nebo TrEMBL.

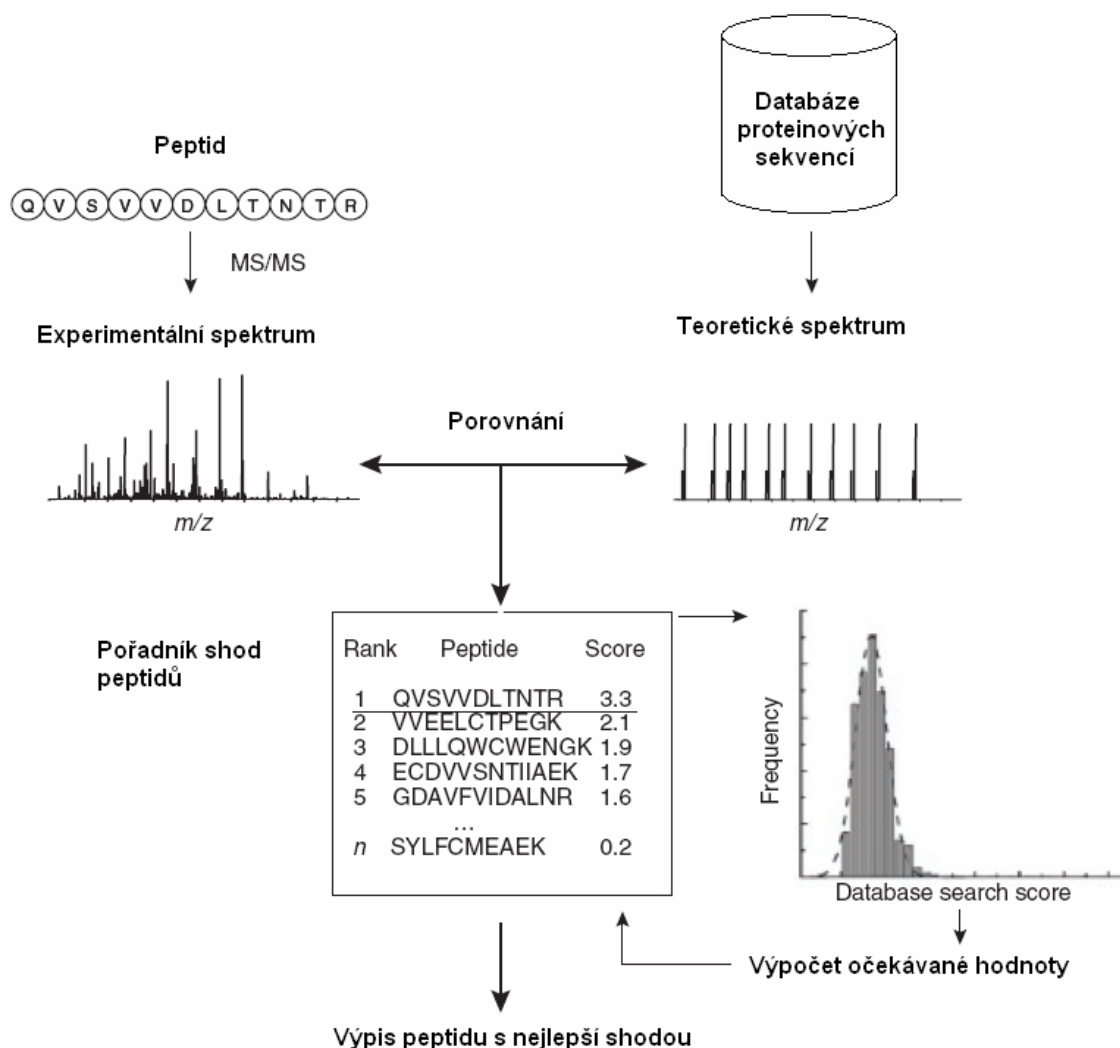
V posledních letech velmi narostl počet sekvencí proteinů a informací o těchto proteinech. Proto bylo třeba vytvořit složené proteinové databáze, které jsou schopné pojmout toto obrovské množství dat a zároveň umožňují propojení i s ostatními jednotlivými databázemi. Příkladem složené proteinové databáze je UniProt (Universal Protein Resource). Metodou mnohočetného srovnávání umožňuje porovnání jedné proteinové sekvence pocházející z různých organismů, např. bakterií odlišných kmenů. Srovnání sekvencí jednoho proteinu v řádcích pod sebou, jenž představují bakteriální kmeny, odhaluje odlišné

obsazení sekvenčních míst aminokyselinami. Tyto záměny mohou být identifikačními a typizačními markery odlišující jednotlivé kmeny bakterií mezi sebou.

Sekundární databáze obsahují výsledky analýz primárních databází, které porovnávají proteinové sekvence mezi sebou a hledají strukturní „motivy“, které by mohly souviset s biologickou funkcí daného proteinu. Do sekundárních databází lze vložit neznámou sekvenci proteinu a na základě porovnání se sekvencí uloženou v této databázi lze odvodit jeho funkci. Existují také databáze které uchovávají data o trojrozměrných strukturách makromolekul [47].

2.5.2.1 Databázové vyhledávací programy

Databázové vyhledávací programy pro identifikaci proteinů z dat získaných MS využívají různé druhy biologických databází. Pracují na principu porovnávání vložených experimentálních dat s teoretickými daty uloženými v těchto databázích. Pokud dojde ke shodě porovnávaných dat na základě určitých kritérií, je protein nebo peptid identifikován s určitým skóre a pravděpodobností a popsán na výstupu z programu (Obr. 6). V současnosti existují tři hlavní druhy databázových vyhledávacích programů lišící se přijímanými vstupními daty. Programy mohou vyhledávat peptidy podle vstupních dat, kterými mohou být molekulové hmotnosti peptidů (MS-Fit, PeptideSearch), molekulové hmotnosti fragmentovaných iontů (MS-Tag, MS/MS Ion Search, Phenyx) nebo sekvence aminokyselin (MS-Seq, Sequence Query). Mnohé z těchto programů lze volně využívat prostřednictvím Internetu [48].



Obr. 6 Porovnání experimentálních a teoretických dat pomocí databázových vyhledávacích programů [46]

Vyhledávací databázový program Phenyx (GeneBio, Švýcarsko) je nástrojem pro identifikaci, kvantifikaci a charakterizaci proteinů a peptidů z dat tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS), jenž měří fragmentační spektra iontů (MSMS). Phenyx umožňuje identifikovat peptidy a proteiny z MS/MS dat, zobrazit a zhodnotit výsledky pomocí tabulek a grafů, porovnat výsledky s ostatními vyhledávacími databázemi, provést kvantitativní analýzu a exportovat výsledky do souborů různých formátů (xls, xml, text) [49].

Volitelnými parametry tohoto programu jsou vyhledávací kritéria, podle kterých se porovnává naměřené spektrum s teoretickými daty. Základními parametry jsou proteinové databáze (jedna či více), vůči kterým se daný vzorek porovnává, a taxonomické zařazení organismu, jehož spektrum proteinů se má identifikovat. K parametrům vyhledávajícího nástroje MS/MS patří typ přístroje,

kterým je dané spektrum naměřeno (např. Q-TOF, Q-TRAP), skórovací model (kritérium pro správné seřazení proteinů podle míry spolehlivosti identifikace) a nábojový status iontů (2+, 3+).

Detailnější parametry týkající se proteinů a peptidů se mohou vyhledávat dvoukolově. V prvním kole se volí parametry, které jsou uplatňovány na celé spektrum proteinů v databázi, ve druhém kole se zvolené parametry uplatňují pouze na proteiny, které splňují podmínky z kola prvního. Každé kolo lze navolit samostatně, ale parametry jsou stejné. Jedná se o výběr modifikací aminokyselin (ať už přirozených nebo arteficiálních), které se mohou v daném vzorku vyskytovat (oxidace methioninu, karbamidomethylace cysteinu atd.) a druh enzymu, jímž jsou proteiny naštěpeny na peptidy (trypsin, chymotrypsin, pepsin a další). Lze také zvolit počet chybných štěpení enzymem (missed cleavage) a zda enzym respektuje svá pravidla pro štěpení na obou koncích proteinu. Dalšími kritérii jsou minimální pokrytí peptidové sekvence (v procentech) hledanými fragmentovými sériemi iontů (b+, b++, y+, y++) a rozhodovací kritérium v případě nejasností, o kterou sekvenci se jedná. Phenix rozhodne, která sekvence je nejpravděpodobnější. Jelikož hmotnostní spektrometr měří molekulové hmotnosti s určitou chybou, lze zadat hodnotu v Daltonech (Da) nebo ppm (parts per million), o kterou se můžou naměřené hmoty lišit od teoretických. Přijatelnými parametry jsou také minimální délka identifikovaného peptidu podle počtu aminokyselin, minimální z-skóre peptidu (míra podobnosti; čím větší číslo, tím větší podobnost), maximální p-hodnota peptidu (pravděpodobnost, s jakou přesností mohou být dvě sekvence navzájem podobné; čím blíže hodnotě nula, tím větší pravděpodobnost, že shoda není náhodná) a AC-skóre (součet nejlepších skóre pro validované peptidové sekvence) [50].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Kultivace bakterií

Pro účely této diplomové práce jsme vybrali dva organismy: *Francisella tularensis holarctica* (LVS, live vaccine strain) a *Francisella tularensis tularensis* (Schu S4).

S bakteriální kulturou LVS jsme manipulovali v laboratoři BSL-2 (Biosafety Level 2). Tento stupeň biologické ochrany je určen pro práci s původci infekčních onemocnění, kteří mohou středně ohrozit osoby a životní prostředí. Existuje proti nim účinná a nenáročná léčba. V této laboratoři jsme používali ochranné rukavice a ochranný oděv (bílý plášť). Při práci s tekutým vzorkem s infekčními původci jsme používali boxy s laminárním prouděním vzduchu, které brání šíření aerosolu s patogeny. Laboratoř je pravidelně a kompletně dezinfikována.

Pro práci s *Francisella tularensis* Schu S4 se využívá mikrobiologická laboratoř BSL-3 (Biosafety Level 3). Tento stupeň biologické ochrany je určen pro práci s vysoce rizikovými agens, které mohou po vdechnutí způsobit vážné až letální onemocnění. Laboratorní oblečení určené pro práci v BSL-3 laboratoři je čistý pracovní oděv (košile, kalhoty, ponožky), ústenka, pracovní obuv a návleky, ochranný overal a dvojce ochranné rukavice. S infekčním materiálem lze v BSL-3 pracovat pouze v biohazardním boxu nebo v uzavřených systémech tak, aby se na nejvyšší možnou míru omezil vznik infekčního aerosolu. Laboratoř je po ukončení celé práce dekontaminována UV lampami po dobu 0,5 hodiny. Veškerý použitý materiál i oblečení jsou autoklávovány.

Předem vypěstované bakteriální kultury LVS a Schu S4 na agarových McLeod půdách a nové McLeod plotny jsou uchovávány v chladicím zařízení. Pro potřeby nové kultivace jsme jednotlivé plotny odebírali a dále zpracovávali.

3.1.1 Materiál, chemikálie a roztoky

McLeod pevné kultivační půdy se připravují smícháním dvou pracovních roztoků. Roztok I obsahuje 72 g Thayer-Martin agarové báze a 1 g Bacto agaru rozpuštěné v 1 litru deionizované vody. Všechny složky roztoku I se smíchají a povaří do rozpuštění. Roztok II se získá smícháním 1 litru deionizované vody

a 20 g hovězího hemoglobinu, který se nechává předem nabobtnat přes noc za stálého míchání. Oba zhotovené roztoky se sterilizují autoklávováním při 121 °C po dobu 20 minut, sterilně se smíchají a po zchladnutí na asi 50 °C se přidá k této směsi 20 ml IsoVitalexu. Poté je půda rozlévána do sterilních Petriho misek o průměru 6 cm a nechává se ztuhnout s poodkrytými víčky. Po zatuhnutí se plotny uzavřou víčky a obrátí dnem vzhůru. Skladují se v lednici, ve které vydrží asi týden se zachováním své kvality.

3.1.2 Technické vybavení

- Bezpečnostní skříň Biohazard s@eflow 1.2 (BIOAIR instruments)
- Standardní CO₂ inkubátor 2406 ShellLAB (Sheldon Manufacturing)

3.1.3 Postup

V laminárním boxu jsme nové McLeod plotny nechali vysušit asi 10 minut pro odstranění přebytečné vody. Nutná je příprava dezinfekčního prostředku pro ošetření použitých pomůcek, které nějak manipulují s infekčním agens. Práci s plotnami s živou bakteriální kulturou jsme prováděli v laminárním boxu. Pomocí plastových bakteriálních klíčků jsme přenesli polovinu bakteriální kultury z plotny na plotnu novou. Klíčkovou jsme rozetřeli bakterie rovnoměrně po celém povrchu. Nově nasazené bakteriální kultury jsme uložili do inkubátoru temperovaného na stálou teplotu 37 °C a nechali inkubovat přes noc. Staré použité plotny se vyhazují do určených pytlů, které se pravidelně vyměňují a dekontaminují.

Pracovní postup kultivace bakterií Schu S4 je obdobný tomu pro LVS. Je třeba pracovat v laboratoři BSL-3 a dbát zvýšené opatrnosti při manipulacích s bakteriemi. Když je potřeba, prostor se dezinfikuje 75% ethanolem. Bakterie se nechávají kultivovat v inkubátoru přes noc při teplotě 37 °C.

3.2 Příprava vzorků

Připravovali jsme celkem čtyři druhy vzorků. Dva postupy sloužily k získání acetonitrilových extraktů a dva pro vytvoření vzorků celobuněčných lyzátů. Manipulace s kulturou jsme prováděli vždy v laminárním boxu. Pro vortexování a centrifugaci je možno vynést vzorek i mimo laminární box, ale předem se musí všechny eppendorfky a zkumavky řádně uzavřít.

Vzorky zhotovené z bakteriální kultury *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 jsme museli zkontrolovat na životnost bakterií. Ze vzorků jsme odpipetovali 20 µl na nové plotny s McLeod agarem a pomocí plastové kličky do tvaru hokejky jsme roztok roztírali po celé plotně, dokud se nevsál. Kontrolní plotny jsme nechali inkubovat při 37 °C po dobu dvou dní, abychom si byli jisti, že vzorky opravdu neobsahují žádné živé bakterie. V případě negativní kontroly růstu bylo možné připravené vzorky vynést z BLS-3.

V případě růstu jen jediné kolonie na kontrolních půdách jsme museli daný vzorek podrobit 0,5 hodinovému působení UV-lampy a znovu zkontrolovat životnost bakterií.

Pokud jsme nepostupovali v dalším zpracování vzorků, uskladnili jsme je při -20 °C.

3.2.1 Acetonitrilové extrakty

3.2.1.1 Chemikálie a roztoky

- Acetonitril pro chromatografii LiChrosolv, Mr 41,05 g/mol (MERCK, kat.č. 114291)
- Kyselina trifluoroctová (TFA), Mr 114,02 (Sigma-aldrich, kat.č. 302031)
- PBS pufr: 80 g NaCl, 2 g KCl, 32,1 g Na₂HPO₄*12H₂O a 2 g KH₂PO₄ rozpustit v celkovém objemu 1 litr deionizované vody. Upravit pH na 7,2-7,4 a sterilizovat autoklávováním. Před použitím 10krát naředit.
- Extrakční roztok: 70% ACN, 0,5% TFA ve vodě
- Extrakční roztok: 80% TFA ve vodě

3.2.1.2 Technické vybavení

- Třepačka MINISHAKER MS2 (IKA)
- Centrifuga BR4i Thermo-Jouan (Trigon-plus)

3.2.1.3 Postup

Metoda L

Narostlou kulturu LVS (Schu S4) inkubovanou přes noc při 37 °C jsme setřeli z poloviny plotny plastovou kličkou a resuspendovali v 5 ml vychlazeného PBS pufru, který jsme měli ve zkumavce. Zkumavku jsme uzavřeli, obsah roztřepali a vložili do centrifugy. Stáčeli jsme při 4000 rpm 10 minut za teploty

4 °C. Po centrifugaci jsme ze zkumavky v laminárním boxu odstranili supernatant a k sedimentu za intenzivního třepání přidali po kapkách 200 µl extrakčního roztoku (70% ACN, 0,5% TFA ve vodě). Třepali jsme po dobu 1 minuty a znovu obsah zkumavky stočili v centrifuzě při 10 000 rpm 10 minut za 4 °C. Supernatant jsme odebrali do správně označené nové eppendorfky.

Metoda B

Narostlou kulturu LVS (Schu S4) inkubovanou přes noc při 37 °C jsme setřeli z poloviny plotny plastovou kličkou a resuspendovali ve 400 µl extrakčního roztoku (80% TFA ve vodě), který jsme předem napipetovali do eppendorfky. Nechali jsme extrahovat 30 minut v laminárním boxu. Poté jsme eppendorfky vložili do centrifugy a stočili při 13 000 rpm 5 minut za teploty 4 °C. Odebrali jsme 100 µl supernatantu do nové eppendorfky a k tomuto množství přidali 300 µl deionizované vody (mohl se vytvořit zákal) a 400 µl acetonitrilu (zákal se částečně vyčeřil). Obsah eppendorfky jsme promíchali třepačkou. Eppendorfky jsme vložili do centrifugy a stočili při 13 000 rpm 5 minut za teploty 4 °C. Supernatant jsme odebrali do správně označené nové eppendorfky.

3.2.2 Celobuněčné lyzáty

3.2.2.1 Chemikálie a roztoky

- Benzonáza ® Nukleáza (Sigma-aldrich, kat.č. E1014-25KU)
- Močovina Ultrapure, MB Grade, Mr 60,06 (USB Corporation, kat.č. 75826)
- PBS pufr (viz kapitola 3.2.1.1)
- 50mM Tris, pH 7,5: naředit připravenou 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 (12,11g Tris rozpustit v 1 l deionizované vody, v případě potřeby upravit pH pomocí HCl nebo NaOH)

3.2.2.2 Technické vybavení

- Třepačka MINISHAKER MS2 (IKA)
- Centrifuga BR4i Thermo-Jouan (Trigon-plus)
- FRENCH® Press (Thermo Scientific)
- Termostat (TECTRA)

3.2.2.3 Postup

Metoda Var

Narostlou kulturu LVS (Schu S4) inkubovanou přes noc při 37 °C jsme setřeli z poloviny plotny plastovou kličkou a resuspendovali v 5 ml vychlazeného PBS pufru. Zkumavku s kulturou jsme centrifugovali při 4000 rpm 10 minut za teploty 4 °C. Odstranili jsme supernatant, pelet promyli v 1 ml PBS pufru a roztok přepipetovali do eppendorfky. Eppendorfku jsme centrifugovali při 4000 rpm 10 minut za teploty 4 °C. Odstranili jsme supernatant a usazeninu resuspendovali v 1 ml 50mM Tris, pH 7,5. Do vzorku jsme přidali 1 µl benzonázy, která štěpí nukleové kyseliny, a vzorek zahřáli v termostatu na 95 °C po dobu 10 minut. Poté jsme stočili eppendorfku při 14000 rpm 10 minut za teploty 24 °C a supernatant odebrali do nové eppendorfky.

Metoda FP-8M (french press s 8M močovinou)

Narostlou kulturu LVS (Schu S4) inkubovanou přes noc při 37 °C jsme setřeli z poloviny plotny plastovou kličkou a resuspendovali v 5 ml vychlazeného PBS pufru. Zkumavku s kulturou jsme centrifugovali při 4000 rpm 10 minut za teploty 4 °C. Odstranili jsme supernatant a pelet resuspendovali v 1 ml 8M močoviny. Přidali jsme 1 µl benzonázy, která štěpí nukleové kyseliny, a obsah roztřepali. Poté jsme provedli extrakci pomocí french pressu. Do vychlazené cely jsme napipetovali 1 ml vzorku. Cely jsme správně uzavřeli, vložili do přístroje, upevnili, nastavili tlak 18 000 psi a natlakovali. Pro získání extrahovaného vzorku jsme pomalu povolovali vypouštěcí kohout, aby frekvence odtoku kapaliny byla asi 20 kapek za minutu. Vzorek jsme jímali do stejné eppendorfky a poté celý proces extrakce opakovali pro dosažení dokonalého rozbití bakteriálních buněk. Druhou extrakci jsme jímali do nové eppendorfky, kterou jsme poté vložili do centrifugy a stáčeli při 14 000 g 10 minut za teploty 24 °C. Supernatant jsme odebrali do nové eppendorfky.

3.3 Stanovení koncentrace bílkoviny

3.3.1 Chemikálie a roztoky

- Micro BCA™ Protein Assay Kit:
 - Micro BCA Reagent A (MA) – uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný a vínan sodný v 0,2M NaOH

- Micro BCA Reagent B (MB) – 4% kyselina bicinchoninová (vodný roztok)
- Micro BCA Reagent C (MC) – 4% síran měďnatý (pentahydrát ve vodě)
- Standard BSA (hovězí sérový albumin) - koncentrace 2 mg/ml v roztoku 0,9% soli a 0,05% azidu sodného

3.3.2 Technické vybavení

- Termocyklér Hybridiser HB-1D (TECHNE)
- UV-VIS spektrofotometr Helios Gamma (Thermo Scientific)

3.3.3 Postup

Množství bílkoviny ve vzorcích jsme museli předem odhadnout a podle tohoto odhadu jsme museli vzorky naředit. Ředění bylo také potřebné pro kompatibilitu tohoto kitu s používanými roztoky pro přípravu vzorků. Pro náš případ přípravy vzorků se uvádí, že maximální koncentrace acetonitrilu může být 1% vodný roztok, močovina maximálně 3M a Tris 50mM. Kompatibilita kitu s koncentracemi dalších reagensů, které se mohou používat pro přípravu vzorků, je uvedena v návodu přiloženém u každého kitu.

Připravili jsme kalibrační řadu standardů BSA do zkumavek označených A až I. Dávkované objemy vody a standardního proteinu BSA uvádí Tab. 4, uvádí také jednotlivé koncentrace BSA v této řadě zkumavek.

Tab. 4 Kalibrační řada standardů BSA

Zkumavka	Objem vody [ml]	Objem BSA [ml]	BSA koncentrace [μg/ml]
A	2,25	0,25 ml zásobního roztoku	200
B	4,0	1 ml A	40
C	2,0	2 ml B	20
D	2,0	2 ml C	10
E	2,0	2 ml D	5
F	2,0	2 ml E	2,5
G	2,4	1,6 ml F	1
H	2,0	2 ml G	0,5
I	4,0	0 ml	blank

Vzorky ke změření bílkoviny jsme připravili vždy nejméně ve dvojicích. To platilo i pro vzorky kalibrační řady standardního proteinu BSA. Jednotlivé eppendorfky vždy obsahovali 0,4 ml standardních roztoků B až I (odpipetovali jsme ze zkumavek se standardními roztoky) nebo 0,4 ml roztoku vzorku (vzorky takto dávkované do eppendorfek jsme předem naředili vodou podle kompatibility kitu s reagensy). Do všech eppendorfek jsme poté přidali 0,4 ml pracovního roztoku, který jsme připravili těsně před jeho použitím. Byl složen z 25 dílů činidla MA, 24 dílů činidla MB a 1 dílu činidla MC (poměr 25:24:1). Všechny eppendorfky jsme promíchali vortexem a inkubovali 1 hodinu při 60 °C v termocykléru. Po inkubaci jsme eppendorfky zchladili na pokojovou teplotu pod studenou tekoucí vodou. Absorbanci kalibrační řady i vzorků bylo vhodné změřit do 10 minut na spektrofotometru při $\lambda = 562$ nm. Používaný spektrofometr byl schopen podle změřených absorbancí kalibrační řady vypočítat kalibrační parametry a a b z kalibrační přímky závislosti absorbance na koncentraci ve tvaru:

$$y = ax + b.$$

Dosažením naměřených průměrů absorbancí vzorků (hodnoty y) do dané závislosti jsme vypočítali koncentraci bílkoviny v neznámých vzorcích (hodnoty x). Pokud jsme neznámé vzorky ředili vodou, bylo nutné výslednou koncentraci vynásobit ředěním, abychom získali koncentraci bílkoviny v celém objemu vzorku.

3.4 Štěpení trypsinem

3.4.1 Acetonitrilové extrakty

3.4.1.1 Chemikálie a roztoky

- Hydroxid amonný 32%, Mr 17 g/mol (Merck, kat.č. 1054264000)
- Hydrogenuhličitan amonný, Mr 79,06 g/mol (Sigma-Aldrich, kat.č. 09830)
- Iodoacetamid, Mr 184,96 g/mol (Sigma-Aldrich, kat.č. I1149)
- TCEP-HCl (Tris (2-karboxyethyl) fosfinhydrochlorid), Mr 286,65 g/mol (Thermo-Scientific, kat.č. 20490)
- Štěpící pufr: 100mM NH_4HCO_3

3.4.1.2 Technické vybavení

- Termomixér Comfort 5355 (eppendorf)
- Váhy AX105 (METTLER TOLEDO)

3.4.1.3 Postup

Postup štěpení trypsinem je totožný pro obě metody získání acetonitrilových extraktů (metoda L a B).

Ze vzorků jsme odpipetovali takový objem do eppendorfky, abychom ke štěpení použili přibližně 100 μg bílkoviny. Množství celkové bílkoviny ve vzorcích jsme určili stanovením její koncentrace pomocí Micro BCA kitu. Přítomnou vysokou koncentraci TFA jsme neutralizovali hydroxidem amonným. Ke vzorkům metody L jsme přidali 45 μl 0,1M NH_4OH a ke vzorkům metody B 45 μl 2M NH_4OH , aby výsledné pH bylo zásadité povahy (pH 7-9 dle indikátorového pH papírku). Všechny vzorky jsme poté naředili 150 μl štěpícího pufru. Pro přístupnost proteinů ke štěpení trypsinem bylo potřeba redukovat a alkylovat -S-S- můstky ve vzorku. K redukcí jsme použili 30 μl 100mM TCEP-HCl, jehož koncentrace ve vzorku byla 9,2mM. Reakce probíhala 45 minut při 55 $^{\circ}\text{C}$ v termomixéru, který zajistil konstantní teplotu po celou dobu redukce a zároveň roztok promíchával třepáním. Alkylovali jsme 35 μl 300mM iodoacetamidu v temnu po dobu 45 minut při 30 $^{\circ}\text{C}$. Zde byla koncentrace IAA přibližně třikrát větší než koncentrace TCEP-HCl (konkrétně 29,2mM). Teploty jsme opět docílili vložením vzorků do termomixéru a tmu zajistili překrytím přístroje se vzorky alobalem. Po redukcí a alkylací jsme vzorky naředili 1100 μl

štěpícího pufru a pomocí acidobazického papírku zkontrolovali pH. To se pohybovalo v rozmezí 7-8, protože pro správnou funkci trypsinu je toto pH optimální. Do vzorků jsme napipetovali 1 µg trypsinu v 5 µl rekonstitučního pufru (obsahuje slabou kyselinu octovou, která udržuje trypsin v neaktivním stavu, pokud není celé balení spotřebováno najednou). Trypsin pro štěpení jsme používali v poměru k bílkovině 1:50 – 1:200. Vzorky s přidaným trypsinem jsme inkubovali přes noc při 37 °C za kontinuálního míchání 300 rpm v termomixéru.

3.4.2 Celobuněčné lyzáty

3.4.2.1 Chemikálie a roztoky

- Hydroxid amonný 32%, Mr 17 g/mol (Merck, kat.č. 1054264000)
- Hydrogenuhličitan amonný, Mr 79,06 g/mol (Sigma-Aldrich, kat.č. 09830)
- Iodoacetamid, Mr 184,96 g/mol (Sigma-Aldrich, kat.č. I1149)
- TCEP-HCl (Tris (2-karboxyethyl) fosfinhydrochlorid), Mr 286,65 g/mol (Thermo-Scientific, kat.č. 20490)
- Štěpící pufr: 50mM NH₄HCO₃, 5% ACN ve vodě

3.4.2.2 Technické vybavení

- Termomixér Comfort 5355 (eppendorf)
- Váhy AX105 (METTLER TOLEDO)

3.4.2.3 Postup

Postup štěpení trypsinem je totožný pro obě metody získání celobuněčných lyzátů (metoda Var a FP-8M).

Ze vzorků jsme odpipetovali takový objem do eppendorfky, aby jsme ke štěpení použili přibližně 100 µg bílkoviny. Množství celkové bílkoviny ve vzorcích jsme určili stanovením její koncentrace pomocí Micro BCA kitu. Přidali jsme 200 µl štěpícího pufru a redukovali a alkylovali podle stejného postupu jako u acetonitrilových extraktů (viz kapitola 3.4.1). Vzorky jsme poté naředili štěpícím pufrům do celkového objemu 1 ml a zkontrolovali jsme pH pomocí acidobazických papírků. Pro štěpení jsme přidali 2 µg trypsinu v 10 µl rekonstitučního pufru. Nechali jsme v termomixéru štěpit přes noc při 37 °C za kontinuálního míchání 300 rpm.

3.5 Měření vzorků pomocí LC/MS

3.5.1 Příprava acetonitrilových vzorků

Vzorky pro měření pomocí LC/MS musí obsahovat nízké koncentrace solí. Proto se vzorky upravují odsolením systémem obrácených fází.

3.5.1.1 Chemikálie a roztoky

- Acetonitril pro chromatografii LiChrosolv, Mr 41,05 g/mol (MERCK, kat.č. 114291)
- Kyselina trifluoroctová (TFA), Mr 114,02 (Sigma-aldrich, kat.č. 302031)
- Ekvilibrační roztok: 5% ACN, 0,1% TFA ve vodě
- Eluční roztok: 80% ACN, 0,1% TFA ve vodě
- Pufr A: 2% ACN, 0,1% kyselina mravenčí (FA) ve vodě

3.5.1.2 Technické vybavení

- PepClean C18 Spin kolonky (PIERCE)

3.5.1.3 Postup

Pro odsolení vzorků acetonitrilových extraktů bylo nutné vzorky po štěpení trypsinem přes noc odpařit pomocí vakua. Odparek, který zbyl na dně eppendorfky, jsme rozpustili v 80 µl ekvilibračního pufru a roztřepali, aby se veškerý vzorek ulpělý na stěnách eppendorfky dostal do roztoku.

Pepclean kolonky po nanesení roztoků jsme vždy stáčeli krátce centrifugou. Kolonky jsme navlhčili 200 µl acetonitrilu a třikrát ekvilibrovali 200 µl ekvilibračního pufru. Po ekvilibraci jsme nanесли vzorek, který jsme předem rozpustili v daném pufru. Stočili jsme kolonky na centrifuze a znovu vzorek nanесли do kolonky a stočili. Poté následovalo odsolení vzorku pomocí ekvilibračního pufru, kterým jsme promyli kolonku čtyřikrát po 200 µl. Po odsolení jsme vyměnili eppendorfku pod kolonkou za novou a vzorek eluovali dvakrát elučním roztokem po 20 µl. Pro následnou analýzu hmotnostní spektrometrií bylo nutné vzorek znovu odpařit do sucha pomocí vakua, aby roztok neobsahoval vysokou koncentraci acetonitrilu.

Pro analýzu hmotnostní spektrometrií s předseparačním krokem pomocí kapalinové chromatografie jsme vzorky rozpouštěli v takovém množství pufru A,

aby výsledná koncentrace bílkoviny byla 1 µg/µl. Objem roztoku vzorku jsme přepipetovali do vialek a vložili do autosampleru kapalinového chromatografu.

3.5.2 Příprava celobuněčných lyzátů

Vzorky pro měření pomocí LC/MS musí obsahovat nízké koncentrace solí. Proto se vzorky upravují odsolením systémem obrácených fází.

3.5.2.1 Chemikálie a roztoky

- Acetonitril pro chromatografii LiChrosolv, Mr 41,05 g/mol (MERCK, kat.č. 114291)
- Kyselina trifluoroctová (TFA), Mr 114,02 (Sigma-aldrich, kat.č. 302031)
- Ekvilibrační roztok: 5% ACN, 0,1% TFA
- Eluční roztok: 80% ACN, 0,1% TFA
- Pufr A: 2% ACN, 0,1% kyselina mravenčí (FA) ve vodě

3.5.2.2 Technické vybavení

- Oasis® HLB kolonky (Waters Corporation)

3.5.2.3 Postup

Pro odsolení vzorků celobuněčných lyzátů bylo nutné vzorky po štěpení trypsinem přes noc odpařit pomocí vakua. Odparek, který zbyl na dně eppendorfky, jsme rozpustili v 500 µl ekvilibračního pufru a roztřepali, aby se veškerý vzorek ulpělý na stěnách eppendorfky dostal do roztoku. HLB kolonky se zbavují roztoků pomocí vakua. Kolonky jsme navlhčili 1 ml acetonitrilu a ekvilibrovali 4 ml ekvilibračního pufru. Vzorek jsme tentokrát nanášeli celkem třikrát a poté odsolovali 4 ml ekvilibračního pufru. Eluovali jsme třikrát 66 µl elučního pufru do nové eppendorfky. Vzorek jsme opět odpařili do sucha pomocí vakua.

Pro analýzu hmotnostní spektrometrií s předseparačním krokem pomocí kapalinové chromatografie jsme vzorky rozpouštěli v takovém množství pufru A, aby výsledná koncentrace bílkoviny byla 1 µg/µl. Objem roztoku vzorku jsme přepipetovali do vialek a vložili do autosampleru kapalinového chromatografu.

3.5.3 Nastavení softwaru pro měření

Softwarový program, který jsme použili pro potřeby této diplomové práce, se nazývá MassLynx 4.0 (Waters, USA). Počítač s tímto programem je řídicí jednotkou měření vzorků. Zahrnuje v sobě metodu pro separaci proteinů kapalinovou chromatografií a metodu pro shromažďování dat získaných měřením na hmotnostním spektrometru (DDA, Data Dependent Analysis). Pro vzorky acetonitrilových extraktů jsme použili 80 minutový eluční gradient, pro celobuněčné lyzáty 120 minutový gradient.

Prvním úkonem změření hmotnostního spektra proteinů bylo vložení vzorků do autosampleru kapalinového chromatografu. Jednotlivé vzorky jsme na počítači zapsali do příslušné tabulky. Udávali jsme identifikační číslo měření vzorku, název vzorku, název metody pro hmotnostní spektrometrii, název metody pro kapalinovou chromatografii, pozice vzorků, ze kterých měl autosampler jednotlivé vzorky odebírat a dále analyzovat, množství vzorku, které mělo být odebráno, a názvy programů, které po skončení analýzy zpracovaly surová naměřená data do souboru pkl, který jsme pro vyhodnocení vložili do databázové aplikace Phenyx.

Druhým úkonem analýzy vzorku bylo nastavení podmínek, za kterých jsme chtěli vzorek měřit. Jelikož se přístroj skládá z kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, bylo nutné navolit podmínky pro obě analytické metody pomocí počítače, který umožňuje komunikaci s přístrojem. Základem metody kapalinové chromatografie bylo navolení gradientu mobilní fáze, který se skládal z různých poměrů dvou pufrů. Pufr A byl roztok 2% ACN a 0,1% kyseliny mravenčí (FA) ve vodě, pufr B obsahoval 80% ACN a 0,1% FA ve vodě. Pumpa vytvářela po celou dobu analýzy celkový průtok mobilní fáze 5 μ l/min. Pomocí spliteru se ale k analýze využívalo pouze 250 nl/min, zbytek mobilní fáze odtékal do odpadu. Tab. 5 zaznamenává procentuelní zastoupení pufru B vzhledem k času analýzy.

Tab. 5 Gradient pufru B vzhledem k času analýzy

Čas [min]	0,1	5	8	120	125	138	140
B %	5	5	10	35	90	90	5

Postup dávkování vzorku na kolonu byl následující:

1. Do autosamplerové smyčky se nejprve nadávkoval pufr A, poté příslušné množství vzorku a nakonec další množství pufru A.
2. Přetočením ventilu toto uspořádání ze smyčky putovalo do 10-ti cestného ventilu a odtud přímo na předkolonku Atlantis™ dC18 s velikostí částic 5 µm, NanoEase™ Trap Column (Waters, USA). Vzorek se zachytil na počátku předkolony a promýval se 5 minut pufr A (odsolení).
3. Gradient mobilní fáze trval 120 minut (uvedený v Tab. 4). Postupně se tak jednotlivé peptidy eluovaly z předkolony a putovaly na kolonu Atlantis™ dC18 s velikostí částic 3 µm, 75 µm x 150 mm NanoEase™ Column (Waters, USA). Z kolony vytékaly peptidy s mobilní fází do nanospreje, který je ionizační částí použitého hmotnostního spektrometru.

Po gradientové eluci se procenta pufru B udržovala na vysoké hodnotě po dalších 13 minut, aby se eluovaly všechny peptidy zachycené na předklonce a koloně. Od 140. minuty se promýval celý systém 5% pufr B po dobu 15 minut, aby se zajistila ekvilibrace systému před další analýzou. Celková doba analýzy byla tedy 155 minut.

Metoda hmotnostní spektrometrie zaujímala celkový čas 150 minut. Podmínky pro tuto metodu se odvíjely od uspořádání přístroje. Jednotlivé ionty jsme analyzovali pomocí Q-Q-TOF hmotnostního analyzátoru (quadrupole-quadrupole-time of flight), který je schopný měřit tandemová hmotnostní spektra (MS/MS).

Pro měření jednoduchých spekter analytů jsme používali pouze analyzátoru TOF. Na kvadrupólech Q1 a Q2 jsme nastavili takové napětí, které umožnilo průchod iontů s relativní hmotou m/z 400-1400 až do TOF analyzátoru. Před vstupem do TOF analyzátoru se nachází tzv. pusher. Ten pomocí napětí zachytával nabitě ionty po zvolenou dobu 0,7 s a na konci této doby vypustil ionty do TOF analyzátoru. Následovala 0,1s doba pro regeneraci elektroniky a celý cyklus se opakoval.

Všech tří analyzátorů (Q-Q-TOF) jsme využívali pro měření tandemových hmotnostních spekter, při nichž byly určené ionty fragmentovány pomocí

kolizního plynu (argon) a kolizního napětí v Q2. Splněním následujících podmínek při měření jednoduchého spektra počítač určil ionty, které měly být dále fragmentovány. První podmínkou byla intenzita iontů vyjádřená v jednotkách count/s. Volili jsme hodnotu 15, což jinými slovy znamená, že má-li ion ve spektru intenzitu větší než 15, je dále podroben fragmentaci při měření MS/MS spekter. Další volitelnou podmínkou byly nábojové stavy iontů (charges states). Optimální jsou 2+, 3+ a 4+. Jednou nabitých iontů se jednak ve spektrech vyskytuje mnoho a jednak je interpretace jejich fragmentace složitá, ionty nabité 5krát a vícekrát se objevují velmi zřídka a také pro ně platí, že interpretace jejich fragmentačních spekter je složitá. Důležitou podmínkou bylo také rozmezí, ve kterém se měly vyskytovat izotopické píky iontů, volili jsme okno 2 Da. Nakonec jsme zvolili podmínky samotné fragmentace. Vybrali jsme počet iontů (1 až 8), které měly být nejintenzivnější v daném čase analýzy a které měly být fragmentovány najednou (ve skutečnosti se fragmentovaly ihned po sobě). Vzhledem k množství dat jsme zvolili 5 nejintenzivnějších píků. Rozsah hmot m/z pro MS/MS analýzu jsme zadali 50-1600. Napětí na Q1 přístroj nastavil vždy tak, aby prošel pouze jeden ion o dané hmotnosti do kolizní cely Q2. V kolizní cele pak nastavil kolizní napětí, které záviselo na různých nábojových stavech iontů. Jeden ion byl poté měřen analyzátozem po dobu 1 sekundy s meziskenovým zpožděním 0,1 sekundy. Všechny ionty po průletu TOF analyzátozem dopadaly na detektor MCP (multichannel plate).

3.6 Softwarové zpracování dat

3.6.1 MassLynx

Data získaná z tandemové hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS/MS) obsahovala efektivní hmotnosti m/z a intenzity píků příslušející jak jednotlivým iontům, tak jejich fragmentům. Pomocí počítačového programu MassLynx 4.0 (Waters, USA) se naměřená data zobrazovala jako hmotnostní spektrum všech iontů v závislosti na čase, které se nazývá celkový iontový proud TIC (total ion count). Součástí MassLynx je skript PeptideAuto, pomocí něž se naměřený záznam hmotnostního spektra iontů a jeho fragmentační spektra vyhladil a vycentroval. Pomocí dalšího skriptu se hodnoty extrahovaly do pkl souboru,

který jsme dále vložili do vyhledávací databáze Phenyx verze 2.5.11 (GeneBio, Švýcarsko).

3.6.2 Phenyx

Výsledné pkl soubory vzorků acetonitrilových extraktů (ACN) a celobuněčných lyzátů (WCL) jsme vložili do databáze Phenyx a nechali vyhledávat proti databázím LVSrandom a SchuS4, které jsme získali na Internetu z databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information). Volili jsme odlišná kritéria pro vyhledávání podle toho, zda se jednalo o vzorky ACN extraktů nebo WCL lyzátů.

U ACN extraktů jsme v prvním kole volili následující parametry: náboj iontů 2+, 3+, 4+; tolerovaná chyba měření 80 ppm; enzym trypsin s maximálně 1 chybným štěpením; normální štěpící mód (trypsin štěpí specificky na obou koncích proteinu); variabilní oxidace methioninu; fixní karbamidomethylace cysteinu; minimální z-skóre peptidu 4; peptidová p-hodnota maximálně $1 \cdot 10^{-4}$; minimální délka peptidu 6 aminokyselin; minimální AC skóre 4; minimální pokrytí peptidové sekvence 20 %; záznam iontů b, b++, y a y++; tolerance chyby 0,8 Da. Ve druhém kole jsme volili tyto parametry: náboj iontů 2+, 3+, 4+; tolerovaná chyba měření 80 ppm; enzym trypsin s maximálně 2 chybnými štěpeními; povoleno poloviční štěpení (trypsin štěpí na jednom konci peptidu specificky, na druhém nespecificky); variabilní oxidace methioninu; fixní karbamidomethylace cysteinu; variabilní deamidace kyseliny glutamové a asparagové; minimální z-skóre peptidu 4; peptidová p-hodnota maximálně $1 \cdot 10^{-3}$; minimální délka peptidu 6 aminokyselin; minimální AC skóre 4.

U WCL lyzátů jsme v prvním kole volili následující parametry: náboj iontů 2+, 3+; tolerovaná chyba měření 300 ppm; enzym trypsin s maximálně 1 chybným štěpením; normální štěpící mód (trypsin štěpí specificky na obou koncích proteinu); variabilní oxidace methioninu; fixní karbamidomethylace cysteinu; minimální z-skóre peptidu 5; peptidová p-hodnota maximálně $1 \cdot 10^{-6}$; minimální délka peptidu 6 aminokyselin; minimální AC skóre 4; minimální pokrytí peptidové sekvence 20 %; záznam iontů b, b++, y a y++; tolerance chyby 0,4 Da. Ve druhém kole jsme volili tyto parametry: náboj iontů 2+, 3+; tolerovaná chyba měření 300 ppm; enzym trypsin s maximálně 3 chybnými štěpeními; povoleno poloviční štěpení (trypsin štěpí na jednom konci peptidu

specificky, na druhém nespécificky); variabilní oxidace methioninu; fixní karbamidomethylace cysteinu; variabilní deamidace kyseliny glutamové a asparagové; variabilní vznik pyroglutamové kyseliny; minimální z-skóre peptidu 5; peptidová p-hodnota maximálně $1 \cdot 10^{-5}$; minimální délka peptidu 6 aminokyselin; minimální AC skóre 4.

Výše popsané parametry pro jednotlivé typy vzorků jsou pro přehlednost uvedeny v Tab. 6.

Tab. 6 Parametry vzorků pro vyhledávání v databázi Phenyx

Parametry	ACN (metoda L, B)	WCL (metoda Var, FP-8M)
<i>První kolo vyhledávání</i>		
Parent charge	2+, 3+, 4+	2+, 3+
Parent ion error tolerance	80 ppm	300 ppm
Enzyme	trypsin	trypsin
Max missed cleavage	1	1
Cleavage mode	normal	normal
Modification	Oxidation_M (variable) Cys_CAM (fixed)	Oxidation_M (variable) Cys_CAM (fixed)
Min peptide z-Score	4	5
Max peptide p-Value	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Min peptide length	6	6
Min AC score	4	4
Turbo scoring	20% cvg 0,8Da (b, b++, y, y++)	20% cvg 0,4Da (b, b++, y, y++)
<i>Druhé kolo vyhledávání</i>		
Parent charge	2+, 3+, 4+	2+, 3+
Parent ion error tolerance	80 ppm	300 ppm
Enzyme	trypsin	trypsin
Max missed cleavage	2	3
Cleavage mode	half cleaved	half cleaved
Modification	Oxidation_M (variable) Cys_CAM (fixed) DEAMID (variable)	Oxidation_M (variable) Cys_CAM (fixed) DEAMID (variable) PYRR (variable)
Min peptide z-Score	4	5
Max peptide p-Value	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Min peptide length	6	6
Min AC score	4	4
Turbo scoring	NO	NO

Na základě těchto zvolených kritérií Phenyx porovnal naměřená data s vybranou databází, identifikoval peptidy v měřeném vzorku a zařadil je k příslušným proteinům. K proteinům a peptidům také přiřadil informace, které je od sebe odlišují. V Tab. 7 jsou uvedeny parametry proteinů a jejich význam, které jsme dále používali při zpracování výsledků. Tab. 8 vysvětluje význam parametrů pro peptidy.

Tab. 7 Přehled parametrů proteinů v databázi Phenyx

Název parametru proteinu	Význam
Databank	Název databáze, se kterou se porovnávají naměřená data
AC	Identifikátor proteinu podle internetové databáze NCBI
ID	Další identifikátor proteinu podle internetové databáze NCBI
Score	Hodnota přiřazená skórovacím systémem Phenyxu celkově za protein
Valid pept seq	Počet unikátních sekvencí peptidů připadajících na daný protein
Valid pept	Počet validovaných peptidů připadající na daný protein
Pept	Celkový počet peptidů připadající na daný protein
Cov	Procento pokrytí sekvence proteinu identifikovanými peptidy
Description	Název proteinu

Tab. 8 Přehled parametrů peptidů v databázi Phenyx

Název parametru peptidu	Význam
Sequence	Aminokyselinová sekvence peptidu
Modifs	Modifikace peptidové sekvence s určením místa změny
z	Náboj peptidu
m/z	Efektivní hmotnost peptidu
z-score	Hodnota přiřazená skórovacím systémem Phenyxu pro peptid
Intensity	Intenzita píku ve spektru odpovídající danému peptidu
DB matches keys	Klíč k určení, ke kterému proteinu daný peptid patří

Dalšími parametry pro protein jsou hodnota izoelektrického bodu (pI) a molekulová hmotnost (mass).

3.6.3 DataProt

DataProt je databázová aplikace, jenž byla vytvořena pro účely uchování dat o laboratorní činnosti, která se zabývá výzkumem v oblasti proteinů a peptidů. Má několik základních funkcí. Uživatel si může zadat do této databáze názvy svých protokolů, vzorků a údaje o daném měření (identifikátor z programu MassLynx). Další data o proteinech a peptidech v daném vzorku se do databáze importují pod příslušná měření. Tato data lze načíst ze souboru typu xls, který je výsledkem exportu vyhledávání v databázi Phenix. Hlavní funkcí je vyhledávání informací v databázi na základě parametrů, které uživatel požaduje.

Zadáním parametrů hledání jsme vybrali požadovaná data do tabulky, kterou jsme následně exportovali do nového souboru formátu csv, který je kompatibilní s tabulkovým procesorem MS Excel. MS Excel nabízí velkou škálu funkcí pro dodatečnou práci s daty. V našem případě se nejvhodnějšími nástroji staly automatický filtr a kontingenční tabulka. Pokud jsme správně nedefinovali položky, se kterými jsme chtěli pracovat, nebo jsme vytvořili vhodnou strukturu kontingenční tabulky, v relativně krátkém čase jsme získali požadované výsledky. Bez těchto funkcí by konečné zpracování dat bylo časově velmi náročné.

3.6.4 UniProt

Metodou mnohočetného srovnávání v proteinové databázi UniProt jsme srovnávali vybrané proteinové sekvence jednu po druhé mezi různými organismy (např. bakteriemi odlišných kmenů). Jednotlivé bakteriální kmeny s jejich sekvencí proteinu jsou v této databázi vypisovány v řádcích pod sebou. Sekvence jsou vyjádřeny řetězcem jednopísmenných názvů AMK. Srovnání sekvencí jednoho proteinu odhalila odlišná sekvenční místa (zastoupení různými aminokyselinami). Záměny AMK mohou proteiny resp. peptidy učinit identifikačními a typizačními markery odlišující jednotlivé kmeny bakterií mezi sebou.

4 VÝSLEDKOVÁ ČÁST

Analyzovala jsem proteiny a peptidy bakterií *Francisella tularensis holarctica* kmene LVS a *Francisella tularensis tularensis* kmene Schu S4. K získání těchto typizačních markerů z bakteriálních buněk jsem použila metody přípravy vzorků pomocí acetonitrilové extrakce a celobuněčné lyzáty. Po stanovení koncentrace bílkoviny ve vzorcích jsem proteiny štěpila proteolytickým enzymem trypsinem. Získala jsem tak peptidy, které jsem po odsolení analyzovala pomocí HPLC-MS/MS.

Porovnáním naměřených dat se sekvencemi proteinů uloženými ve vyhledávací databázi Phenyx jsem identifikovala jednotlivé peptidy nalezené ve vzorcích, které byly přiřazeny k proteinům podle informací v databázi. Po vložení výsledků z Phenyxu do databázové aplikace DataProt jsem si vytvořila seznamy proteinů a peptidů na základě vyhledávacích parametrů. Výsledné soubory jsem exportovala v podobě, která je kompatibilní s MS Excel. Použitím funkcí, jež MS Excel poskytuje, jsem dále dohledala seznam proteinů a peptidů na základě vybraných kritérií.

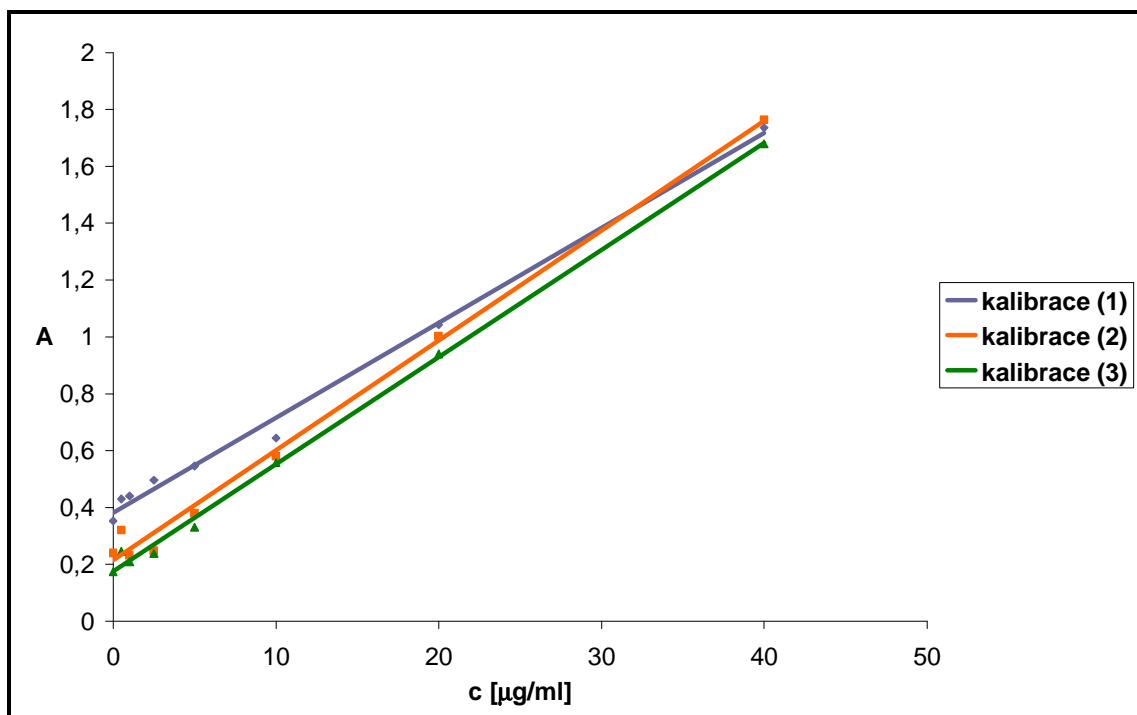
Metodou mnohočetného srovnávání jsem porovnávala vybrané proteinové sekvence mezi odlišnými bakteriálními kmeny *Francisella tularensis*. Srovnání sekvencí odhalila místa, v nichž se vyskytují odlišné aminokyseliny v závislosti na kmenu dané bakterie.

4.1 Stanovení koncentrace bílkoviny

Celkový obsah bílkoviny ve vzorcích acetonitrilových extraktů a celobuněčných lyzátů jsem stanovovala pomocí MicroBCA kitu. Všechny vzorky použité k vyhodnocení výsledků jsem změřila ve třech skupinách. Každá skupina měření má vlastní kalibrační přímku (Graf 1). Tab. 9 udává rovnice regrese a hodnotu spolehlivosti R pro jednotlivé kalibrační přímky. Vzorky ke změření bílkoviny a vzorky kalibrační řady standardního proteinu BSA jsem připravila vždy ve dvojicích. Jejich absorbanci jsem měřila na spektrofotometru Hélios Gamma. Tento spektrofotometr je schopný podle změřených absorbancí kalibrační řady vypočítat kalibrační parametry a a b závislosti absorpance na koncentraci ve tvaru:

$$y = ax + b.$$

Dosažením naměřených průměrů absorbancí vzorků (hodnoty y) vypočítá koncentraci bílkoviny v neznámých vzorcích (hodnoty x) vyjádřenou v $\mu\text{g/ml}$. Pokud jsem neznámé vzorky ředila vodou, vynásobila jsem výslednou koncentraci ředěním, abych získala koncentraci bílkoviny v původním vzorku. Koncentraci vyjádřenou v $\mu\text{g/ml}$ jsem nakonec převedla do jednotek mg/ml . Tab. 10 shrnuje názvy vytvořených vzorků, ve kterém protokolu byly vytvořeny, z které bakteriální kultury byly zhotoveny (LVS, Schu S4) a která metoda extrakce byla u nich použita (ACN L, ACN B, WCL Var, WCL FP-8M). K jednotlivým vzorkům přísluší průměrná koncentrace c v jednotkách mg/ml , která je průměrnou hodnotou vypočtených koncentrací změřených dvojic vzorků na spektrofotometru vynásobená příslušným ředěním.



Graf 1 Kalibrační přímky stanovení koncentrace bílkoviny v neznámých vzorcích

Tab. 9 Rovnice kalibračních přímek

Kalibr. přímka	(1)	(2)	(3)
Rovnice regrese	$y = 0,03341x + 0,3808$	$y = 0,03862x + 0,2139$	$y = 0,03768x + 0,1746$
Hodnota spolehlivosti R	0,9941	0,9931	0,9974

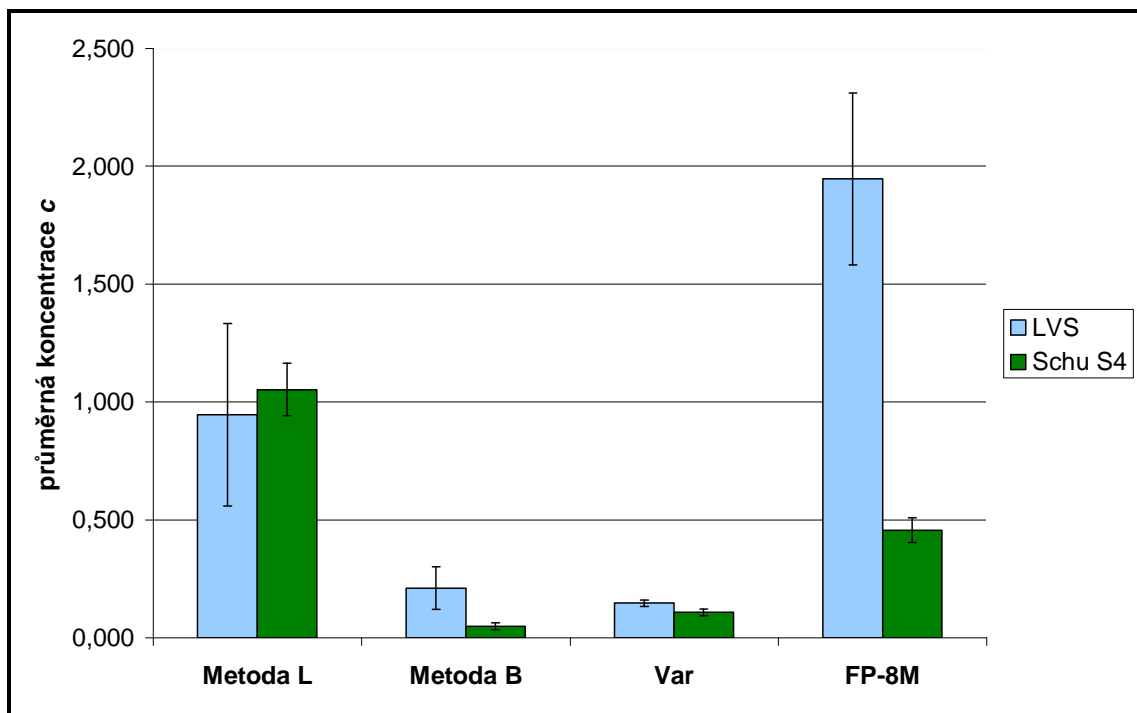
Tab. 10 Seznam vzorků a jejich průměrná naměřená koncentrace bílkoviny

Bakt. kultura	Kalibr. přímka	Název protokolu	Popis vzorku	Název vzorku	Průměrná konc. c [mg/ml]	IDMass Spec		
<i>F. tularensis holarctica</i> LVS	(1)	JU080421	WCL	WCL B	2,54	Q09-03208		
	(2)	JU081020	ACN metoda L	L1	0,9927	Q08-12061		
				L2	0,4151	Q08-12062		
				L3	0,8767	Q08-12108		
				L4	1,5010	Q08-12111		
			ACN metoda B	B1	0,1523	Q09-03243		
				B2	0,1670	Q08-12057		
				B3	0,1570	Q08-12056		
				B4	0,3674	Q08-12054		
		JU081103	WCL metoda Var	A1	0,1551	Q08-11092		
				B1	0,1553	Q08-11093		
				C1	0,1547	Q08-11094		
				D1	0,1235	Q08-12106		
			WCL metoda FP-8M	B2	1,648	Q08-11076		
				C2	1,955	Q08-11078		
		<i>F. tularensis tularensis</i> Schu S4	(3)	JU081125	ACN metoda L	A1	1,001	Q09-03037 Q09-03046
						B1	0,957	Q08-12136
						C1	1,202	Q08-12138
						D1	0,933	Q08-12140
E1	1,172					Q09-13076		
ACN metoda B	A2				0,0495	Q08-12144		
	B2				0,0674	Q08-12146		
	C2				0,0230	Q08-12148		
	D2				0,0411	Q08-12150		
	E2				0,0614	Q09-03245		
WCL metoda Var	A3				0,111	Q08-12155		
	B3				0,123	Q09-03247		
	C3				0,101	Q09-03092		
	D3				0,120	Q08-12161		
	E3				0,0824	Q09-03013 Q09-03022		
WCL metoda FP-8M	A4				0,512	Q09-03249		
	B4				0,386	Q09-03251		
	C4				0,436	Q09-03253		
	D4				0,523	Q09-03035 Q09-03044		
	E4				0,428	Q09-03090		

WCL – celobuněčný lyzát

ACN – acetonitrilový extrakt

Acetonitrilové extrakty jsem získala metodami L a B (viz kapitola 3.2.1), celobuněčné lyzáty metodami Var a FP-8M (viz kapitola 3.2.2). Do grafu jsem vynesla průměrnou hodnotu z průměrných koncentrací bílkovin *c* (viz Tab. 10), a to v závislosti na metodě extrakce a bakteriální kultuře. Výsledkem je Graf 2, který srovnává výtěžnosti vzorků podle těchto metod jak pro LVS, tak pro Schu S4. Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku průměrných hodnot koncentrací.



Graf 2 Srovnání výtěžnosti vzorků podle metod – porovnání *Francisella tularensis* LVS a *Francisella tularensis tularensis* Schu S4

4.2 Měření na hmotnostním spektrometru

Všechny vzorky jsem měřila na hmotnostním spektrometru v uspořádání HPLC-ESI/Q-TOF. Pomocí počítačového programu MassLynx 4.0 (Waters, USA) jsem nastavila parametry měření (viz kapitola 3.5.3). Každý vzorek má v programu nadefinovaný název, metodu kapalinové chromatografie, metodu analýzy hmotnostním spektrometrem a identifikační označení daného měření vzorku (IDMassSpec), které je uvedeno v Tab. 10 (vzorky, které mají dva IDMassSpec, byly měřeny dvakrát a obě měření byly použity pro následné vyhodnocení dat).

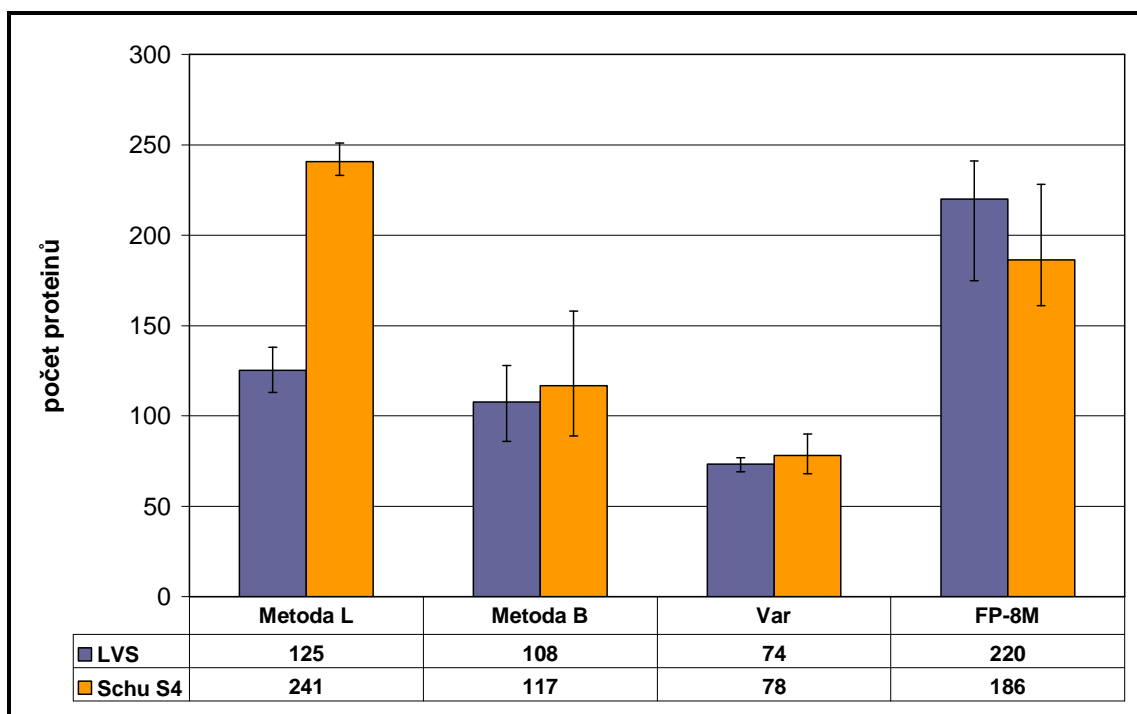
Měření vzorků na HPLC-ESI/Q-TOF jsem získala surová data, která jsem nechala zpracovat pomocí dalších počítačových programů. Výsledkem

byly soubory ve formátu pkl (viz kapitola 3.6), jež jsem použila k identifikaci proteinů a peptidů ve vyhledávací databázi Phenyx.

4.3 Vyhledávací databáze Phenyx

Každým měřením vzorků na HPLC-ESI/Q-TOF (označení viz Tab. 10) jsem získala soubory ve formátu pkl (viz kapitola 3.6), které jsem načetla do vyhledávacího programu Phenyx. Porovnávala jsem tak naměřená data s teoretickými, které jsou obsažené v použité databázi. Některé vzorky jsem měřila na hmotnostním spektrometru vícekrát a oba soubory pkl nechala porovnávat zároveň. Výsledkem porovnávání na základě zvolených parametrů (viz kapitola 3.6.1) byl seznam proteinů identifikovaných ve vzorku a k nim příslušející seznam peptidů.

Od každé metody přípravy vzorků jsem vytvořila určitý počet replikátů (viz Tab. 10). V každém replikátu daného postupu byl identifikován jiný počet proteinů. Graf 3 znázorňuje průměrnou hodnotu počtu proteinů identifikovaných Phenyxem ve všech vzorcích zhotovených danou metodou. Chybové úsečky znázorňují minimální a maximální počet identifikovaných proteinů.



Graf 3 Průměrný počet proteinů identifikovaných danou metodou – porovnání *Francisella tularensis holarctica* LVS a *Francisella tularensis tularensis* Schu S4

4.4 Zpracování dat pomocí DataProtu

Exportem výsledků vyhledávání v databázi Phenyx jsem získala řadu souborů typu xls (MS Excel), které jsem načetla pod příslušná měření vzorků v DataProtu. Zadáním parametrů hledání jsem vybrala požadovaná data do tabulky, kterou jsem následně exportovala do nového souboru formátu csv, který je kompatibilní s tabulkovým procesorem MS Excel.

Počet vzorků *Francisella tularensis holarctica* LVS získaných všemi metodami přípravy byl 16. Počet vzorků *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 získaných všemi metodami přípravy byl 20.

V Tab. 11 jsou uvedeny parametry, které jsem zadala do DataProtu pro vyhledání seznamu proteinů identifikovaných ve všech vzorcích ze všech metod přípravy vzorků (parametry pro proteiny jsou vysvětleny v kapitole 3.6.1). Z těchto dat jsem vytvořila kontingenční tabulky, zvláště pro LVS a Schu S4. Výsledkem kontingenčních tabulek byl seznam proteinů a k nim příslušný počet unikátních peptidů (ValidPeptSeq) v každém vzorku. Z tohoto seznamu jsem vybrala pouze ty proteiny, které se vždy vyskytují ve vzorcích, a to bez ohledu na použitou metodu (příloha A a B). Seznam obsahuje AC a IDNCBI proteinu, název proteinu a počet unikátních peptidů identifikovaných v jednotlivých vzorcích pro každý postup (hodnoty počtu unikátních peptidů v jednotlivých vzorcích odděleny čárkou).

Tab. 11 Parametry pro vyhledání seznamu proteinů v DataProtu

Měření	IDMassSpec (identifikační číslo generované programem MassLynx)
Protein	AC
	IDNCBI
	ValidPeptSeq
	Description

Seznam peptidů identifikovaných ve všech vzorcích ze všech postupů jsem vytvořila pomocí kontingenční tabulky vytvořené z dat, které mi poskytl DataProt. Tab. 12 obsahuje zadané parametry pro vyhledání informací v DataProtu (parametry pro proteiny a peptidy jsou vysvětleny v kapitole 3.6.1). Jelikož kontingenční tabulka vytvořená v MS Excel nebyla schopná pojmout velké množství dat, které obsahoval výpis všech peptidů ze všech vzorků nezávisle na metodě, použila jsem v DataProtu omezující podmínky pro výběr

peptidů. Omezujícími podmínkami byl výběr pouze těch proteinů, které byly identifikovány ve všech vzorcích (viz seznam v přílohách A a B). Z takto zúžených dat byl MS Excel již schopný vytvořit kontingenční tabulku. Výsledný seznam peptidů vytvořený tímto postupem se nachází v přílohách C a D. Seznam obsahuje AC proteinu, název proteinu, AMK sekvenci (vyjádřená jednopísmennými názvy AMK), modifikaci peptidu, náboj z, průměrnou experimentální efektivní hmotnost peptidu m/z_{EXP} . (vytvořená z hodnot m/z ze všech vzorků) a teoretickou efektivní hmotnost peptidu m/z_{TEOR} . (vypočítáno pomocí Proteomics Toolkit [51]). Pro peptidy, které mají modifikaci, jsem použila k výpočtu m/z_{TEOR} . jak Proteomics Toolkit, tak relativní atomové hmotnosti prvků získané z NIST (National Institute of Standards and Technology [52]). Jelikož jedinou nalezenou modifikací byla deamidace v poloze 1, vypočetla jsem pomocí NIST záměnu skupiny $-NH_2$ za skupinu $-OH$. Hodnotu 0,98401 jsem poté v Proteomics Toolkit přičetla k požadované sekvenci a získala tak molekulovou hmotnost peptidu s danou modifikací.

Tab. 12 Parametry pro vyhledání seznamu peptidů v DataProtu

Měření	Identifikační číslo generované programem MassLynx (IDMassSpec)
Protein	AC
	Description
Peptid	SequencAMK
	Modifs
	z
	m/z

Stejnými postupy, jakými byly vyhledány seznamy proteinů a peptidů identifikovaných ve všech vzorcích, jsem vyhledala seznam proteinů a peptidů, které se vyskytují v 80 % vzorků nezávisle na použité metodě jejich přípravy. Opět zvlášť pro LVS a Schu S4. Výsledné seznamy obsahují tytéž údaje jako seznamy uvedené v přílohách A, B a C, D. Přílohy E a F obsahují seznamy proteinů LVS a Schu S4 vyskytujících se v 80 % všech vzorků a přílohy G a H obsahují seznamy peptidů LVS a Schu S4.

4.5 Porovnávání sekvencí proteinů pomocí metody mnohočetného srovnávání v UniProtu

Metodou mnohočetného srovnávání v proteinové databázi UniProt jsem porovnála proteinové sekvence mezi odlišnými bakteriálními kmeny *Francisella tularensis* (90% shoda sekvencí). Porovnávanými sekvencemi proteinů byly proteiny uvedené v přílohách A, B (proteiny vyskytující se ve všech vzorcích, zvláště pro LVS a Schu S4) a E, F (proteiny vyskytující se v 80 % vzorků, zvláště pro LVS a Schu S4). Kmeny *Francisella tularensis*, které jsem zahrnula do porovnávání, jsou následující:

- *Francisella tularensis holarctica* LVS
- *Francisella tularensis holarctica* FSC022
- *Francisella tularensis holarctica* OSU18
- *Francisella tularensis holarctica* FTA
- *Francisella tularensis tularensis* FSC237 (pozn. Jedná se o kmen Schu S4)
- *Francisella tularensis tularensis* FSC198
- *Francisella tularensis tularensis* FSC033
- *Francisella tularensis tularensis* WY96-3418
- *Francisella tularensis mediasiatica* FSC147
- *Francisella tularensis novicida* U112

Přílohy I a J obsahují výsledek porovnání sekvencí proteinů získaných metodou mnohočetného srovnání v UniProtu, které byly identifikovány ve všech vzorcích, a to zvláště pro LVS a Schu S4. V Tab. 13 jsou souhrnně vypsány sekvence peptidů z příloh I a J, jejich náboj, teoretickou efektivní hmotnost, identifikátor databáze UniProt (FTL pro LVS, FTT pro Schu S4) a určuje pracovní označení těchto sekvencí. Tab. 14 poté uvádí odlišné AMK v sekvencích peptidů u jednotlivých porovnávaných kmenů *Francisella tularensis* (označení sekvencí peptidů s těmito odlišnými AMK je uvedeno v Tab. 13).

Tab. 13 Seznam sekvencí peptidů, jejich pracovní označení, náboj, teoretická m/z a identifikátor databáze UniProt, které se vyskytují ve všech vzorcích

Označení sekvence	Sekvence	z	m/z _{TEOR.}	UniProt
1	G G VG F ANVQDIFETSPLGK	2	968,49476	FTL_0009
2	DAVEGTPF T VK	2	582,30137	FTL_1745 FTT0143
3	A IVEPLVTLAK	2	577,36377	FTT0351
4	DLLP I LEGVSK	2	592,35086	FTT1696

Tab. 14 Rozdíly v sekvencích peptidů z Tab. 13 podle kmenů *Francisella tularensis*, které se vyskytují ve všech vzorcích

Název kmenu <i>Francisella tularensis</i>	Označení sekvence			
	1	2	3	4
LVS	G	T	T	I
FSC022	G	I	T	I
OSU18	G	T	T	I
FTA	G	T	T	I
FSC237	G	T	A	I
FSC198	G	T	A	I
FSC033	G	T	T	I
WY96-3418	R	T	T	I
FSC147	G	T	T	I
U112	G	T	T	V

Přílohy K a L obsahují výsledek porovnání sekvencí proteinů získaných metodou mnohočetného srovnání v UniProtu, které byly identifikovány v 80 % vzorků, zvláště pro LVS a Schu S4. V Tab. 15 jsou souhrnně vypsány sekvence peptidů z příloh K a L, jejich náboj, teoretickou efektivní hmotnost, identifikátor databáze UniProt (FTL pro LVS, FTT pro Schu S4) a určuje pracovní označení těchto sekvencí. Tab. 16 poté uvádí odlišné AMK v sekvencích peptidů u jednotlivých porovnávaných kmenů *Francisella tularensis* (označení sekvencí peptidů s těmito odlišnými AMK je uvedeno v Tab. 15).

Tab. 15 Seznam sekvencí peptidů, jejich pracovní označení, náboj, teoretická m/z a identifikátor databáze UniProt, které se vyskytují v 80 % vzorků

Označení sekvence	Sekvence	z	m/z _{TEOR.}	UniProt
1	GGVGFANVQDIFETSPLGK	2	968,49476	FTL_0009
2	MASDDADAFKDALIK	2	805,89075	
3	DASQAADILVNK	2	622,82828	FTL_1494
4	ALDGLTGENDDQNHGIALLR	3	708,02289	FTL_1714
	ALDGLTGENDDQNYGIALLR	2	1074,53261	FTT1696
5	DLLPILEGVSK	2	592,35086	FTL_1714
	DLLPILEGVSK	3	395,23653	FTT1696
6	DAVEGTPFTVK	2	582,30137	FTL_1745 FTT0143
7	VAAEILEAVEGR	2	628,84648	FTT0322
8	VSFGEFGLQATSR	2	699,85483	FTT0332
9	AIVEPLVTLAK	2	577,36377	FTT0351
10	ISNIRDLLPILEGVSK	3	589,6846	FTT1696
11	SFGTPTITK	2	476,26152	FTT1696

Tab. 16 Rozdíly v sekvencích peptidů z Tab. 15 podle kmenů *Francisella tularensis*, které se vyskytují v 80 % vzorků

Název kmenu <i>Francisella tularensis</i>	Označení sekvence										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
LVS	G	I	A,I	H	I	T	V	FGL	T	I	A
FSC022	G	T	A,I	H	I	I	V	---	T	I	A
OSU18	G	I	A,I	H	I	T	L	FGL	T	I	A
FTA	G	I	A,I	H	I	T	V	FGL	T	I	A
FSC237	G	T	A,T	Y	I	T	V	FGL	A	I	T
FSC198	G	T	A,T	Y	I	T	V	FGL	A	I	T
FSC033	G	T	A,T	Y	I	T	V	---	T	I	T
WY96-3418	R	T	A,T	H	I	T	V	FGL	T	I	A
FSC147	G	T	V,T	H	I	T	V	FGL	T	I	A
U112	G	T	A,T	H	V	T	V	FGL	T	V	A

V příloze M a N jsem uvedla příklad porovnání sekvencí proteinu Chaperone protein, groEL (gi|89256983/FTL_1714; gi|56708705/FTT1696) pomocí metody mnohočetného srovnání UniProtom. V příloze N je uveden název kmenu a k němu příslušný identifikátor, který je vygenerován UniProtom, a název proteinu, který pro jednotlivé kmeny nemusí být stejný (dáno 90% shodou sekvencí). V příloze M jsem odlišnými barvami vyznačila pokrytí proteinové sekvence peptidy, které se mi podařilo identifikovat pomocí MS/MS. Kmen LVS má identifikátor P94798, kmen Schu S4 má identifikátor Q5NEE1.

5 DISKUZE

Identifikovat a detekovat bakterie patogenní pro člověka lze několika způsoby na základě různých principů. Klasické postupy zahrnují identifikace bakterií podle mikrobiologické kultivace, biochemických vlastností nebo imunologické detekce bakteriálních komponent (např. metodou ELISA). V posledních letech se rozvíjejí molekulární metody analýzy DNA nebo proteinů.

Také proteomika hraje významnou roli v oblasti identifikace a typizace bakterií. Snaží se odhalit význam bakteriálních proteinů ve virulenci bakterií a studuje průběh patologických pochodů souvisejících s onemocněním nebezpečným pro člověka. Stejně tak se bakteriální proteomika zabývá i možnostmi vyvinout rychlé a spolehlivé metody identifikace bakterií na principu identifikace specifických bakteriálních proteinů a peptidů.

Tato diplomová práce je součástí projektu Evropské obranné agentury (EDA) „Establishment and management of a common database of B agents - A European Laboratory Biodefence Network“, který má za úkol shromáždit identifikační a typizační znaky vybraných bakterií, a to jak na úrovni DNA, tak na úrovni proteinů. Na proteinové úrovni je vedle metody MALDI-TOF v projektu zahrnuta i metodologie využívající tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). Tuto metodu jsem použila při vypracování diplomové práce.

Vytvořila jsem série vzorků podle čtyř různých metod přípravy. Metody L a B jsem použila jako označení pro acetonitrilové extrakty (ACN), metody Var a FP-8M pak pro celobuněčné lyzáty (WCL) (viz Tab. 10).

Stanovením koncentrace bílkoviny ve vzorcích jsem získala hodnoty, z nichž jsem vytvořila graf výtěžnosti vzorků (viz Graf 2). Graf srovnává průměrné hodnoty koncentrací naměřené v sérii vzorků jednotlivých metod v závislosti na kmenu bakterie *Francisella tularensis* (*holarctica* LVS a *tularensis* Schu S4). Chybové úsečky v tomto grafu znázorňují směrodatnou odchylku průměrných hodnot koncentrací. Na základě tohoto grafu lze říci, že z kmene LVS se podařilo extrahovat vyšší koncentraci proteinů než z kmene Schu S4. To mohlo být způsobeno tím, že kmen LVS roste snadněji při

kultivačních podmínkách, které jsem zvolila. Kmen Schu S4 z nejasných příčin nemusí za dobu 24 hodin vůbec narůst nebo jen velmi málo. Zároveň lze z grafu usuzovat, že metody L a FP-8M jsou vhodnějšími metodami pro získání většího množství proteinů z bakteriálních buněk než metody B a Var.

Pro měření vzorků tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) jsem odebírala pouze určité množství z celkového objemu vzorku, které odpovídalo kapacitě chromatografické kolony. Hodnoty naměřené pomocí MS/MS jsem nechala zpracovat počítačovými programy (viz kapitola 4.2) a získané soubory ve formátu pkl načetla do vyhledávacího programu Phenyx. Ten je schopný porovnat naměřené hodnoty s hodnotami teoretickými na základě zvolených parametrů (viz Tab. 6). Získala jsem tak seznam proteinů a peptidů identifikovaných v jednotlivých vzorcích. Průměrné počty proteinů ve vzorcích daného postupu v závislosti na kmenu bakterie (LVS a Schu S4) jsem vynesla do grafu 3. Chybové úsečky zde znázorňují minimální a maximální počet identifikovaných proteinů. Z tohoto grafu lze říci, že ve většině případů se podařilo získat větší počet různých proteinů z kmene Schu S4. Výjimkou je metoda FP-8M, kde převažuje počet proteinů LVS. I v tomto případě metody L a FP-8M poskytují větší počet identifikovaných proteinů. Konkrétně z metod L a FP-8M bylo průměrně získáno dvakrát více proteinů než z metod B a Var.

Obecně lze tedy říci následující. Z metod ACN je pro získání proteinů vhodnější metoda L, která k extrakci používá vodný roztok 70% ACN s 0,5% TFA (viz kapitola 3.2.1), než metoda B. Konkrétně metodou L bylo průměrně získáno 1,6krát více proteinů než metodou B. Z metod WCL je pro získání proteinů vhodnější metoda FP-8M než Var (viz kapitola 3.2.2). Opět konkrétně metodou FP-8M bylo průměrně získáno 2,7krát více proteinů než metodou Var.

Podrobnější informace o identifikovaných proteinech a peptidech ve vzorcích jsem exportovala z Phenyxu do souboru formátu xls. Za pomoci databázové aplikace DataProt a nástrojů MS Excel (automatický filtr, kontingenční tabulka) jsem uspořádala toto velké množství dat tak, že bylo relativně snadné získat požadované výsledky.

Zajímala jsem se, kolik různých proteinů se vyskytlo ve všech vzorcích nezávisle na metodě přípravy vzorků (ACN i WCL). Ve vzorcích připravených z kmene LVS se objevilo 12 proteinů, ve vzorcích ze Schu S4 18 (příloha A

a B). Pro jednotlivé proteiny jsem do tabulky uvedla také počty unikátních peptidů získaných jednotlivými metodami, které jsem vypsala jednoduše vedle sebe. Zajímavostí je, že pro některé proteiny je více peptidů identifikovaných metodou Var než FP-8M, i když je podle předešlých výsledků výhodnější metoda FP-8M. Příkladem je „outer membrane protein“ LVS (gi|89255458), jenž metodou Var poskytuje v průměru asi 15 peptidů, ale metodou FP-8M v průměru asi 5 peptidů. Množství identifikovaných proteinů souvisí jednak s jejich uvolněním do roztoku, ale také s jejich přístupností pro tryptické štěpení. Z výsledků se zdá, že metoda FP-8M lépe uvolňuje proteiny do roztoku, proto je jejich celkové množství větší. Metoda Var však určité proteiny lépe denaturuje. Proto by zřejmě bylo vhodné pokusit se v dalších studiích zkombinovat oba postupy přípravy WCL. Bylo by ovšem nutné postup řádně promyslet, protože pokud by se použil stejný pufr jako v případě metody FP-8M (8M močovina), tak by při zahřátí na 95 °C mohlo dojít k modifikaci proteinů močovinou. Je tedy otázkou, zda tento pufr nenahradit nějakým jiným pufrům, nebo jestli nejdříve vzorek zahřát a teprve pak přidávat pufr obsahující močovinu.

Dále jsem hledala peptidy, které se vyskytly ve všech vzorcích nezávisle na metodě přípravy vzorků. Úvahou, že pokud je protein identifikovaný ve všech vzorcích, tak hledané peptidy vyskytující se také ve všech vzorcích mohou pocházet pouze z těchto proteinů, jsem vytvořila seznam peptidů LVS a Schu S4 identifikovaných ve všech vzorcích (viz kapitola 4.4). Přílohy C a D obsahují tyto seznamy. Nalezla jsem 12 peptidů LVS a 16 peptidů Schu S4.

K nalezení identifikačních a typizačních markerů jsem poté použila metodu mnohonásobného srovnání v UniProtu (viz kapitola 4.5). Objevila jsem celkem 4 odlišné sekvence peptidů (z celkových 12), které u různých kmenů *Francisella tularensis* pokrývaly rozdílná místa proteinů (zastoupená různými AMK) (viz Tab. 13). Jednotlivé odlišnosti souhrnně uvádí Tab. 14.

Celkový počet nalezených markerů (4 odlišné sekvence peptidů) pocházejících z tak velkého množství bílkovin, které bakterie obsahují, se mi zdál nedostačující pro robustní identifikaci bakteriálních kmenů. Zkusila jsem tedy ty samé postupy pro vyhledání markerů vyskytujících se v 80 % všech vzorků. K vyhledání peptidů jsem využila tu samou úvahu. Pokud je protein identifikovaný v 80 % vzorků, peptidy identifikované také z 80 % vzorků budou pocházet jen z těchto proteinů. Pro LVS jsem našla 25 různých proteinů

a k nim náležejících 34 peptidů vyskytujících se v 80 % vzorků (konkrétně ve 13 a více vzorcích). Pro Schu S4 jsem našla 41 různých proteinů a k nim náležejících 63 peptidů vyskytujících se v 80 % vzorků (konkrétně v 16 a více vzorcích).

Mnohonásobným srovnáním v UniProtu jsem objevila celkem 11 odlišných peptidových sekvencí (viz Tab. 15). Některé z nich se vyskytují jak ve dvojnásobně, tak v trojnásobně nabitě formě. Jako příklad mnohonásobného srovnání jsem v příloze N uvedla „Chaperone protein, groEL“ (gi|89256983/FTL_1714; gi|56708705/FTT1696). Délka tohoto proteinu je 544 AMK a v databázi UniProt se nazývá 60 kDa chaperonin. Žlutou barvou jsem označila peptidy LVS, zelenou Schu S4, které jsem našla nejenom v 80 % všech vzorků, ale které jsem kdy identifikovala. Celkové zastoupení počtu AMK peptidů Schu S4 mírně převažuje nad peptidy LVS.

Protein groEL obsahuje celkem 9 míst, v nichž se vyskytují odlišné AMK u jednotlivých kmenů *Francisella tularensis*. V uvedeném příkladu jsou obsaženy případy, které mohou nastat při porovnávání. Ve vzorcích se mi podařilo nalézt takové peptidy, které pokrývají 8 z nich. Ovšem pouze 4 sekvence peptidů jsem identifikovala v 80 % všech vzorků (viz Tab. 15, 16) a ty překrývají 3 místa s odlišnými AMK. Ke správné identifikaci kmenů *Francisella tularensis* by bylo vhodné dále zjistit tyto informace pro každý protein, který se mi v této práci podařilo nalézt (tyto informace budou dále zpracovány).

Interpretace výsledků však není tak jednoduchá. Do vyhodnocování by se měly zahrnout i další parametry proteinů a peptidů, které vypovídají o kvalitě naměřených dat. Takovými parametry jsou naměřené intenzity proteinů a fragmentovaných peptidů, dále pak skóre proteinů a peptidů, které jim bylo přiřazeno skórovacím systémem databáze Phenyx a počet peptidů z daných proteinů. Je tedy nutné pohlížet na výsledky z komplexnějšího hlediska než jen z pohledu, v kolika vzorcích je protein zastoupen. Tato složitější interpretace je však nad rámec této práce a bude dále zpracovávána.

Další pohled na zpracování výsledků by mohl být z hlediska získání informací, které proteiny a peptidy byly identifikovány v konkrétních metodách přípravy vzorků, zvláště pro ACN a WCL. Výsledkem by byl velký počet rozsáhlých tabulek pro každou metodu zvláště, ze kterých by bylo možné dále získávat informace např. pro metodu MRM (Multiple reaction monitoring). MRM

slouží k detekci specifického analytu z komplexních vzorků, u kterého jsou známe fragmentační vlastnosti [53]. Z výsledků této práce by tedy bylo možné vybrat pro metodu MRM pouze ty proteiny a k nim příslušející peptidy, které mají zásadní význam pro identifikaci a detekci dané bakterie (obsahují místa s odlišným zastoupením AMK). Potřebnými informacemi pro metodu MRM jsou efektivní hmotnosti (m/z) proteinů a jejich peptidů vzniklých fragmentací.

6 ZÁVĚR

Metoda tandemové hmotnostní spektrometrie je vhodná pro identifikaci a typizaci bakterií. V této studii jsem dokázala, že lze nalézt proteiny a peptidy, které k tomuto účelu mohou sloužit. Podařilo se mi nalézt mnoho peptidů, které se mohou stát kandidáty pro metody cílené identifikace bakterií (např. metoda MRM).

V porovnání s jinými proteomickými metodami, jako je 2-DE, je metoda tandemové hmotnostní spektrometrie rychlejší a jednoznačnější. Na druhou stranu tento postup vyžaduje značnou časovou náročnost při zpracování dat a získávání informací o možných kandidátech vhodných k typizaci bakterií. Zahrnuje totiž porovnání značného množství teoretických a experimentálních dat, při němž jsou zohledňovány různá hlediska interpretace informací získaných o proteinech a peptidech.

Podobný postup by bylo možné použít i u jiných bakterií než *Francisella tularensis* a může se tak stát dalším univerzálním přístupem k identifikaci a typizaci bakterií.

POUŽITÁ LITERATURA

1. MCLENDON, M.K., APICELLA, M.A., ALLEN, LA.H. *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annu Rev Microbiol. Author manuscript* [online]. 2007, 60. s. 167-185.
2. MACELA, Aleš a kolektiv *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*. : Grada Publishing, 2006. [cit. 2009-03-02]. 215 s.
3. ELLIS, J., OYSTON, P.C.F., GREEN, M., TITBALL, R.W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* [online]. 2002, vol. 15, no. 4. s. 631-646.
4. OLSUFJEV, N.G., MESHCHERYAKOVA, I.S. Subspecific Taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int. J. Syst. Bacteriol.* [online]. 1983, vol. 33, no. 4. s. 872-874.
5. CIMOLAI, N. *Laboratory Diagnosis of Bacterial Infections*. : Marcel Dekker, 2001. [cit. 2009-03-02]. 922 s.
6. FARLOW, J., SMITH, K.L., WONG, J., ABRAMS, M. et al. *Francisella tularensis* Strain Typing Using Multiple-Locus, Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *J. Clin. Microbiol.* [online]. 2001, vol. 39, no. 9. s. 3186-3192.
7. TITBALL, R.W., SJÖSTEDT, A. *Francisella tularensis*: an Overview. *ASM News* [online]. 2003, vol. 69, no. 11. s. 558-563.
8. SALOMONSSON, E. *The role of the Type IV pili system in the virulence of Francisella tularensis*. : Umeå universitet, 2008. 73 s. Dizertační práce.
9. HUBÁLEK, Z., JUŘICOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, Š., HALOUZKA, J. A Serologic Survey for Some Bacterial and Viral Zoonoses in Game Animals in the Czech Republic. *Journal Of Wildlife Disease* [online]. 1993, vol. 29, no. 4. s. 604-607.
10. TREML, F., PIKULA, J., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J. European brown hare as a potential source of zoonotic agents. *Veterinarni Medicina* [online]. 2007, vol. 52, no. 2. s. 451-456.

11. PIKULA, J., BEKLOVA, M., HOLESOVKA, Z., TREML, F. Spatio-temporal aspects of tularemia in Southern Moravia, Czech republic. *Vet. Med. - Czech* [online]. 2004, 49. s. 15-18.
12. PIKULA, J., BEKLOVA, M., HOLESOVKA, Z., TREML, F. Prediction of possible distribution of tularemia in the Czech Republic. *Vet. Med. - Czech* [online]. 2004, vol. 49. s. 61-64.
13. TÄRNVIK, A., CHU, M.C. New Approaches to Diagnosis and Therapy of Tularemia. *New York Academy of Science* [online]. 2007, vol. 1105, is. Francisella. s. 378-404.
14. GRIFFIN, K.F., OYSTON, P.C.F., TITBALL, R.W. Francisella tularensis vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol* [online]. 2007, vol. 49. s. 315-323.
15. SJÖSTEDT, A. Virulence determinants and protective antigens of Francisella tularensis. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2003, 6. s. 66-71.
16. GIL, H., BENACH, J.L., THANASSI, D.G. Presence of Pili on Surface of Francisella tularensis. *Infect. Immun.* [online]. 2004, vol. 72, no. 5. s. 3042-3047.
17. OYSTON, P.C.F., SJÖSTEDT, A., TITBALL, R.W. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in Francisella tularensis. *Nature Reviews* [online]. 2004, vol. 2, no. 1. s. 967-978.
18. SANTIC, M., MOLMERET, M., KLOSE, K.E., KWAIK, Y.A. Francisella tularensis travels a novel, twisted road within macrophages. *TRENDS in Microbiology* [online]. 2005. s. 1-7.
19. TITBALL, R.W., JOHANSSON, A., FORSMAN, M. Will the enigma of Francisella tularensis virulence soon be solved?. *TRENDS in Microbiology* [online]. 2003, vol. 11, no. 3. s. 118-122.
20. HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J. *Základy imunologie*. 3. vyd. : TRITON, 2005. [cit. 2009-03-11]. 279 s.
21. POHANKA, M., HUBALEK, M., NEUBAUEROVA, V., MACELA, A. et. al. Current and emerging assays for Francisella tularensis detection: a review. *Veterinarni Medicina* [online]. 2008, 53. s. 585-594.
22. Kolektiv autorů. *Mikrobiologické vyšetřovací metody*. : Státní zdravotnické nakladatelství, 1958. [cit. 2009-03-16].

23. HSIEH, S.-Y., TSENG, CH.-L., LEE, Y.-S. et al. Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF MS. *Molecular & Cellular Proteomics* [online]. 2007. s. 448-456.
24. VODRÁŽKA, Z. *Biochemie 1.* : Academia, 1992. [cit. 2009-03-16]. 184 s.
25. ROZSYPAL, S. *Úvod do molekulární biologie (1.díl).* : 1998. [cit. 2009-03-16]. 300 s.
26. ALBERTS, B., et al. *Základy buněčné biologie.* : Garland Publishing, 1998. [cit. 2009-03-16]. 630 s.
27. MURRAY, R.K., et al. *Harperova biochemie.* : H&H, 1998. [cit. 2009-03-16]. 872 s.
28. ANGELETTI, R.H. *Proteins: Analysis and Design.* : Academic Press, 1998. Posttranslational Modifications, s. 121.
29. WITZE, E.S., OLD, W.M., RESING, K.A., AHN, N.G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature Publishing Group* [online]. 2007, vol. 4, no. 10. s. 798-806.
30. ŠTOSOVÁ, T., HAVLIŠ, J., LENOBEL, R., ŠEBELA, M. Proteolytické enzymy: význam pro proteomiku. *Chem. Listy* [online]. 2005, roč. 99, číslo 12. s. 896-905.
31. CHMELÍK, J. Proteomický průvodce. *Chem. Listy* [online]. 2005, roč. 99, č. 12. s. 883-885.
32. URL1:
<http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_6924.pdf>. [cit. 2009-03-16].
33. URL2:
<<http://www.piercenet.com/products/browse.cfm?fldID=02020102>>. [cit. 2009-03-16].
34. GETZ, E.B., XIAO, M., CHAKRABARTY, T. et al. A Comparison between the Sulfhydryl Reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for Use in Protein Biochemistry. *Analytical Biochemistry* [online]. 1999, vol. 273. s. 73-80.
35. SECHI, S., CHAIT, B.T. Modification of Cystein Residues by Alkylation. A Tool in Peptide Mapping and Protein Identification. *Anal. Chem.* [online]. 1998, vol. 70. s. 5150-5158.

36. VIDOVÁ, V., LEMR, K., HAVLÍČEK, V. Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chem. Listy* [online]. 2008, roč. 102, č. 11. s. 957-959.
37. JANDERA, P. a kol. *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů : Díl B – Molekulová spektroskopie v organické analýze*. 2. vyd. Univerzita Pardubice : 2006. [cit. 2009-03-27]. 289 s.
38. HOLČAPEK, M. *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze, přednášky* [online]. [cit. 2009-03-27]. Dostupný z WWW: <http://holcapek.upce.cz/teaching_CZ.htm>.
39. BALDWIN, M.A. Mass Spectrometers for the Analysis of Biomolecules. *Methods in Enzymology* [online]. 2005, vol. 402., s. 3-48.
40. COON, J.J., SYKA, J.E.P., SHABANOWITZ, J., HUNT, D.F. Tandem Mass Spectrometry for Peptide and Protein Sequence Analysis. *BioTechniques* [online]. 2005, vol. 38, no. 4. s. 519-523.
41. GRAVES, P.R., HAYSTEAD, T.A.J. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* [online]. 2002, vol. 66, no. 1. s. 39-63.
42. DEYL, Z. *Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků*. : Univerzita Pardubice, 1996. [cit. 2009-04-06]. 213 s.
43. KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. : Pavel Klouda, 2003. [cit. 2009-04-06]. 132 s.
44. VAŇKOVÁ, H. Peptidové mapy. *Chem. Listy* [online]. 1999, roč. 93, č. 2. s. 120-127.
45. SÝKORA, D., TESAŘOVÁ, E., VOSMANSKÁ, M., ZVOLÁNKOVÁ, M. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chem. Listy* [online]. 2007, roč. 101, č. 3. s. 190-199.
46. NESVIZHSKII, A.I., VITEK, O., AEBERSOLD, R. Analysis and validation of proteomic data generated by tandem mass spectrometry. *Nature Methods* [online]. 2007, vol. 4, no. 10. s. 787-797.
47. Kolektiv autorů. *Vybrané kapitoly z molekulární patologie : Skripta pro studenty DSP Molekulární patologie*. : 2008. [cit. 2009-04-13]. 89 s.

48. ŘEHULKA, P., ŘEHULKOVÁ, H., CHMELÍK, J. Měření proteomických dat hmotnostní spektrometrií a jejich bioinformatická interpretace. *Chem. Listy* [online]. 2007, roč. 101, č. 4. s. 279-286.
49. URL3: <<http://www.genebio.com/products/phenyx/index.html>>. [cit. 2009-04-13].
50. URL4: <<http://phenyx.vital-it.ch/docs/pwi/PWITOC.html>>. [cit. 2009-04-13].
51. URL5:
<<http://db.systemsbio.net:8080/proteomicsToolkit/FraglonServlet.html>>. [cit. 2009-04-20].
52. URL6: <<http://physics.nist.gov/PhysRefData/Compositions/index.html>>. [cit.2009-04-20].
53. DOMON, B., AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* [online]. 2006, vol. 312. s. 212-217.

PŘÍLOHY

A. Seznam vždy se vyskytujících proteinů *Francisella tularensis holarctica* LVS a počet unikátních peptidů v jednotlivých vzorcích dané metody

	AC	IDNCBI	Description	Metoda L	Metoda B	Metoda FP-8M	Metoda Var
1	gi 89255458	ref YP_512819.1	outer membrane protein	6,10,4,11	8,11,9,10	4,5,5,4	15,17,16,15
2	gi 89255535	ref YP_512896.1	hypothetical protein FTL_0097	1,4,3,4	4,4,4,2	1,1,1,1	5,5,5,6
3	gi 89255548	ref YP_512909.1	intracellular growth locus, subunit A	4,6,8,7	6,8,6,8	3,4,4,3	1,1,1,1
4	gi 89255967	ref YP_513329.1	outer membrane protein	6,10,7,6	7,6,9,8	6,6,5,3	9,10,7,11
5	gi 89256014	ref YP_513376.1	hypothetical protein FTL_0617	10,9,12,15	19,16,13,12	16,14,16,9	7,8,7,6
6	gi 89256252	ref YP_513614.1	Histone-like protein HU form B	9,10,7,8	8,9,10,9	5,3,4,3	6,6,5,3
7	gi 89256255	ref YP_513617.1	host factor I for bacteriophage Q beta replication	3,3,2,3	5,4,3,4	2,3,3,2	4,4,3,3
8	gi 89256462	ref YP_513824.1	acyl carrier protein	3,3,3,3	4,6,3,4	3,3,2,3	6,7,6,4
9	gi 89256686	ref YP_514048.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	9,8,8,7	6,8,4,3	3,4,3,3	10,9,8,9
10	gi 89256983	ref YP_514345.1	Chaperone protein, groEL	7,4,6,9	6,7,3,2	19,19,21,10	16,17,13,16
11	gi 89257014	ref YP_514376.1	50S ribosomal protein L7/L12	3,4,3,2	5,5,3,6	1,1,3,3	4,4,5,4
12	gi 89257193	ref YP_514555.1	heat shock protein	6,7,8,7	10,8,7,7	6,5,5,5	7,7,5,5

B. Seznam vždy identifikovaných proteinů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 a počet unikátních peptidů v jednotlivých vzorcích dané metody

	AC	IDNCBI	Description	Metoda L	Metoda B	Metoda FP-8M	Metoda Var
1	gi 56707307	ref YP_169203.1	elongation factor Tu (EF-Tu)	25,25,24,27,21	5,5,9,5,5	22,22,22,21,22	6,1,4,3,3
2	gi 56707313	ref YP_169209.1	50S ribosomal protein L7/L12	2,4,3,5,3	3,4,7,4,7	2,2,3,3,3	8,4,3,6,4
3	gi 56707320	ref YP_169216.1	30S ribosomal protein S16	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1
4	gi 56707475	ref YP_169371.1	30S ribosomal protein S7	6,6,5,7,4	8,7,8,4,9	3,2,2,2,2	4,5,5,5,5
5	gi 56707482	ref YP_169378.1	30S ribosomal protein S19	1,1,1,1,1	3,2,3,3,3	1,1,1,1,1	2,1,1,2,1
6	gi 56707485	ref YP_169381.1	50S ribosomal protein L16	6,4,6,7,4	4,3,4,5,5	6,3,3,5,3	4,5,5,9,6
7	gi 56707500	ref YP_169396.1	30S ribosomal protein S13	6,5,6,6,4	5,4,6,5,6	3,2,3,3,4	2,3,1,4,2
8	gi 56707504	ref YP_169400.1	50S ribosomal protein L17	4,3,3,3,1	2,4,5,5,4	3,3,3,2,2	4,3,3,4,3
9	gi 56707752	ref YP_169648.1	Histone-like protein HU form B	6,5,6,6,6	11,10,12,12,12	7,6,6,5,4	6,6,7,10,7
10	gi 56707755	ref YP_169651.1	host factor I for bacteriophage Q beta replication	3,4,3,5,1	3,4,4,5,5	4,4,2,3,3	3,5,3,4,4
11	gi 56707795	ref YP_169691.1	50S ribosomal protein L25	2,2,2,3,2	2,3,4,2,3	2,2,2,1,2	1,2,1,3,1
12	gi 56708429	ref YP_170325.1	acyl carrier protein	3,3,3,3,3	3,3,3,4,4	3,2,3,2,3	5,4,6,6,4
13	gi 56708483	ref YP_170379.1	hypothetical protein FTT1441	12,6,8,8,8	9,10,13,8,8	5,4,5,4,5	2,3,2,2,2
14	gi 56708512	ref YP_170408.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	5,7,7,9,5	4,3,6,6,5	4,4,3,4,3	5,6,7,8,6
15	gi 56708574	ref YP_170470.1	outer membrane protein 26	6,7,6,10,6	5,7,9,6,7	4,5,4,5,6	9,8,7,11,8
16	gi 56708623	ref YP_170519.1	50S ribosomal protein L28	3,4,5,5,5	4,5,7,6,6	3,1,2,3,1	3,2,3,2,3
17	gi 56708705	ref YP_170601.1	Chaperone protein, groEL	19,17,18,21,15	10,15,16,12,14	18,15,19,22,21	28,31,22,33,24
18	gi 56708782	ref YP_170678.1	heat shock protein	7,5,5,5,3	5,7,4,5,6	3,3,3,3,3	3,2,5,4,2

C. Seznam vždy identifikovaných peptidů *Francisella tularensis holarctica* LVS

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
1	gi 89255458	outer membrane protein	GGVGFANVQDIFETSPLGK		2	968,48802	968,49476
2	gi 89255967	outer membrane protein	FSSITINSDGK		2	584,79690	584,79645
3	gi 89256014	hypothetical protein FTL_0617	AVSAYYELLK		2	578,81090	578,81666
4			KLIVEEETHIGEVEK		3	584,98320	584,98471
5			SIILEEYAR		2	547,29140	547,29863
6	gi 89256252	Histone-like protein HU form B	EVASNTLDATIAAVTK		2	802,42710	802,43110
7			NGDSVTLVGFGTFQVK	DEAMID(1)	2	835,43800	835,42582
8			NGDSVTLVGFGTFQVK		2	834,93760	834,93381
9	gi 89256462	acyl carrier protein	DVYDYIESK		2	566,26910	566,26445
10	gi 89256686	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	VVFNDELHK		2	550,78780	550,79097
11	gi 89257014	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPFTVK		2	582,29770	582,30137
12	gi 89257193	heat shock protein	YSNGVLSLNIPK		2	652,86420	652,86467

D. Seznam vždy identifikovaných peptidů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
1	gi 56707313	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPFTVK		2	582,30270	582,30137
2	gi 56707320	30S ribosomal protein S16	LGFFNPLAK		2	503,79100	503,79024
3	gi 56707482	30S ribosomal protein S19	LGEFVVTR		2	460,76650	460,76423
4	gi 56707504	50S ribosomal protein L17	AIVEPLVTLAK		2	577,36460	577,36377
5	gi 56707752	Histone-like protein HU form B	EVASNTLDATIAAVTK		2	802,93530	802,4311
6			EVASNTLDATIAAVTK	DEAMID(1)	2	802,43150	802,92311
7			NGDSVTLVGFGTFQVK	DEAMID(1)	2	835,44040	835,42582
8	gi 56707755	host factor I for bacteriophage Q beta replication	ISSLQDPFLNALR		2	737,40930	737,40723
9	gi 56707795	50S ribosomal protein L25	IPAVIYGGEK		2	523,80310	523,79827
10	gi 56708429	acyl carrier protein	TVKDVYDYIESK		2	730,37320	730,36998
11	gi 56708483	hypothetical protein FTT1441	SIILEEYAR		2	547,30350	547,29863
12	gi 56708512	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	VVFNDELHK		2	550,79470	550,79097
13	gi 56708705	Chaperone protein, groEL	DLLPILEGVSK		2	592,35480	592,35086
14			EIELEDKFENMGAQIVK		3	665,00790	665,00367
15			MLDGVNTLANAVK		2	673,36990	673,36144
16	gi 56708782	heat shock protein	YSNGVLSLNIPK	DEAMID(1)	2	653,36270	653,35667

E. Seznam proteinů *Francisella tularensis holarctica* LVS identifikovaných v 80 % vzorků

	AC	IDNCBI	Description	Metoda L	Metoda B	Metoda FP-8M	Metoda Var
1	gij89255458	ref YP_512819.1	outer membrane protein	6,10,4,11	8,11,9,10	4,5,5,4	15,17,16,15
2	gij89255535	ref YP_512896.1	hypothetical protein FTL_0097	1,4,3,4	4,4,4,2	1,1,1,1	5,5,5,6
3	gij89255548	ref YP_512909.1	intracellular growth locus, subunit A	4,6,8,7	6,8,6,8	3,4,4,3	1,1,1,1
4	gij89255659	ref YP_513020.1	protein chain elongation factor EF-Ts	3,N,N,6	6,6,5,4	6,5,5,4	N,1,1,1
5	gij89255661	ref YP_513022.1	ribosome recycling factor	2,2,2,1	2,3,N,2	N,1,1,1	4,5,4,3
6	gij89255929	ref YP_513291.1	50S ribosomal protein L28	4,4,5,4	4,5,5,6	2,2,2,1	N,N,N,1
7	gij89255943	ref YP_513305.1	outer membrane protein OmpH	2,4,2,2	4,6,6,4	N,N,1,1	6,7,6,7
8	gij89255967	ref YP_513329.1	outer membrane protein	6,10,7,6	7,6,9,8	6,6,5,3	9,10,7,11
9	gij89256014	ref YP_513376.1	hypothetical protein FTL_0617	10,9,12,15	19,16,13,12	16,14,16,9	7,8,7,6
10	gij89256185	ref YP_513547.1	hypothetical protein FTL_0822	4,3,3,1	4,3,2,2	N,N,2,N	4,4,4,4
11	gij89256252	ref YP_513614.1	Histone-like protein HU form B	9,10,7,8	8,9,10,9	5,3,4,3	6,6,5,3
12	gij89256255	ref YP_513617.1	host factor I for bacteriophage Q beta replication	3,3,2,3	5,4,3,4	2,3,3,2	4,4,3,3
13	gij89256299	ref YP_513661.1	50S ribosomal protein L25	1,3,1,3	3,3,1,N	2,2,1,2	1,2,1,N
14	gij89256396	ref YP_513758.1	inorganic pyrophosphatase	2,1,1,1	1,1,1,N	N,1,N,1	2,2,3,3
15	gij89256462	ref YP_513824.1	acyl carrier protein	3,3,3,3	4,6,3,4	3,3,2,3	6,7,6,4
16	gij89256500	ref YP_513862.1	Sigma-54 modulation protein	1,2,2,4	4,2,N,4	2,1,4,2	9,8,9,9
17	gij89256686	ref YP_514048.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	9,8,8,7	6,8,4,3	3,4,3,3	10,9,8,9
18	gij89256783	ref YP_514145.1	hypothetical protein FTL_1494	4,6,4,4	8,7,6,9	2,1,1N	4,4,3,4
19	gij89256983	ref YP_514345.1	Chaperone protein, groEL	7,4,6,9	6,7,3,2	19,19,21,10	16,17,13,16
20	gij89256984	ref YP_514346.1	Chaperonin protein, groES	N,N,2,4	6,6,5,6	2,3,5,1	10,10,9,10
21	gij89257014	ref YP_514376.1	50S ribosomal protein L7/L12	3,4,3,2	5,5,3,6	1,1,3,3	4,4,5,4
22	gij89257015	ref YP_514377.1	50S ribosomal protein L10	3,4,4,4	6,8,3,5	3,3,3,3	N,N,N,1
23	gij89257020	ref YP_514382.1	elongation factor Tu (EF-Tu)	14,13,13,19	1,1,N,N	22,21,22,17	8,4,6,5
24	gij89257055	ref YP_514417.1	Glutaredoxin-related protein	1,1,2,2	2,2,N,1	2,2,2,2	3,4,5,4
25	gij89257193	ref YP_514555.1	heat shock protein	6,7,8,7	10,8,7,7	6,5,5,5	7,7,5,5

F. Seznam proteinů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 identifikovaných v 80 % vzorků

	AC	IDNCBI	Description	Metoda L	Metoda B	Metoda FP-8M	Metoda Var
1	gi 56707246	ref YP_169142.1	Glutaredoxin-related protein	3,3,3,3,3	N,2,4,1,1	2,1,2,3,3	2,3,3,4,3
2	gi 56707307	ref YP_169203.1	elongation factor Tu (EF-Tu)	25,25,24,27,21	5,5,9,5,5	22,22,22,21,22	6,1,4,3,3
3	gi 56707311	ref YP_169207.1	50S ribosomal protein L1	6,6,4,7,4	1,3,4,N,2	4,3,3,3,4	1,1,N,1,N
4	gi 56707313	ref YP_169209.1	50S ribosomal protein L7/L12	2,4,3,5,3	3,4,7,4,7	2,2,3,3,3	8,4,3,6,4
5	gi 56707320	ref YP_169216.1	30S ribosomal protein S16	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1
6	gi 56707469	ref YP_169365.1	ribosome recycling factor	2,1,2,3,N	2,2,2,3,3	N,1,1,1,1	4,5,4,4,5
7	gi 56707475	ref YP_169371.1	30S ribosomal protein S7	6,6,5,7,4	8,7,8,6,9	3,2,2,2,2	4,5,5,5,5
8	gi 56707480	ref YP_169376.1	50S ribosomal protein L23	3,2,2,3,3	1,2,2,2,2	1,1,1,1,1	N,N,1,N,1
9	gi 56707482	ref YP_169378.1	30S ribosomal protein S19	1,1,1,1,1	3,2,3,3,3	1,1,1,1,1	2,1,1,2,1
10	gi 56707485	ref YP_169381.1	50S ribosomal protein L16	6,4,6,7,4	4,3,4,5,5	6,3,3,5,3	4,5,5,9,6
11	gi 56707486	ref YP_169382.1	50S ribosomal protein L29	N,1,N,1,1	3,2,4,4,2	1,1,1,1,1	2,1,2,1,1
12	gi 56707489	ref YP_169385.1	50S ribosomal protein L24	3,4,3,2,2	1,N,4,N,N	2,N,2,1,2	5,4,4,3,2
13	gi 56707493	ref YP_169389.1	50S ribosomal protein L6	3,2,3,2,2	N,N,1,N,1	2,2,3,3,2	1,1,1,1,1
14	gi 56707495	ref YP_169391.1	30S ribosomal protein S5	4,2,2,4,3	N,N,3,1,2	2,1,1,1,3	1,3,3,3,1
15	gi 56707500	ref YP_169396.1	30S ribosomal protein S13	6,5,6,6,4	5,4,6,5,6	3,2,3,3,4	2,3,1,4,2
16	gi 56707504	ref YP_169400.1	50S ribosomal protein L17	4,3,3,3,1	2,4,5,5,4	3,3,3,2,2	4,3,3,4,3
17	gi 56707752	ref YP_169648.1	Histone-like protein HU form B	6,5,6,6,6	11,10,12,12,12	7,6,6,5,4	6,6,7,10,7
18	gi 56707755	ref YP_169651.1	host factor I for bacteriophage Q beta replication	3,4,3,5,1	3,4,4,5,5	4,4,2,3,3	3,5,3,4,4
19	gi 56707795	ref YP_169691.1	50S ribosomal protein L25	2,2,2,3,2	2,3,4,2,3	2,2,2,1,2	1,2,1,3,1
20	gi 56707818	ref YP_169714.1	30S ribosomal protein S15	4,4,1,4,3	5,4,4,6,5	2,1,2,1,N	4,6,4,10,3
21	gi 56707839	ref YP_169735.1	Peroxidase/catalase	21,20,16,18,14	N,N,1,N,N	15,11,11,12,13	18,14,14,18,13
22	gi 56707885	ref YP_169781.1	50S ribosomal protein L27	1,1,1,1,1	2,2,1,2,1	1,1,N,N,N	1,3,2,2,2
23	gi 56707921	ref YP_169817.1	hypothetical protein FTT0810c	1,1,1,2,1	1,1,1,N,N	1,1,1,N,N	1,2,1,3,1
24	gi 56707991	ref YP_169887.1	Type IV pili fiber building block protein	1,1,1,1,1	1,1,1,1,1	1,1,1,2,1	1,N,1,N,N
25	gi 56708117	ref YP_170013.1	inorganic pyrophosphatase	2,3,2,2,2	N,N,2,N,1	2,1,2,2,1	3,3,3,3,N
26	gi 56708125	ref YP_170021.1	30S ribosomal protein S21	3,2,1,2,N	3,3,3,3,3	1,1,1,N,N	4,2,4,5,2

	AC	IDNCBI	Description	Metoda L	Metoda B	Metoda FP-8M	Metoda Var
27	gi 56708145	ref YP_170041.1	50S ribosomal protein L9	4,7,6,7,3	N,N,2,N,N	4,3,3,3,4	3,6,3,7,2
28	gi 56708329	ref YP_170225.1	Chaperone protein dnaK (heat shock protein family 70 protein)	8,7,6,8,8	2,N,1,1,N	18,16,20,22,21	14,15,10,15,10
29	gi 56708334	ref YP_170230.1	30S ribosomal protein S9	2,N,1,2,1	N,N,1,N,1	2,1,4,2,2	1,2,1,3,1
30	gi 56708341	ref YP_170237.1	Sigma-54 modulation protein	N,1,N,3,N	1,1,3,2,2	1,N,2,2,2	4,6,6,9,5
31	gi 56708415	ref YP_170311.1	intracellular growth locus, subunit A	5,5,4,5,3	1,2,4,5,3	3,3,2,4,4	N,N,1,1,1
32	gi 56708424	ref YP_170320.1	50S ribosomal protein L32	2,2,3,2,2	N,4,3,4,4	N,N,1,1,1	2,4,4,3,3
33	gi 56708429	ref YP_170325.1	acyl carrier protein	3,3,3,3,3	3,3,3,4,4	3,2,3,2,3	5,4,6,6,4
34	gi 56708483	ref YP_170379.1	hypothetical protein FTT1441	12,6,8,8,8	9,10,13,8,8	5,4,5,4,5	2,3,2,2,2
35	gi 56708512	ref YP_170408.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	5,7,7,9,5	4,3,6,6,5	4,4,3,4,3	5,6,7,8,6
36	gi 56708574	ref YP_170470.1	outer membrane protein 26	6,7,6,10,6	5,7,9,6,7	4,5,4,5,6	9,8,7,11,8
37	gi 56708598	ref YP_170494.1	outer membrane protein OmpH	2,2,3,2,2	3,6,2,3,3	1,N,1,1,1	3,4,4,3,4
38	gi 56708623	ref YP_170519.1	50S ribosomal protein L28	3,4,5,5,5	4,5,7,6,6	3,1,2,3,1	3,2,3,2,3
39	gi 56708704	ref YP_170600.1	Chaperonin protein, groES	4,4,2,N,N	4,3,8,3,6	3,1,4,3,3	9,9,9,14,9
40	gi 56708705	ref YP_170601.1	Chaperone protein, groEL	19,17,18,21,15	10,15,16,12,14	18,15,19,22,21	28,21,22,33,24
41	gi 56708782	ref YP_170678.1	heat shock protein	7,5,5,5,3	5,7,4,5,6	3,3,3,3,3	3,2,5,4,2

N – protein nebyl ve vzorku identifikován

G. Seznam peptidů *Francisella tularensis holarctica* LVS v 80 % vzorků

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
1	gi 89255458	outer membrane protein	GGVGFANVQDIFETSPLGK		2	968,48800	968,49476
2			MASDDADAFKDALIK		2	805,88610	805,89075
3	gi 89255548	intracellular growth locus, subunit A	IPALTNYTIK		2	567,32770	567,33247
4	gi 89255929	50S ribosomal protein L28	GIDTVLSDLR		2	544,79660	544,80154
5	gi 89255967	outer membrane protein	FSSITINS DGK		2	584,79690	584,79645
6			LATIDDQDPNYK		2	696,83320	696,83631
7	gi 89256014	hypothetical protein FTL_0617	AVSAYYELLK		2	578,81090	578,81666
8			IADLNETYQHNINDILIESLEHEK		3	951,14100	951,14239
9			IADLNETYQHNINDILIESLEHEK		4	713,60720	713,60876
10			KLIVEEETHIGEVEK		3	584,98320	584,98471
11			QEIIDQLNK		2	550,80010	550,80154
12			SIILEEYAR		2	547,29140	547,29863
13	gi 89256252	Histone-like protein HU form B	EVASNTLDATIAAVTK	DEAMID(1)	2	802,93640	802,92311
14			EVASNTLDATIAAVTK		2	802,42710	802,4311
15			NGDSVTLVGFGTFQVK	DEAMID(1)	2	835,43800	835,42582
16			NGDSVTLVGFGTFQVK		2	834,93760	834,93381
17			SELVSAIAK		2	459,26590	459,26934
18	gi 89256255	host factor I for bacteriophage Q beta replication	ISSLQDPFLNALR		2	737,40690	737,40723
19	gi 89256462	acyl carrier protein	DVYDYIESK		2	566,26910	566,26445
20			VNHIIVEQLGVK		2	674,89780	674,90159
21	gi 89256686	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	ITFEEAAR		2	468,74180	468,74349
22			VHGPVQTQFGYHLLIITSR		3	728,05310	728,05223
23			VVFNDELHK		2	550,78780	550,79097
24	gi 89256783	hypothetical protein FTL_1494	DASQAADILVNK		2	622,82850	622,82828
25	gi 89256983	Chaperone protein, groEL	ALDGLTGENDDQNHGIALLR		3	708,02350	708,02289
26			DLLPILEGVSK		2	592,35390	592,35086

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
27	gi 89257014	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPFTVK		2	582,29770	582,30137
28	gi 89257015	50S ribosomal protein L10	TLNEIPSQAVR		2	614,33500	614,33882
29	gi 89257193	heat shock protein	DIDIELDKNK		2	601,81740	601,81738
30			SITLPDNIDSDKIEAK		3	586,97530	586,9761
31			YNPFELK		2	455,73810	455,73768
32			YSNGVLSLNIPK	DEAMID(1)	2	653,35990	653,35667
33			YSNGVLSLNIPK		2	652,86420	652,86467
34			YYGEFQR		2	481,72440	481,72256

H. Seznam peptidů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 v 80 % vzorků

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
1	gi 56707246	Glutaredoxin-related protein	YADWPTFPQLWVK		2	825,9278	825,91998
2	gi 56707311	50S ribosomal protein L1	VVGQLGQILGPK		2	604,8733	604,8723
3	gi 56707313	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPFTVK		2	582,3027	582,30137
4	gi 56707320	30S ribosomal protein S16	LGFFNPLAK		2	503,791	503,79024
5	gi 56707475	30S ribosomal protein S7	VAAEILEAVEGR		2	628,8497	628,84648
6			VGGATYQVPVEVRPER		3	586,3217	586,3168
7	gi 56707480	50S ribosomal protein L23	VESVNILNVK		2	557,8319	557,82756
8	gi 56707482	30S ribosomal protein S19	LGEFVVTR		2	460,7665	460,76423
9	gi 56707485	50S ribosomal protein L16	VSFGEFGLQATSR		2	699,8609	699,85483
10	gi 56707486	50S ribosomal protein L29	IELLQQLFSLR		2	680,4068	680,40396
11	gi 56707500	30S ribosomal protein S13	HTVIGLTSIYGIGK		2	729,9247	729,91998
12			IAGVNIPVHK		2	524,3199	524,3197
13	gi 56707504	50S ribosomal protein L17	AIVEPLVTLAK		2	577,3646	577,36377
14			LFEEFGAR		2	484,753	484,74603
15	gi 56707752	Histone-like protein HU form B	ALKNGDSVTLVGFQTFQVK	DEAMID(1)	3	661,3634	661,35855
16			EVASNTLDATIAAVTK	DEAMID(1)	2	802,9353	802,92311
17			EVASNTLDATIAAVTK		2	802,4315	802,4311
18			NGDSVTLVGFQTFQVK	DEAMID(1)	2	835,4404	835,42582
19			SELVSAIAK		2	459,2712	459,26934
20			TGETIKIPASK		2	572,8328	572,83284
21			gi 56707755	host factor I for bacteriophage Q beta replication	HAISTIVPAK		2
22	ISSLQDPFLNALR				2	737,4093	737,40723
23	gi 56707795	50S ribosomal protein L25	EAVSVLLDHDK		2	613,3264	613,32538
24			IPAVIYGGEK		2	523,8031	523,79827
25	gi 56707818	30S ribosomal protein S15	LLDYLHDKDVER		3	505,936	505,93217
26	gi 56707885	50S ribosomal protein L27	DHTLFALK		2	472,7677	472,76423

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
27	gi 56707921	hypothetical protein FTT0810c	DAGIDLPSGINFPFK		2	795,9188	795,91235
28	gi 56707991	Type IV pili fiber building block protein	AQLGSDLALGGAK		2	644,3523	644,34938
29	gi 56708117	inorganic pyrophosphatase	VEGWDNAAFAR		2	618,3063	618,29441
30	gi 56708334	30S ribosomal protein S9	ALIEYDEELKPALR		3	553,9689	553,97051
31	gi 56708415	intracellular growth locus, subunit A	IPALNTYTIK		2	567,3322	567,33247
32	gi 56708429	acyl carrier protein	DVYDYIESK		2	566,2758	566,26445
33			TVKDVYDYIESK		2	730,3732	730,36998
34			TVKDVYDYIESK		3	487,2549	487,24928
35			VNHIIVEQLGVK		2	674,9033	674,90159
36			VNHIIVEQLGVK		3	450,2695	450,27035
37			gi 56708483	hypothetical protein FTT1441	AVSAYYELLK		2
38	SIILEEYAR				2	547,3035	547,29863
39	gi 56708512	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase.	ITFEEAAR		2	468,7475	468,74349
40			VHGPVQTQFGYHLLLEITSR		3	728,053	728,05223
41			VVFNDELHK		2	550,7947	550,79097
42	gi 56708574	outer membrane protein 26	EIPADQLGTIKL		2	649,3757	649,37233
43			FSSITINSDGK		2	584,8077	584,79645
44			GEWIEVVDNK		2	594,8034	594,79899
45			LATIDDQDPNYK		2	696,8417	696,83631
46	gi 56708623	50S ribosomal protein L28	FLPNLHAHR		2	552,8134	552,80729
47			FWVESENK		2	533,7607	533,75185
48			GIDTVLSDLR		2	544,8043	544,80154

	AC	Description	SequencAMK	Modifs	z	Průměrná m/z _{EXP.}	m/z _{TEOR.}
49	gi 56708704	Chaperonin protein, groES	MNIRPLQDR		2	571,8123	571,80917
50			VGDETLMMR		2	582,7945	582,7918
51	gi 56708705	Chaperone protein, groEL	AAVEEGIVAGGGVALIR		2	791,4572	791,45217
52			ALDGLTGENDDQNYGIALLR		2	1074,5333	1074,53261
53			DLLPILEGVSK		2	592,3548	592,35086
54			DLLPILEGVSK		3	423,5539	395,23653
55			EIELEDKFENMGAQIVK		3	665,0079	665,00367
56			ISNIRDLLPILEGVSK		3	589,6865	589,6846
57			LSGGVAVIK		2	422,2701	422,26915
58			MLDGVNTLANAVK		2	673,37	673,36144
59			QVLFSDEAR		2	532,7798	532,77278
60			SFGTPTITK		2	476,2647	476,26152
61			TADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLK		2	1209,1415	1209,14272
62	TADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLK		3	806,4309	806,4311		
63	gi 56708782	heat shock protein	YSNGVLSLNIPK	DEAMID(1)	2	653,3627	653,35667

I. Seznam peptidů *Francisella tularensis holarctica* LVS identifikovaných ve všech vzorcích, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny

AC	UniProt	Description	SequencAMK	Modifs	z	m/z _{TEOR.}
gi 89255458	FTL_0009	outer membrane protein	G G VG FANVQDIFETSPLGK		2	968,49476
gi 89257014	FTL_1745	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEG T PF T VK		2	582,30137

J. Seznam peptidů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 identifikovaných ve všech vzorcích, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny

AC	UniProt	Description	SequencAMK	Modifs	z	m/z _{TEOR.}
gi 56707313	FTT0143	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPF T VK		2	582,30137
gi 56707504	FTT0351	50S ribosomal protein L17	A IVEPLVTLAK		2	577,36377
gi 56708705	FTT1696	Chaperone protein, groEL	DLLP I LEGVSK		2	592,35086

K. Seznam peptidů *Francisella tularensis holarctica* LVS identifikovaných v 80 % vzorků, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny

AC	UniProt	Description	SequencAMK	Modifs	z	m/z _{TEOR.}
gi 89255458	FTL_0009	outer membrane protein	G G VGFANVQDIFETSPLGK		2	968,49476
			MASDDADAFKDAL I K		2	805,89075
gi 89256783	FTL_1494	hypothetical protein FTL_1494	D A SQAAD I LVNK		2	622,82828
gi 89256983	FTL_1714	Chaperone protein, groEL	ALDGLTGENDDQN H GIALLR		3	708,02289
			DLLP I LEGVSK		2	592,35086
gi 89257014	FTL_1745	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPF T VK		2	582,30137

L. Seznam peptidů *Francisella tularensis tularensis* Schu S4 identifikovaných v 80 % vzorků, ve kterých se vyskytují sekvenční rozdíly mezi kmeny

AC	UniProt	Description	SequencAMK	Modifs	z	m/z _{TEOR.}
gi 56707313	FTT0143	50S ribosomal protein L7/L12	DAVEGTPF T VK		2	582,30137
gi 56707475	FTT0322	30S ribosomal protein S7	V AAEILEAVEGR		2	628,84648
gi 56707485	FTT0332	50S ribosomal protein L16	VSFGE FGL QATSR		2	699,85483
gi 56707504	FTT0351	50S ribosomal protein L17	A IVEPLVTLAK		2	577,36377
gi 56708705	FTT1696	Chaperone protein, groEL	ALDGLTGENDDQ N YGIALLR		2	1074,53261
			DLLP I LEGVSK		2	592,35086
			DLLP I LEGVSK		3	395,23653
			ISNIRDLLP I LEGVSK		3	589,6846
			SFG T PTITK		2	476,26152

M. Kmeny *Francisella tularensis* pro vyhledání Chaperone protein, groEL (gi|89256983/FTL_1714; gi|56708705/FTT1696)

Identifikátor	Název kmenu	Název proteinu	Délka proteinu v počtu AMK
A7NE88	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (strain FTA)	60 kDa chaperonin	544
P94798	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (strain LVS)	60 kDa chaperonin	544
Q0BKF7	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (strain OSU18)	60 kDa chaperonin	544
Q14FU4	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (strain FSC 198)	60 kDa chaperonin	544
Q5NEE1	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> FSC237	60 kDa chaperonin	544
A7JET7	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> FSC033	60 kDa chaperonin	544
A7YUL5	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC022	60 kDa chaperonin	544
B2SFF8	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> (strain FSC147)	60 kDa chaperonin	544
A4IWC4	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (strain WY96-3418)	60 kDa chaperonin	544
A0Q838	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> (strain U112)	60 kDa chaperonin	544

**N. Příklad porovnání sekvencí pomocí databáze UniProt: Chaperone protein, groEL
(gi|89256983/FTL_1714; gi|56708705/FTT1696)**

A7NE88	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATF
P94798	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFSGAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATH
Q0BKF7	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATO
Q14FU4	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRAT1
Q5NEE1	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATT
A7JET7	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	A7JET7_FRATT
A7YUL5	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATM
A4IWC4	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATW
A0Q838	MAAKQVLFSDEARAKMLDGVNTLANAVKVTLGPKGRNVVLDKSFGRAPTITKDGVSVAKEI	60	CH60_FRATN
	*****:*****		
A7NE88	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATF
P94798	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATH
Q0BKF7	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATO
Q14FU4	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRAT1
Q5NEE1	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATT
A7JET7	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	A7JET7_FRATT
A7YUL5	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATM
A4IWC4	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATW
A0Q838	ELEDKFENMGAQIVKEVASKTADVAGDGTTTATVLAQALLTEGLKAVTAGMNPMDLKRGI	120	CH60_FRATN
	*****:***:*****		
A7NE88	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATF
P94798	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATH
Q0BKF7	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATO
Q14FU4	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRAT1
Q5NEE1	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATT
A7JET7	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	A7JET7_FRATT
A7YUL5	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATM
A4IWC4	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATW
A0Q838	DKATARLVEELKALSKPCSDPKSIEQVGTISANS DATV GKLIADAMAKVGKEGVITVEEG	180	CH60_FRATN
	*****:*****		

A7NE88	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATF
P94798	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATH
Q0BKF7	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATO
Q14FU4	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRAT1
Q5NEE1	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATT
A7JET7	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	A7JET7_FRATT
A7YUL5	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATM
A4IWC4	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP ILEGV	240	CH60_FRATW
A0Q838	KGFEDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFATNQENMTTDLNENPYILIVDKKISNIRDLLP VLEGV	240	CH60_FRATN
	***** : *****		
A7NE88	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATF
P94798	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATH
Q0BKF7	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATO
Q14FU4	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRAT1
Q5NEE1	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATT
A7JET7	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	A7JET7_FRATT
A7YUL5	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATM
A4IWC4	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATW
A0Q838	SKSGRALLIIAEDVESEALATLVVNNMRGVVKVCAVKAPGFGDRRKAMLEDIATLTGATF	300	CH60_FRATN

A7NE88	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATF
P94798	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATH
Q0BKF7	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATO
Q14FU4	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRAT1
Q5NEE1	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATT
A7JET7	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	A7JET7_FRATT
A7YUL5	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATM
A4IWC4	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVLVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATW
A0Q838	VSEDLSMKLEETNMEHLGTASRVQVTKDNTTIIIDGAGEKEAIAKRINVIKANIAEANSDY	360	CH60_FRATN

A7NE88	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATF
P94798	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATH
Q0BKF7	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATO
Q14FU4	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRAT1
Q5NEE1	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATT
A7JET7	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	A7JET7_FRATT
A7YUL5	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATM
A4IWC4	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATW
A0Q838	DREKLQERLAKLSGGVAVIKVGAVTEAEMKEKKDRVDDALHATRAAVEEGIVAGGGVALI	420	CH60_FRATN

A7NE88	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATF
P94798	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATH
Q0BKF7	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATO
Q14FU4	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRAT1
Q5NEE1	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATT
A7JET7	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	A7JET7_FRATT
A7YUL5	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATM
A4IWC4	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATW
A0Q838	RAQKALDGLTGENDDQNHGIALLRKAI EAPLRQIVSNAGGESSVVVNQVKANQGNYGNA	480	CH60_FRATN

A7NE88	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATF
P94798	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATH
Q0BKF7	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATO
Q14FU4	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRAT1
Q5NEE1	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATT
A7JET7	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	A7JET7_FRATT
A7YUL5	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	A7YUL5_FRATU
B2SFF8	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATM
A4IWC4	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATW
A0Q838	ANDTYGDMVEMGILDPTKVTRSALQHAASIAGLMITTEAMIGEIKEAAPAMPMPGGGMGGM	540	CH60_FRATN

<u>A7NE88</u>	PGMM	544	CH60_FRATF
<u>P94798</u>	PGMM	544	CH60_FRATH
<u>Q0BKF7</u>	PGMM	544	CH60_FRATO
<u>Q14FU4</u>	PGMM	544	CH60_FRAT1
<u>Q5NEE1</u>	PGMM	544	CH60_FRATT
<u>A7JET7</u>	PGMM	544	A7JET7_FRATT
<u>A7YUL5</u>	PGMM	544	A7YUL5_FRATU
<u>B2SFF8</u>	PGMI	544	CH60_FRATM
<u>A4IWC4</u>	PGMI	544	CH60_FRATW
<u>A0Q838</u>	PGMM	544	CH60_FRATN

*** :

Značka „*“ znamená, že je dané sekvenční místo shodné pro všechny porovnávané kmeny. Prázdné označení sekvenčního místa znamená velkou změnu AMK z fyzikálního hlediska (např. změna hydrofobní AMK za hydrofilní). Značka „:“ znamená nejmenší fyzikální změnu AMK (např. změna kyseliny za kyselinu). Další značkou „.“ je vyjádřena „střední“ fyzikální změna.