

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Imunoproteomika: „Klíčový přístup pro identifikaci nových vakcinačních antigenů proti  
bakteriálním infekcím.“

Lucie Štefanová

Bakalářská práce

2016

Prohlašuji:

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

Byl jsem seznámen 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.

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

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 25.6.2017

Lucie Štefanová

Poděkování:

Mé poděkování patří Mgr. Ph.D. Sylvě Janovské za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

## **ANOTACE**

Tato práce je zaměřena na identifikaci nových antigenů pomocí imunoproteomiky. Zabývá se novou ochranou proti bakteriálním infekcím a popisuje nové studie potenciálních kandidátů pro výrobu vakcín. Další částí této práce je popis základních imunoproteomických metod.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

vakcína, imunoproteomika, antigen, imunoproteomické metody

## **TITLE**

Immunoproteomics: „The key approach to identification of new vaccine antigens against bacterial infections.“

## **ANNOTATION**

This work is focused at identifying new antigens by imunoproteomics. It deals with a new protection against bacterial infections, and describes a new study of potential candidates for vaccine production. Another part of this work is to describe the basic imunoproteomických methods.

## **KEYWORDS**

vaccine, immunoproteomics, antigen, immunoproteomics methods

# OBSAH

0. ÚVOD .....	9
1. VAKCÍNY .....	10
1.1. DEFINICE.....	10
1.2. HISTORIE.....	10
1.3. SOUČASNOST .....	10
1.4. PŘEHLED HLAVNÍCH TYPŮ VAKCÍN.....	11
1.4.1. Živé oslabené vakcíny .....	11
1.4.2. Usmrcené vakcíny.....	11
1.4.3. Toxoidy.....	11
1.4.4. Subjednotkové a splitové vakcíny .....	12
1.4.5. Polysacharidové vakcíny .....	12
1.4.6. Rekombinantní vakcíny.....	13
1.4.7. DNA vakcíny.....	13
1.5. PŘÍPRAVA.....	14
1.5.1. Fáze přípravy vakcín .....	14
1.5.2. virus vakcinie – vektor pro přípravu vakcín .....	15
1.6. REVERZNÍ VAKCINOLOGIE .....	16
2. IMUNOPROTEOMIKA.....	18
2.1. PROTEOMIKA .....	18
2.1.1. Proteom .....	19
2.1.2. Genom .....	19
3. LABORATORNÍ METODY POUŽÍVANÉ V PROTEOMICE .....	20
3.1. DVOUROZMĚRNÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	20
3.2. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE .....	21
3.3. BIOAFINITNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE .....	23
3.4. SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (LC/MS) .....	24
3.4.1. Ionizace termosprejem (TSI) .....	25
3.4.2. Ionizace elektrosprejem.....	25
3.4.3. Chemická ionizace za atmosférického tlaku.....	26
3.5. PROTEINOVÉ ČIPY .....	26
3.5.1. Čipy studující funkce proteinů.....	27
3.5.2. Čipy detekující proteiny .....	28

4. IMUNOPROTEOMICKÝ PŘÍSTUP PRO IDENTIFIKACI NOVÝCH VAKCINAČNÍCH ANTIGENŮ PROTI BAKTERIÁLNÍM INFEKČÍM .....	29
4.1. STREPTOCOCCUS PNEUMONIE .....	29
4.1.1. NÁVRH ÚČINNĚJŠÍ IMUNOPROTEOMICKÉ ALTERNATIVY .....	29
4.2. BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI A OSTATNÍ ČLENOVÉ RODU BURKHOLDERIA .....	30
4.2.1. <i>Návrh vakcíny proti Burkholderia pseudomallei</i> .....	31
4.3. NEISSERIA MENINGITIDIS .....	32
4.3.1. <i>Vakcína proti sérotypu B</i> .....	33
4.4. BORDETELLA PERTUSSIS.....	35
4.4.1. <i>Návrh nové vakcíny proti černému kašli</i> .....	35
5. ZÁVĚR.....	37
6. POUŽITÁ LITERATURA .....	38

## SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1. Schéma popisující složení DNA vakcín.....	14
Obrázek 3. Popis pracovního postupu dvourozměrné gelové elektroforézy; ukázka proteinových map. ....	21
Obrázek 4. Schéma hmotnostní spektrometrie. ....	23
Obrázek 5. Popis eluce v afinitní chromatografii. ....	24
Obrázek 6. Schéma LC/MS. ....	25
Obrázek 7. Schéma proteinových čipů. ....	27

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

CI	chemická ionizace
DIK	diseminovaná intravaskulární koagulace
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTaP	kombinace anatoxinů záškrtu a tetanu
EF-Tu	elongační faktor Tu
EI	elektronová ionizace
ESI	ionizace elektrosprejem
FHA	vláknitý hemaglutin
fHbp	H faktor vázající protein
GC/MS	propojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GNA	genomově odvozený antigen
ICR	iontově cyklotronová rezonance
LC/MS	spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MenB	meningokok sérotypu B
NadA	neisseriální adhezní protein
NHBA	neisseria heparin vázající protein
SELDI-MS	„surface-enhanced laser Desorption/Ionisation
TK	thymidinkináza
TOF	Time of light
6-PDG	6-fosfoglutamát dehydrogenáza
4CMenB	4-komponentní meningokoková vakcína



## 0. ÚVOD

Vakcíny jsou důležitým ochranným prvkem ať už proti bakteriální nebo virové infekci. Mnoho druhů vakcín bylo vynalezeno už před několika desítkami let, a proto je nutné tyto vakcíny přezkoumávat z hlediska účinnosti. Čím dál více mikroorganismů se stává rezistentními a proti některým závažným infekcím nebyla dosud vakcína vynalezena. Jiné vakcíny nejsou vhodné pro určité osoby či určitou věkovou skupinu. Tyto problémy se v poslední době snaží vyřešit reverzní vakcinologie s imunoproteomikou.

Genomový přístup ke konstrukci vakcín, nazýván také jako reverzní vakcinologie, začíná stanovením kompletní genomové sekvence. Z této sekvence se predikují nové antigeny a celý proces končí testováním imunogenity na zvířecích modelech. Další slibné možnosti uplatnění reverzní vakcinologie můžeme nalézt u mnoha dalších bakterií, u kterých byla stanovena kompletní genomová sekvence. Využití tohoto postupu se zvažuje i u virů, na které klasický postup nelze uplatnit. Přelomovým objevem byla vakcína Bexsero její užívání se vztahuje na všechny státy Evropské unie. Tato vakcína je první, která byla vyrobena metodou reverzní vakcinologie a chrání proti meningokoku typu B. Tento úspěch odstartoval vlnu intenzivního výzkumu a hodnocení mnoha nových vakcín.

Imunoproteomika je vhodná technika umožňující identifikaci potencionálních kandidátů pro přípravu vakcíny proti různým patogenním bakteriím. Tyto nově vytvořené vakcíny by mohly v budoucnosti hrát velmi významnou roli v obraně proti virulentním patogenům. Imunoproteomika kombinuje metody proteomové analýzy s detekcí imunoreaktivních antigenů za použití sér pacientů.

# 1. VAKCÍNY

## 1.1. Definice

Při aktivní imunizaci uměle vpravujeme do těla mikrobiální antigeny v podobě očkovacích látek neboli vakcín, tím docílíme vzniku imunologické paměti a následného vyvolání tvorby dlouho žijících paměťových lymfocytů (Beneš, 2009; Podstatová, 2001).

## 1.2. Historie

Zakladatelem aktivní imunizace byl Edward Jenner, který na konci 18. století používal obsah puchýřků kravských neštovic a přenášel ho na zdravé jedince s cílem vyvolat u nich přirozenou ochranu proti pravým neštovicím (Hořejší, Bartůňková, 2009; Ferencík, c2011). Zároveň po imunizaci vznikaly i buňky paměťové, které zajistily při opakovaném setkání a antigenem mnohem rychlejší a silnější reakci (Ryšková, 2000).

Slovo vakcína pochází z latiny a je odvozeno od slova vacca neboli kráva a souvisí s Jennerovým objevem očkování proti pravým neštovicím tekutinou z puchýřků kravských neštovic (Votava, c2010). Tyto vakcíny nevšedním způsobem zasáhly do zdravotního stavu lidí a díky jim byly úspěšně vymýceny mnohé nebezpečné choroby. Jako příklad nám poslouží eradikace pravých neštovic, proti kterým bylo zavedeno očkování v roce 1798. Převážně se jednalo o celobuněčné vakcíny s usmrcenými nebo oslabenými patogeny, nyní jsou známé i vakcíny jiného typu.

## 1.3. Současnost

Novodobé vakcíny se značně odlišují od vakcín původních. Vakcíny používané pro očkování osob musí být účinné, bezpečné, stabilní a ekonomicky dostupné. Nejvíce užívaným typem podání je intradermální nebo subkutánní aplikace, ale také podání vakcíny perorálně je výhodné u některých typů vakcín, to kvůli imunitnímu systému střeva. V současné době je zesílení imunity za pomoci vakcín součástí projektu Světové zdravotnické organizace. Cílem imunizačního programu je eradikace některých onemocnění, avšak celosvětově je úroveň imunizace stále nedostatečná (Ryšková, 2000).

## **1.4. Přehled hlavních typů vakcín**

### **1.4.1. Živé oslabené vakcíny**

Tyto vakcíny jsou připraveny z bakteriálních nebo virových kmenů, které byly opakovaně pěstovány na kultivačním médiu, tím ztratily svoji patogenitu, ale zachovaly si své antigenní vlastnosti (Göpfertová, Šejda, 1997). Původce onemocnění je tedy méně virulentní a nemá schopnost vyvolat onemocnění, ale schopnost navodit imunitu mu zůstala ponechána. Živé oslabené neboli atenuované vakcíny jsou velmi účinné, imunitní odpověď je dlouhodobá a dostatečně kvalitní. Avšak může dojít ke změně nepatogenní formy vakcinačního mikroorganismu v patogenní nebo jeho účinek může být pro imunodeficitní imunizované osoby patogenní. Nyní se tyto nežádoucí účinky řeší genetickou manipulací. Genetická manipulace odstraní geny, které způsobily opětovnou virulenci. (Votava, c2010). Tento typ vakcín se používá při očkování proti poliomyelitidě, tuberkulóze, spalničkám, příušnicím a zarděnkám. (Ryšková, 2000).

### **1.4.2. Usmrcené vakcíny**

Tyto vakcíny můžeme také označit jako inaktivované. Obsahují suspenze usmrcených bakterií, neboli bakteriny (Göpfertová, Šejda, 1997). Mikroorganismy jsou šetrně usmrcené teplem nebo formolem tak, aby si zachovaly protekční antigeny, ale zároveň jsou zbaveny schopnosti vyvolat onemocnění, navození imunity zůstává zachováno (Ryšková, 2000; Votava, c2010). Avšak vzhledem k reziduálním složkám nelze vyloučit riziko vedlejších reakcí jako je třeba vyvolání reakce zpožděné hypersenzitivy, kterou vyvolávají povrchové endotoxiny inaktivované pertusové složky (Petráš, Lesná, 2010). Vedlejší reakce můžeme sledovat u podání celovirové chřipkové vakcíny. Aplikace těchto vakcín musí být stále opakována, jelikož počas retence imunogenu v těle imunizované osoby je poměrně malý. Ze stejného důvodu se většina těchto vakcín připravuje s minerálním nosičem, ten zvýší retenční čas imunogenu a zvyšuje tím imunitní odpověď. (Votava, 2005).

### **1.4.3. Toxoidy**

Toxoid neboli anatoxin je bakteriální toxin, který je nejčastěji za pomoci formalinu zbaven částečně či úplně toxicity (Ryšková, 2000). Je však antigenně shodný s výchozím

toxinem, a proto protilátka, která vznikla na jeho popud je schopna toxin zneutralizovat. Pro dosažení většího počtu protilátek se toxoidy vážou na různé nosiče, které se nazývají adjuvans (Votava, c2010, s. 131-137; Göpfertová, 2002). Obvykle je toxoid navázán na hydroxid hlinitý. K zajištění spolehlivé imunizace je nutno očkovat několika dávkami po sobě a ve stanovených intervalech přeočkovávat (Votava, 2005). Nejdůležitějšími toxoidy jsou očkovací přípravky proti tetanu, záškrtu a botulismu, které v organismu navozují tvorbu antitoxických protilátek. Tetanický toxoid se užívá při pravidelném očkování proti tetanu, ale i profylakticky u všech poranění, u kterých je podezření infekce původcem tetanu (Göpfertová, 2002; Celer, Lesná 2010).

#### **1.4.4. Subjednotkové a splitové vakcíny**

Vakcíny tohoto typu jsou látky, které se připravují tak, že se rozštěpí virová partikule a ta se poté vyčistí. Po odstranění toxických částí proteinu viru se sníží virulence (Göpfertová, Šejda, 1997). Tyto vakcíny obsahují pouze inaktivované antigeny mikroorganismů, které zaručí tvorbu ochranných protilátek. Zvýšení imunogenity docílíme tak, že navážeme některé složky z bakteriálních buněk. Typickým zástupcem je vakcína proti chřipce nebo vakcína proti hepatitidě B (Ryšková, 2000).

#### **1.4.5. Polysacharidové vakcíny**

Do této skupiny patří očkovací látky namířené proti *Haemophilus influenzae* typu b. Vakcína obsahuje kapsulární polysacharidový antigen, který je pro zvýšení imunogenity u malých dětí vázaný na proteinový nosič. Tímto způsobem byla vytvořena první konjugovaná polysacharidová vakcína. Dále zde můžeme zařadit vakcínu proti onemocnění, které je vyvoláno *Neisseria meningitidis* skupiny A a C. Dalšími zástupci jsou vakcíny namířené proti pneumokokovým infekcím, ty obsahují purifikované polysacharidy z 23 nejčastějších typů *Streptococcus pneumoniae* a vakcína proti břišnímu tyfu obsahující kapsulární antigen Vi. Výhodou těchto vakcín je, že se protilátky proti kapsulárním polysacharidům tvoří velice rychle, na druhé straně však polysacharidové antigeny reagují přímo s receptorem B-buněk a nevzniká imunologická paměť. (Votava, c2010; Podstatová 2001).

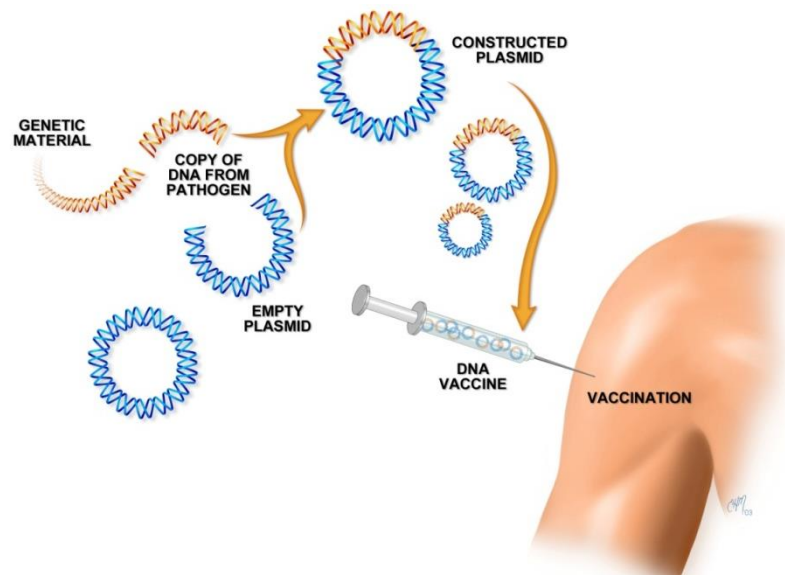
#### 1.4.6. Rekombinantní vakcíny

Pokud se chemovakcíny vytváří za pomoci geneticky upravených mikroorganismů, nejčastěji z kvasinek či *Escherichia coli* a do nich byl poté vložen gen pro tvorbu konkrétního antigenu, nazýváme tyto vakcíny rekombinantními (Votava, c2010). Rekombinantní vakcíny jsou novodobé a kvalitní ochranné očkovací látky. Jsou zhotovené metoda mi genového inženýrství, tím že do buněk je přenesena genetická informace kódující protektivní antigen patogenního organismu (Göpfertová, Šejda, 1997; Göpfertová, 2002). Tato metoda se využívá při přípravě vakcíny proti hepatitidě B. (Peutherer, et al., 1999).

#### 1.4.7. DNA vakcíny

DNA vakcíny jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu a jsou považovány za vakcíny budoucnosti. O vytvoření DNA vakcíny se vědci začali pokoušet poté, co byly analyzovány mikrobiální genomy. Tento druh vakcín je v experimentální fázi, ale už nyní se ukazují jako velice slibné a několik typů již začalo být klinicky testováno. Bylo zjištěno, že poté co jsou zavedeny geny kódující cílové antigeny do hostitelských buněk, začnou buňky produkovat příslušné antigeny a zároveň je zobrazují na svém povrchu (Obrázek 1.). Zjednodušeně řečeno, se vlastní buňky těla stávají továrnami pro tvorbu antigenu, který je nezbytný pro navození imunity (Josefsberg, Buckland, 2012).

DNA vakcína by měla vytvořit silnou protilátkovou odpověď a zároveň stimulovat buněčnou odezvu proti mikrobiálním antigenům. Další výhodou DNA vakcíny je fakt, že vakcína nemůže podléhat mutacím, jelikož neobsahuje mikroba, který způsobuje onemocnění. Tyto vakcíny se do těla vpravují injekčně klasickým způsobem nebo se zařízením bez jehly jehly-less, které používá vysokotlaký plyn vystřelující mikroskopické částice ze zlata potažené DNA přímo do hostitelských buněk. Ve vývoji je řada DNA vakcín, a to proti hepatitidě B a C, HIV, chřipce, lidským papilomavirům a malárii, (Vaccines.gov; Votava, 2005; Abbas, Lichtman, Pillai, c2012). Budoucnost přípravy některých vakcín bude možná spočívat v relativně jednoduchém klonování DNA, místo nynějšího složitějšího kultivování mikrobů (Jílek, 2008).



Obrázek 1. Schéma popisující složení DNA vakcín.

## 1.5. Příprava

Příprava vakcín probíhá ve speciálních farmaceutických továrnách, kde se vyrábí ve velkém množství. Vše probíhá za přísných hygienických podmínek a dodržování sterility. Výrobě vakcín však předchází testování vakcíny. Testování zahrnuje tři kroky. Prvním krokem je podmínka, že vakcína musí být bezpečná a musí být stanoveny všechny nežádoucí a neočekávané účinky. Druhým krokem je zjištění správnosti účinku vakcíny, jinými slovy vakcína musí dělat to co dělat má. Třetí krok je doplněním kroku dva, kdy se zjišťuje na kolik procent je vakcína účinná. Po pečlivém testování se stanoví výrobní procesy, aby byla zajištěna dostatečná a bezpečná výroba. Obecně se dá příprava vakcín rozdělit na čtyři hlavní části (Očkovacie noviny, 2012; How products are made).

### 1.5.1. Fáze přípravy vakcín

Prvním krokem za účelem výroby vakcíny je získání antigenu, který vyvolává imunitní reakci. Pro tento účel jsou pěstovány a sklizeny různé mikroorganismy, které poté použijeme při dalším zpracování. Viry se pěstují na primárních buňkách, mezi které patří například buňky z kuřecích embryí nebo speciálně upravené buněčné linie které patogen reprodukuje opakovaně. Bakterie jsou pěstovány v bioreaktorech, které optimalizují podmínky pro jejich růst. Rekombinantní proteiny odvozené od patogenu jsou generovány z kvasinek, bakterií či buněčných kultur (Vaccines Europe; News medical, 2012).

Cílem druhého kroku je oddělit antigen a izolovat ho od proteinů a dalších částí růstového media. Tyto činnosti se provádí za použití různých technik pro purifikaci proteinů. Čištění zahrnuje několik separačních stupňů, které se provádí na základě velikosti, fyzikálně-chemických vlastností, vazebné afinity nebo biologické aktivity proteinu. Výsledkem je vysoká kvalita a čistota antigenu (Vaccines Europe).

Předposlední částí výroby je konečná formulace vakcíny. Každá vakcína obsahuje jistý typ nosiče, který umožní lepší přijetí antigenu organismem. Opět se v závislosti na typu látky do konečné podoby přidávají stabilizátory, přídavné látky a konzervační látky. Úkolem přídavných látek je zlepšit imunitní odpověď organismu. Stabilizátory a konzervační látky zvyšují trvanlivost a stabilitu očkovací látky (Očkovacie noviny, 2012; News medical, 2012).

Předtím než je vakcína připravená k použití podstupuje poslední fázi výroby a tou je kontrola. Kontrola ve všech farmaceutických továrnách probíhá několikanásobně. Vakcíny jsou kontrolovány jak strojově tak i manuálně. Při každé šarži se laboratorně kontroluje kvalita obsahu a při sebemenším podezření se celá šarže vakcín bezpečně likviduje. Po mnohočetné kontrole, je balení vysláno do distribučního řetězce. Výrobek je třeba chránit proti vzduchu, vodě a proti kontaminaci člověkem (Očkovacie noviny, 2012; News medical, 2012).

### **1.5.2. virus vakcínie – vektor pro přípravu vakcín**

Virus vakcínie (VAVC) je proslaven díky vakcíně proti jeho příbuznému viru variola, který je původcem černých neštovic. Tento virus se zasloužil o vymýcení pravých neštovic, a tím bylo toto onemocnění zcela zastaveno (History of vaccines). Genom tohoto viru umožňuje ztrátu až 25 000 párů bazí, a to bez rušivého vlivu na jeho funkčnost. Tyto „ztracené“ geny se dají nahradit genovou manipulací, rekombinací a transfekcí, geny cizími, což zapříčiní vznik nového rekombinantního kmene viru a ten při infekci buňky geneticky příbuzným kmenem poxviru exprimuje cizí geny. Jestliže se nakazí buňka více než jedním kmenem poxviru, který je zároveň i geneticky příbuzný, dojde mezi nimi k rekombinaci. Rekombinace můžeme dosáhnout i tehdy, když transfekcí vpravíme jeden virový genom jako izolovanou DNA. Do určité oblasti genomu vakcínie jsou rekombinací vloženy cizí geny, které mají za úkol najít thymidinkinázu (TK), ta není pro buňku nezbytná. Aby došlo k expresi genu, musí se úsek DNA s určitými geny vložit do oblasti TK, která sousedí s promotorem viru vakcínie. Tato DNA se vloží do buňky nakažené virem vakcínie. Po

vložení probíhají změny v DNA, ty spočívají v jejím rozštípnutí a následnému připojení k jinému řetězci, tak získáme nové požadované vlastnosti. Jelikož se do genu vložil TK, stavá se nefunkčním. Tento rekombinantní virus je identifikován selekcí na nepřítomnost funkce TK. Takto jsou zhotoveny rekombinantní kmeny vakcínie, které vlastní až čtyři cizí geny a ty mají za úkol kódovat antigeny bakterií, virů a protozoí (Peutherer, et sl., 1999).

Předností této výroby vakcín je příznivá cena, snadná aplikace, také použití různých antigenů, možnost zhotovení polyvalentních vakcín. Takto zhotovené polyvalentní vakcíny by mohli po aplikaci jedné injekce poskytovat ochranu proti několika nemocem najednou. Nevýhodou je však povaha viru, jeho použití obnáší určité komplikace. Jednou z komplikací je progresivní vakcínie, která způsobí smrtelné infekce, zvláště nebezpečná je u osob s imunodeficitem. Tyto nevýhody znemožňují použití vakcínie jako vektoru antigenů. Novodobý výzkum je zaměřen na modifikaci virulence viru, optimalizaci exprese genů a zvýšení imunogenity. Nyní se rekombinantní vakcína používá pro očkování zvířat, například se užívá k očkování lišek, kdy je podávána spolu s návnadou (Peutherer, et sl., 1999).

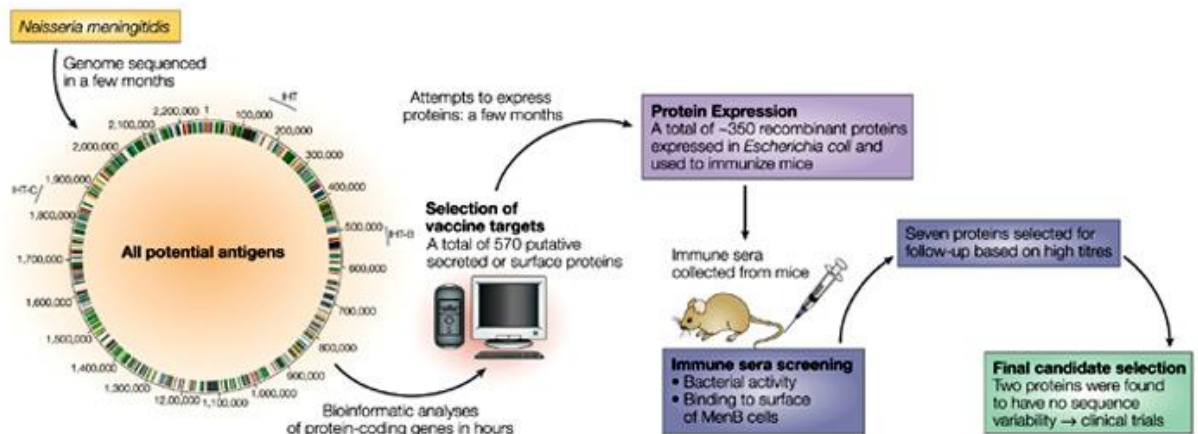
## 1.6. Reverzní vakcinologie

Tato metoda je novým neboli genomovým přístupem ke konstrukci vakcín. Reverzní vakcinologie je zároveň velikou průkopnickou změnou v oblasti konstrukce vakcín, zároveň nám poskytuje nové možnosti k určení nových antigenních uchazečů pro vývoj vakcín.

Výchozím bodem metody reverzní vakcinologie je sekvenovaný genom patogenního organismu. Dříve určení genomu trvalo 18 měsíců, dnes jsme schopni sekvenci genomu získat během několika dnů až týdnů (Dennehy, McClean, 2012). Druhým krokem je použití mnoha algoritmů pro určení proteinů, které by mohly v lidském hostiteli vyvolat imunitní odpověď. Dalším krokem v procesu je produkce rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*. Vybrané proteiny jsou exprimovány ve vysokých hladinách, purifikovány a použity v imunizačních experimentech na zvířecích modelech. Imunní séra jsou odebrána a testována na jejich schopnost vázat se na povrch buněk a na schopnost vyvíjet bakteriocidní aktivitu. Séra, která mají titry všech testů vysoké, jsou podrobeny konečným testům zahrnující hodnocení rozsahu variability proteinové sekvence těchto proteinů v rámci velkého počtu izolátů (Obrázek 2.) (Fraser, 2004).



První patogen, proti kterému byla vyrobena vakcína metodou reverzní vakcinologie je *Neisseria meningitidis* séro skupiny B. Tyto vakcíny se mohou uplatnit při výrobě dalších vakcín proti onemocněním, která jsou způsobena bakteriemi, ale také virovým agens. Hlavním propagátorem metody reverzní vakcinologie a objevitelem vakcíny proti meningokokové séro skupině B je Rino Rappuoli, PhD, který se proslavil prací s očkovacími látkami a v imunologii (Delany, et al., 2013). Reverzní vakcinologie se zabývá přípravou vakcín za použití genomické informace a bioinformatických nástrojů. S narůstajícím problémem antimikrobiální rezistence nebo s problematikou nově se objevujících patogenů roste potřeba vývoje nových očkovacích látek. Kromě těchto problémů, je zapotřebí výměna několika vakcín, kvůli účinnosti a bezpečnosti (Delany, et al., 2013).



Obrázek 2. Schéma reverzní vakcinologie.

## 2. IMUNOPROTEOMIKA

Zvýšení rezistence bakterií vůči antibiotikům a mnohdy i nedostatek antimikrobiálních látek, silně zdůraňuje význam profylaktické léčby, která zabrání potenciální infekci bakteriálními patogeny. (Fleischhackerová, et al., 2014). Očkování snížilo výskyt řady závažných onemocnění, včetně respiračních bakteriálních infekcí. Nicméně, existuje řada patogenů, proti kterým není k dispozici vakcína nebo vakcíny nejsou vhodné či účinné pro všechny věkové skupiny nebo pro lidi s oslabenou imunitou. Imunoproteomika je účinná technika, která se používá k identifikaci potenciálních kandidátů pro výrobu vakcín namířených proti patogenním bakteriím. Kombinace proteomiky s detekcí imunoreaktivních antigenů za použití séra, zdůrazňuje imunogenní proteiny, které jsou exprimovány v průběhu infekce. Imunoproteomika je tedy důležitá technologie k identifikaci nových potenciálních antigenů pro přípravu vakcín (Pizza et al., 2000).

### 2.1. Proteomika

Proteomika se řadí mezi nejvíce produktivní obory přírodních věd. Díky rozvoji molekulární biologie, genomiky, bioinformatiky, spektroskopických a separačních metod, se zdokonalila analýza nukleových kyselin, separace a charakterizace bílkovin (Chmelík, 2005). Také se zrychlila identifikace bílkovin tím, že se zapojila výpočetní technika k vyhodnocování a zpracování dat získaných hmotnostní spektrometrií. Proteomika je tedy obor, který je zaměřen na systematickou analýzu bílkovin z hlediska jejich totožnosti, množství a funkcí. Cílem je stanovit a popsat role bílkovin v procesech, které probíhají v živých organismech. Tento cíl zahrnuje identifikaci proteinů, interakce bílkovin s jinými látkami, kvalitativní i kvantitativní stanovení změn složení bílkovin během biologických procesů atd. Největší překážka proteomiky je vysoká proměnlivost proteomu během růstu, diferenciaci, nemoci a stárnutí organismu (Kovářová, 2005). Využití proteomiky nalezneme i v medicíně (studie příčin a mechanismu chorob), průmyslu (technické enzymy), farmacii (výzkum nových léčiv), ochraně životního prostředí (odstranění škodlivin enzymy) a v zemědělství (pěstování odolnějších a výnosnějších odrůd) (Cash, et al., 1999).

### **2.1.1. Proteom**

Veškeré živé buňky mají společný charakterový rys, a to ten, že jsou tvořeny nukleovými kyselinami a bílkovinami. Nukleové kyseliny jsou zodpovědné za dědičnou výbavu buňky neboli genom. Proteiny mají na rozdíl od nukleových kyselin funkce více rozmanité, příklady funkcí je řízení výměny látek, energie a informací (Kovářová, 2005). Poprvé byl tento pojem proteom použit M. Wilkinsem na konferenci v Sieně roku 1994. Proteom je kompletní soubor veškerých proteinů, které jsou produkovány určitou buňkou, tkání či organismem, zpravidla je kompletní proteom větší než celkový genom. Proteom je větší z důvodu modifikací proteinů během jejich syntézy pozměněny fosforečnými nebo cukernými skupinami (Westermeier, Naven, 2002; Tosová, et al., 2005; Wilkins, et al., 1995). Proteom dále můžeme dělit na buněčný a kompletní. Buněčný proteom je skupina proteinů, která se v určitou dobu nalézá v buňce nebo buněčném typu za přímo daných podmínek. Kompletní proteom je soubor proteinů v celém mnohobuněčném organismu, tím se rozumí součet všech proteomů všech buněčných typů. Do tohoto typu jsou také řazeny proteiny, které se v organismu pouze vyskytují, ale v danou chvíli vytvářeny nejsou (Kovářová, et. al., 2005).

### **2.1.2. Genom**

Genom je soubor veškerých nukleových kyselin, které jsou zodpovědné za buněčnou dědičnost a také za kódování struktury i funkčních projevů buňky (Weiser, et al., 2005). Úplná genetická informace daného organismu se získá sekvenováním deoxyribonukleové kyseliny a stanovením funkce jednotlivých genů (Wasinger et al., 1995). Hlavním zájmem genomiky jsou zejména bakterie, ty jsou původci řady infekčních onemocnění (Weiser, et al., 2005). Určení genomu je zjevným pokrokem, který umožňuje více porozumět molekulární podstatě funkce živých systémů, což nejspíše povede i k terapii do této doby těžko překonatelných chorob (Wasinger et al., 1995).

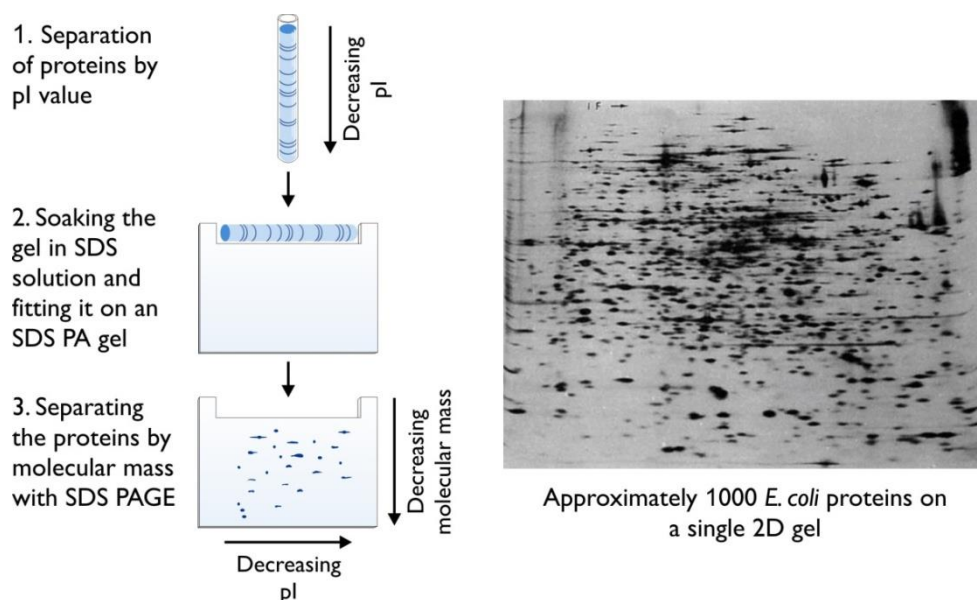
### **3. LABORATORNÍ METODY POUŽÍVANÉ V PROTEOMICE**

Od roku 1994, kdy byl termín proteomika poprvé použit se svět analytických technik používaných k identifikaci bílkovin výrazně změnil. Ačkoli klíčové technologie jako je dvourozměrná gelová elektroforéza a hmotnostní spektrometrie již existovaly, jen několik laboratoří na světě byly připraveny přijmout nové výzvy. Za několik let později se tyto metody staly dostatečně citlivé k identifikaci proteinů (Meyer, 2003-8-1; Henzel, et al., 1993). Nyní se vyskytuje veliké množství sekvenčních dat popisujících struktury stále většího počtu genomů, jak prokaryontních, tak i eukaryotních organismů. To vyžaduje efektivní a vysokokapacitní techniky, které umožňují přiřadit funkci k jednotlivým genovým strukturám a díky tomuto se objasní jejich vzájemná interakce a v poslední řadě i kontrola jejich exprese (Halada, et al., 2005). Typy rozsáhlých experimentů prováděných v oboru proteomiky vyžadují specializované nástroje. Ve všech velkých experimentech je třeba automatizace. Nacházení způsobu miniaturizace a robotizace těchto experimentů je sledováno ve všech oblastech funkční genomiky a proteomiky. Technologicky některé proteomické experimenty zahrnují mnoho známých laboratorních postupů, které jsou zefektivněny tak, aby byl zaznamenán celý rozsah proteomů (De Hoog, Mann, 2004).

#### **3.1. Dvourozměrná gelová elektroforéza**

Neodmyslitelnou součástí analytické proteomiky je dvourozměrná gelová elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Imobilizované pH gradienty vyřešily velký problém reprodukovatelnosti prvního rozměru a vylepšily dělení bazických proteinů. Dále je zdokonalována účinnost solubilizace membránových proteinů, avšak přetrvávají problémy s hydrofobními proteiny nebo s proteiny o extrémní velikosti či pI. Další nevýhodou této metody je její časová náročnost a pracnost celého procesu. Ten také vyžaduje specifické dovednosti a zručnost pro tvorbu kvantitativně a prostorově reprodukovatelných gelů. Problém detekce a pojmenování proteinů, které se v buňce vyskytují v malých koncentracích, může být vyřešen předčištěním komplexních proteinových směsí. Předčištění zvyšuje počet málo se vyskytujících proteinů vůči proteinům ostatním (Righetti, et al., 2003; Holčápek, 2001; Gorg et al., 1988; Gorg et al., 1987; Gorg et al., 1987). Vyhodnocování velkého množství proteinových map se uskutečňuje za pomoci počítače, toto vyhodnocení je nezbytné pro objasnění různých biologických procesů. Vyhodnocování je neustále zlepšováno a automatizováno díky novému programovému vybavení, ale stále se vyžaduje určitého

manuálního zásahu (Kovářová, 2005). Teoreticky může být na jediném gelu rozlišeno až 10 000 skvrn (Klose, Kobalz, 1995; Jenkins, Pennington, 2001). Tato metoda je využívána k separaci bílkovin ale i k zobrazení dvourozměrných map bílkovin (Obrázek 3.), které jsou uplatňovány v proteomické charakterizaci organismů, tkání, buněk a metabolických procesů (Bouchal, Kučera, 2003; Váňa, Marda, 2004; James et al., 1993).



Obrázek 3. Popis pracovního postupu dvourozměrné gelové elektroforézy; ukázka proteinových map.

### 3.2. Hmotnostní spektrometrie

Přibližně od druhé poloviny devadesátých let zaujala organická hmotnostní spektrometrie zcela výrazné postavení mezi analytickými metodami, které byly využívány v biologických vědách, a tím se podílely na vzniku proteomiky (Králová, 2001; Julák, 1998). Dynamický rozvoj analytické proteomiky mohl být dále rozvíjen díky zlepšování hmotnostní spektrometrie. A to zejména využitím nových ionizačních technik Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI), za tyto pokroky byla udělena v roce 2002 Nobelova cena (Zdráhal, et al., 1997). Hmotnostní spektrometrie je metoda určující hmotnost atomu, molekul a molekulových fragmentů po jejich rozložení na ionty. Princip hmotnostní spektrometrie spočívá v interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří hlavních částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic (Obrázek 4.) (De Hoffmann, 2007; Dass, 2007; Gross, 2011; Cole, 2010; Hamdan, Righetti, 2005).

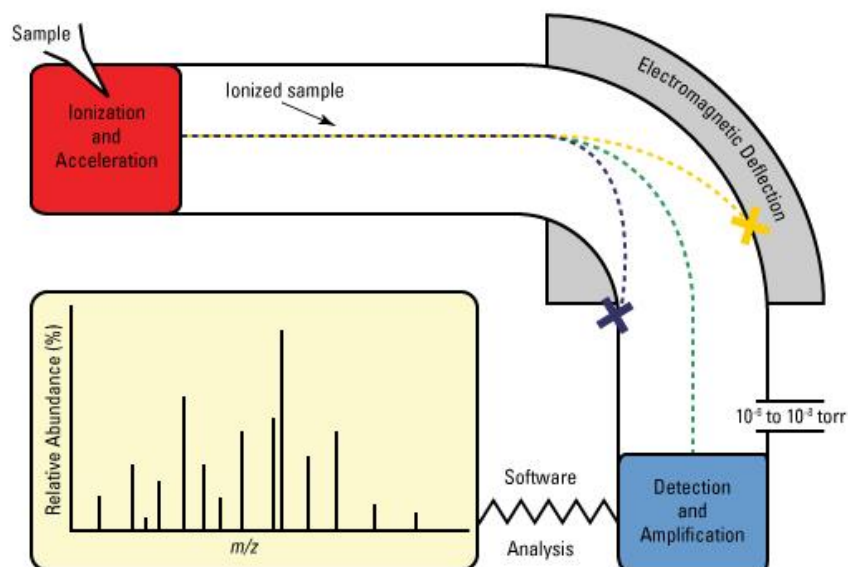
Ionizační techniky lze rozřadit do dvou hlavních skupin na měkké a tvrdé. Toto dělení je založeno na množství dodané energie při ionizaci. Zdrojů jsou nyní desítky, například elektronová ionizace, elektrosprej a MALDI. Iontové zdroje vyrábí ionty v plynné fázi, které se někdy po svém vzniku fragmentují. Z analytu, který vstupuje do iontového zdroje, vznikají buď kladně, nebo záporně nabitě částice (Králová, 2001).

Druhou částí jsou hmotnostní analyzátory, zde dochází k separaci iontů. Separace se provádí na základě poměru hmotnosti k náboji. Analyzátory využívají statické nebo dynamické elektrické nebo magnetické pole, možné je využít pole i v kombinaci. Rozlišujeme několik skupin analyzátorů. Mezi první skupinu řadíme skenující analyzátory. Skenující analyzátory, jako je třeba kvadrupólový analyzátor, nepřetržitě v čase oddělují a vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou hmotnost/náboj. Další skupina jsou analyzátory s transmisí všech iontů do letové trubice najednou. V letové trubici pak nastane jejich separace na základě rozdílné doby letu k detektoru. Mezi tuto skupinu analyzátorů řadíme Time of flight (TOF) analyzátor neboli průletový analyzátor. Poslední skupinou jsou v cele či pasti ionty zachycující analyzátory. Zástupci této skupiny jsou iontové pasti, ICR (iontově cyklotronová rezonance) nebo elektrostatická iontová past. (Králová, 2001; De Hoffmann, 2007; Dass, 2007; Gross, 2011; Cole, 2010).

Poslední částí hmotnostního spektrometru je detektor. Tato část má za úkol zaznamenat signál iontů, které jsou vybrány analyzátozem, a poté ho převést do digitální formy. Obecně detektory dělíme do dvou skupin. Rozdělení je uskutečněno podle schopnosti záznamu iontu na detektory, které zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na velikosti hmotnost/náboj a na detektory, které zadrží ionty pomocí napětí na elektrodách a následně je analyzuje. První skupina detektorů je založena na přímém měření elektrického proudu. Tento proud vzniká při srážení iontu s dynodou a dále je zesilován pomocí násobičů, tento princip využívají elektronové násobiče. Do druhé skupiny detektorů spadají iontová cyklotronová rezonance nebo elektrostatická iontová past. Tato skupina detekuje ionty jako celkový proudový obraz všech iontů s rozdílnými hodnotami hmotnost/náboj. To vše se děje díky indukci proudu, která má za následek pohyb iontů v hmotnostním spektrometru (De Hoffmann, 2007; Dass, 2007; Gross, 2011; Cole, 2010).

Nyní je hmotnostní spektrometrie hojně využívána ve velkém množství odvětví lidské činnosti. Nepostradatelná je ve farmaceutickém průmyslu, kde se využívá ke sledování kvality. Také v toxikologii má velké využití při analýze léků, drog a jejich metabolitů. Touto

metodou lze i monitorovat hladiny terapeutických léků nebo diagnostikovat dědičné metabolické poruchy (De Hoffmann, 2007; Dass, 2007; Gross, 2011; Cole, 2010).

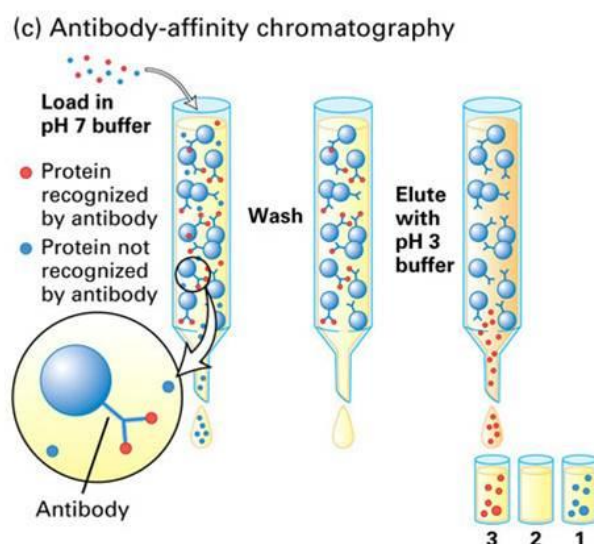


Obrázek 4. Schéma hmotnostní spektrometrie.

### 3.3. Bioafinitní kapalinová chromatografie

Tento druh chromatografie se řadí mezi jednu z mnoha metod, která umožní izolovat bílkoviny pro protetické účely (Madera, et al., 2005; Opitck, Schefflet, 2004; Baumann, Meri, 2004). Tato metoda využívá biospecifické interakce, vznikající při interakci molekul, z nichž alespoň jedna je biopolymer. Základem bioafinitní chromatografie, někdy nazývanou jako bioselektivní adsorpce, jsou reversibilní interakce mezi dvěma biologicky aktivními substancemi. Tyto substance mají mezi sebou vzájemnou afinitu, příkladem je afinita mezi enzymem a substrátem při enzymové reakci. Bioafinitní chromatografie využívá tendenci dvou samotných molekul tvořit biospecifické komplexy, jinými slovy interagovat. Všechny separované molekuly specificky rozpoznají jinou biomolekulu, tato biomolekula je ve většině případů menší. Rozpoznaná molekula se označuje jako ligand. Tento ligand je imobilizován na inertním nosiči a umístěn v koloně, kde protéká látka, kterou chceme separovat. Separovaná látka vytváří v komoře s ligandem komplex biomolekula-bioligand a tím je zadržena. Látky, které se na ligand nevážou, projdou kolonou. Ligand, který je imobilizovaný, působí tedy jako adsorbent se specifickou afinitou k separovanému analytu, a proto se bioafinitní chromatografie řadí mezi chromatografie adsorpční. Biomolekula, která zůstala

zachycená v koloně, se uvolní elucí buď specificky (volným ligandem nebo kompetující molekulou) nebo nespecificky (změnou podmínek – pH, iontové síly, teploty). Při těchto elucích se komplex biomolekula-bioligand stává nestabilní a rozpadá se, biomolekula poté vychází z kolony (Obrázek 5.). Výhodou této metody je vysoká spolehlivost a značná čistota separované látky. Interakce, které tato technika využívá, však musí být stejné nebo podobné těm, které se vyskytují v přírodě (Holčapek, 2001).



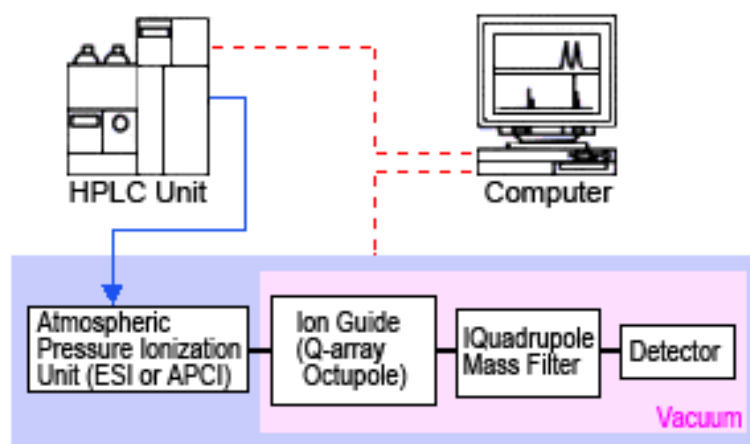
Obrázek 5. Popis eluce v afinitní chromatografii.

### 3.4. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

Jednou z vysoce účinných a nejvíce využívaných analytických technik, je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (Obrázek 6.). Tato metoda nejlépe splňuje požadavky, které jsou kladeny na analýzu směsí složitých organických látek (Králová, 2001). Historický vývoj této techniky nebyl tak jednoduchý jako v případě propojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) a od prvního popsání systému v roce 1973 prošlo toto spojení mnoha alternativními způsoby, aby bylo spolehlivě dořešeno. Největším problémem spojení těchto dvou metod bylo překonání obrovského rozdílu tlaků mezi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií, tyto tlaky mají rozdíl 8 až 10 řádů. Dalšími problémy bylo převedení stanovovaných látek do plynného stavu a odstranění přebytku mobilní fáze. Zpočátku se pro toto spojení využívala především elektronová ionizace (EI) nebo chemická ionizace (CI), u těchto řešení se mobilní fáze využívala jako reakční plyn. Později se převodníky mezi kapalnou chromatografií a



hmotnostní spektrometrií, staly zároveň iontovým zdrojem, zde se mobilní fáze na procesu ionizace podílela přímo. Mezi tyto převodní techniky se řadí termosprej, elektrosprej a chemická ionizace za atmosférického tlaku. Tyto ionizační metody jsou označovány jako měkké neboli šetrné ionizační metody. Měkké techniky ionizace převážně poskytují informaci o molekulových hmotnostech stanovovaných látek a málo fragmentovaných iontů na rozdíl od EI (Králová, 2001).



Obrázek 6. Schéma LC/MS.

### 3.4.1. Ionizace termosprejem (TSI)

Při tomto typu ionizace je roztok, který vytéká z chromatografické kolony po eluci, veden kapilárou, ta je vyhřívána na konstantní teplotu, která se pohybuje okolo 300 až 350°C. Při této teplotě se rozpouštědlo dostává do plynného stavu a u výstupu z kapiláry se tvoří nadzvukový proud směsi částečně odpařeného rozpouštědla a malých elektricky nabitých kapiček. Poté co je rozpouštědlo dále odpařováno z povrchu nabitých kapiček, dochází k zvýšení hustoty povrchového náboje. Po dosažení kritické hodnoty se kapičky rozpadnou na ještě menší (Králová, 2001).

### 3.4.2. Ionizace elektrosprejem

Nejvýznamnější technikou v současné době je ionizace elektrosprejem. Tato technika pracuje při atmosférickém tlaku. Při ionizaci elektrosprejem je vynaloženo vysoké napětí na kapiláru chromatografické kolony, kterou prochází eluát. Malé kapičky se vytvářejí zmlžením eluátu u výstupu z kapiláry. Kapičky nesou kladný nebo záporný náboj a to díky vlivu vysokého gradientu elektrického pole. Následným převáděním rozpouštědla do plynného stavu se kapičky stávají menšími a také dochází ke zhušťování povrchového

náboje. Tyto děje způsobí coulombickou explozi, při níž se kapičky rozpadnou a poté se uvolní protonovaná molekula nebo aduktové ionty. ESI je považována za nejšetrnější ionizační techniku, která se lze využít i u méně stabilních molekul a u řady nekovalentních komplexů. Největší výhody ESI jsou spolehlivost a jednoduchá obsluha, tuto techniku aplikujeme k analýze peptidů, proteinů, nukleových kyselin, nukleotidů, nukleosidů, cukrů a tuků (Králová, 2001).

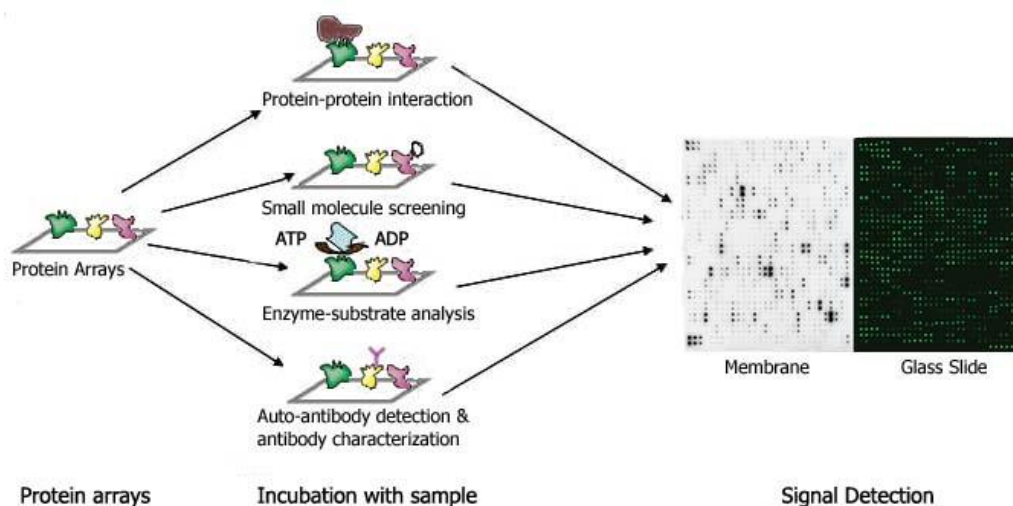
### **3.4.3. Chemická ionizace za atmosférického tlaku**

Tento iontový zdroj je podobně uspořádaný jako ESI s tím rozdílem, že na konci kapiláry není použito napětí, ale u jejího ústí je umístěna výbojová jehla. Na konci kapiláry je eluát rozprášen pneumatickým zmlžovačem. Aerosol je poté při teplotě 300-600 °C odpařen. Ionizace molekul mobilní fáze, která je přítomna v plynné fázi v přebytku nad analytem, je dosažena vložením napětí na výbojovou jehlu, které způsobí koronární výboj. Následná ionizace molekul stanovované látky vzniká v důsledku vzniklého reakčního plynu. Tuto ionizaci lze uplatnit i pro činnost v HPCL systému s běžnými fázemi, dále je tato technika poměrně méně citlivá k obsahu solí v mobilní fázi. (Králová, 2001).

## **3.5. Proteinové čipy**

Tato metoda se řadí mezi metody nevyužívající dvourozměrnou elektroforézu. Vznik proteinových čipů podpořila myšlenka o vyvinutí metody pro analýzu genové exprese, která by byla nezávislá na mnohdy zdlouhavém procesu separace (Hühmer, et al., 1997). Proteinové čipy se zdají být novou, slibnou a vysoce účinnou kapacitní technikou pro zkoumání proteomu. Předchůdci čipů proteinových jsou DNA čipy, u kterých se využily poznatky z výzkumu stanovení nukleových kyselin k určení proteinů (Ramaswamy, Golub, 2001; Kricka, 1999). Hlavní podstatou čipů, které detekují proteiny, je připevnění proteinů, jinak řečeno jejich imobilizace, na pevný povrch. Jako pevný povrch jsou nejčastěji užívané materiály sklo, silikon, teflon, plast nebo běžné syntetické polymery. Z těchto materiálů se poté vyrobí folie nebo destička. Na substrát jsou proteiny imobilizovány buď fyzikální sorpcí, nebo kovalentní vazbou (Obrázek 7.). Mnohdy je povrch substrátu potažen tenkou vrstvou zlata, hliníku nebo jiného kovu a dále je na tuto vrstvu nanesen organický film. Organický film by měl splňovat mnoho kritérií, jako je například fakt, že po nanesení vzorku by nemělo docházet k jeho dehydrataci a ztrátě kompaktnosti. Pro zabránění

dehydratace je užívána agaróza, dextranové nebo polyakrylamidové gely (Wilson, Nock, 2001; Talapatra, et al., 2002). Na hydrofilní vlastnosti je kladen důraz, jelikož posilují afinitu mezi proteinem a povrchem čipu. Například protilátky jsou schopné rozpoznávat a vázat jiné proteiny, mohou být znehybněny a poté umístěny na čipy se speciálně upravenými povrchy. Na takto upravený povrch čipu s imobilizovanými protilátkami je vložen vybraný proteinový vzorek. Poté na čipu zůstanou navázány pouze ty proteiny, které se navázaly na protilátky. Zachycené proteiny se detekují přímo na čipu pomocí hmotnostní spektrometrie. Tento postup, který propojuje proteinové čipy s hmotnostní spektrometrií se nazývá „surface-enhanced laser desorption/ionization“ (SELDI-MS). Na základě využití těchto čipů rozeznáváme dva druhy (Talapatra, et al., 2002; Templin, et al., 2002).



Obrázek 7. Schéma proteinových čipů.

### 3.5.1. Čipy studující funkce proteinů

Tyto proteinové čipy se využívají ke studiu funkce proteinů (protein functions arrays). Na čipech jsou imobilizovány proteiny. Imobilizovaný protein musí být biologicky aktivní, aby se uskutečnila vazba se studovanou látkou. Vliv na uskutečnění vazby mají také podmínky, ve kterých se protein nachází. S využitím těchto čipů se provádí paralelní studie funkce nativních proteinů nebo zjištění protein-proteinových interakcí (MacBath, Schreiber, 2000; Cho, et al., 2004).

### **3.5.2. Čipy detekující proteiny**

Čipy, které detekují protein (protein-detecting arrays) mají pevně navázané specifické proteinové ligandy. Tyto čipy slouží jako analytický nástroj pro určení a monitorování hladin proteinů v biologických vzorcích, a také k mapování proteomů. Avšak určení množství proteinů je nepřesné, proto se spíše využívají informace o tom zda je či není přítomen určitý protein ve vzorku. Dalším využitím je určování nových proteinových cílů pro chemicky připravené ligandy (Collinsová, et al., 2003; Kodadek, 2001).

## 4. IMUNOPROTEOMICKÝ PŘÍSTUP PRO IDENTIFIKACI NOVÝCH VAKCINAČNÍCH ANTIGENŮ PROTI BAKTERIÁLNÍM INFEKČÍM

Identifikace nových vakcinačních antigenů výrazně přispěly ke snížení počtu rezistencí mikroorganismů proti antimikrobiálním látkám. Imunoproteomika se rovněž zasloužila k nalezení zcela nových vakcín proti patogenům, pro které dříve žádná vakcína k dispozici nebyla. Mnoho glykokonjugovaných vakcín prokázalo účinnost pouze proti některým patogenním séro skupinám mikroorganismu, mezi které patří *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*. Tyto vakcíny mohou být v budoucnu již téměř neúčinné kvůli přepnutí či nahrazení sérotypu. Imunoproteomika by tento problém mohla vyřešit díky tomu, že proteiny jsou více konzervovány napříč bakteriálními kmeny a mají větší potenciál chránit proti několika kmenům stejného bakteriálního druhu. Zatím však byla schválena pouze jedna vakcína, která byla zhotovena na základě imunoproteomického přístupu (Pizza et al., 2000).

### 4.1. *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* je grampozitivní diplokok, který je opouzdřený. Roste v hlenovitých koloniích za vzniku alfa-hemolýzy. Hlavní faktor virulence tohoto mikroorganismu je polysacharidové pouzdro. Tento mikroorganismus nejčastěji způsobuje bakteriální pneumonii, meningitidy a záněty středního ucha. Proti nejčastěji vyskytujícím sérotypům existuje glykokonjugovaná pneumokoková vakcína, ta zmírnila počet úmrtí způsobené bakteriální pneumonií (Votava, c2010).

#### 4.1.1. Návrh účinnější imunoproteomické alternativy

Glykokonjugovaná vakcína je jediná vakcína, která se užívá k očkování proti tomuto typu mikroorganismu. V této době jsou nejčastějšími vakcínami Prevenar 13 (13-valentní vakcína) a Synflorix (10-valentní vakcína). Tyto vakcíny jsou určeny k očkování dětí od 6 týdnů až po osoby starších 18 let. Stále však existuje 92 sérotypů *Streptococcus pneumoniae*. Kromě tohoto faktu došlo i k výměně sérotypu, zvýšenému výskytu nevakcinačních sérotypů a vznikl rezistentní sérotyp 19A, který nyní převládá v některých zemích (Kellner et al.,

2011). Tyto problémy poukazují na to, že identifikace proteinových antigenů, které jsou zastoupeny napříč kmeny, je lepší alternativa než kapsulární polysacharidy.

Z tohoto důvodu je cílem nových imunoproteomických studií stanovit potenciální imunogenní antigeny *Streptococcus pneumoniae*. Při prodělání onemocnění způsobeného tímto patogenem je schopen organismus dospělého jedince vyvinout protilátky. Tento fakt poukazuje na to, že protilátková odpověď závisí na věku (Lifshitz et al., 2002; McCool et al., 2002). Výzkumy se tedy zaměřili na antigeny, které prokázaly zvýšenou imunogenicitu se stářím dítěte. Analyzovala se buněčná stěna mikroorganismu ze sér dětí a dospělých a našlo se sedmnáct imunoreaktivních proteinů. K dalšímu testování byly vybrány čtyři s největší reaktivitou a četným výskytem. Avšak po vyhodnocení imunizace myši byla prokázána pouze 36 % ochrana proti *Streptococcus pneumoniae*.

Tyto proteiny jsou potenciálními kandidáty k výrobě vakcín a dříve byly identifikovány již u jiných druhů (Ling et al., 2004). Tyto údaje poukazují, že je potřeba více znalostí ochranné hostitelské reakce proti *Streptococcus pneumoniae* aby se optimalizoval další vývoj vakcíny. Musí se brát ohled i na fakt, že myši nemusí mít stejnou imunitní odpověď na *Streptococcus pneumoniae* jako člověk. Tento fakt je klíčovým omezením pro pre-klinické studie očkování, avšak musí být brán v úvahu (Dennehy, McClean, 2012).

## **4.2. *Burkholderia pseudomallei* a ostatní členové rodu *Burkholderia***

*Burkholderia pseudomallei* je gram negativní, intracelulární patogen. Tento patogen je nejvíce zastoupen v zemích jihovýchodní Asie a severní Austrálie, u nás se tento patogen nevyskytuje. Morfologicky se jedná o nefermentující tyčky, které jsou typickým oportunním nemocničním patogenem z vlhkého prostředí. U lidí způsobuje variabilní škálu nemocí, od akutní sepse přes zápal plic, až po latentní infekce, která může přetrvávat i desítky let. Typickými zástupci onemocnění, které způsobuje, jsou melioidózy a hnisavé infekce postihující kůži nebo plíce. Tento patogen snadno postihne i laboratorní pracovníky. Bakterie je v mnoha případech rezistentní vůči antibiotikům a úmrtnost tímto patogenem je až 50 % (Votava, c2010).

#### 4.2.1. Návrh vakcíny proti *Burkholderia pseudomallei*

I přes vysokou úmrtnost a významnou nemocnost při nákaze touto bakterií, neexistuje proti tomuto patogenu žádná licencovaná vakcína, která by infekci zabránila. K prozatímnímu vývoji vakcíny byly použity séra od pacientů v rekonvalescenci (Harding et al., 2007). Tato séra byla zkoumána dvourozměrným Western blotem za účelem identifikace proteinů exprimovaných na povrchu buněk. Celkem bylo rozpoznáno devět povrchových proteinů, které byly imunoreaktivní, mezi tyto proteiny patřil elongační faktor Tu (EF-Tu) a dva chaperony, GroEL a DnaK.

Pozdější studie využila králičí sérum, které bylo zkoumáno dvourozměrným Western blotem, opět za účelem identifikovat membránové proteiny. Znovu byly rozpoznány ty stejné proteiny, avšak u méně virulentní *Burkholderia thailandensis*, ta sdílí 94 % stejnou identitu aminokyselin s *Burkholderia pseudomallei* (Kim et al., 2005). Bylo prokázáno, že EF-Tu je secernován do vnějších membránových vezikulů. Po slizniční imunizaci myši EF-Tu došlo k tvorbě antigen specifických IgG a IgA. Dále bylo dosaženo výrazné redukce bakterií v plicích po následné letální stimulaci *Burkholderia thailandensis*. Na povrchu se exprimující proteiny byly hlavními potenciálními kandidáty na výrobu vakcíny (Chen et al., 2010; Oster et al., 2007). Tyto vakcíny byly navrženy jako proteoliposomy, které inkorporují jak antigen vakcíny, adjuvans, tak i nosič částic.

V pozdější studii se ukázalo, že subkutánní imunizace myši purifikovanými vnějšími membránovými proteiny *Burkholderia pseudomallei*, vedla k protekci u 60 % myši před letální dávkou. (Nieves et al., 2011). Nebylo však uvedeno, zda tyto čištěné proteiny obsahovaly EF-Tu a jaké bylo jejich další složení.

Náhradní způsob identifikace imunoreaktivních antigenů *Burkholderia pseudomallei* spočívá ve spojení pozatků z genomové knihovny se sérem pacienta (Allwood et al., 2008). Na základě těchto poznatků byly ze čtrnácti proteinů vybrány tři s největší reaktivitou. Tyto tři proteiny byly sérologicky zhodnoceny u pacientů a ukázalo se, že 94 % z nich je séropozitivní alespoň pro jeden z těchto proteinů. Dva proteiny s největší reaktivitou byly testovány na myších. Po vyhodnocení testů se zjistilo, že imunizace měla 50 % úspěšnost. Tento výzkum dává naději možné budoucí multi-valentní vakcíně proti melioidóze (Hara et al., 2009). Při dalším porovnání séra pacientů s genomovou knihovnou se výzkum zaměřil na nejvíce vyskytovaný protein. Byl testován imunizací na myších a prokázala se 70 % ochrana, také se výrazně snížilo bakteriální zatížení v plicích a slezině (Su et al., 2010).

V poslední době se k identifikaci imunoreaktivních proteinů používají proteinové čipy. Suwannasaen et al. (2011). použili sérum pacientů, kteří trpí melioidózou nebo séropozitivní zdravé jedince. Z celkových 27 identifikovaných antigenů bylo vybráno sedm nejvíce zastoupených v séru. Některé z těchto sedmi antigenů byly spojeny s faktory virulence. Což potvrzuje schopnost séra identifikovat potenciální kandidáty vakcín.

Celkově lze říci, že vyšetřování imunoreaktivních proteinů *Burkholderia pseudomallei* metodami imunoproteomiky nebo genovými knihovnamiumožnilo identifikaci mnoha kandidátů pro přípravu vakcíny, která by byla určená k ochraně proti melioidóze. Když vezmeme v úvahu chronickou infekci a intracelulární přežití *Burkholderia pseudomallei*, je zřejmé, že vývoj účinné vakcíny bude značně problémový. Účinná vakcína bude muset vyvolat jak buněčnou, tak i humorální imunitu, aby byla zajištěna komplexní ochrana před tímto patogenem (Dennehy, McClean, 2012).

### **4.3. *Neisseria meningitidis***

*Neisseria meningitidis* jinými slovy meningokok. Tento patogen je gramnegativní, lehce zploštělý kok. V největším zastoupení se vyskytuje ve dvojicích s tím, že koky jsou k sobě přivráceny plochou stranou. Tento útvar se většinou přirovnává ke kávovému zrnku. Patogenita této bakterie je různorodá. Téměř 10 % zdravé populace trpí bezpříznakovým nosičstvím meningokoka ve faryngu. Další možnost nákazy jsou neinvazivní infekce většinou faryngitidy, ty se nijak neliší od jiných faryngitid. Sepse, meningitidy či jejich kombinace a velmi zřídka pneumonie se řadí mezi invazivní infekce vyvolané meningokokem. Tyto infekce postihují téměř všechny věkové kategorie. Velmi často meningokokové infekce propuknou velmi rychle až bleskově, a díky fulminantnímu průběhu, může meningokok usmrtit člověka z plného zdraví během několika desítek hodin. Je nesmírně důležité včas odhalit nákazu tímto patogenem. Mezi klinické příznaky patří teplota, která brzy dosáhne septických hodnot, vyrážka. Později se dostaví diseminovaná intravaskulární koagulace (DIK) a celkový rozvrat metabolismu.

Aby se však patogen mohl projevit, je velmi důležitá souhra faktorů jak ze strany mikroba, tak ze strany hostitele. Mikrob musí mít všechny potřebné faktory virulence a hostitel musí být oslaben, nejčastěji jde o nadměrnou fyzickou aktivitu netrénovaného jedince. Velkou roli hraje i prostupnost sliznice, pro meningokoky je sliznice kuřáků mnohem lépe prostupná. Meningokoky dělíme do skupin podle jejich polysacharidových pouzderých antigenů. Jedná se tedy o sérologické skupiny typu A, B, C. Tyto skupiny mají největší



význam pro očkování, jako faktory virulence se moc neuplatňují. Dlouhou dobu jsme měli pouze vakcínu proti typům A a C. Nyní se konečně podařilo metodou reverzní vakcinologie vyvinout vakcínu i proti typu B. Tento typ byl zodpovědný za více než 30 % meningokokových onemocnění v USA a 80 % v Evropě (Votava, c2010).

#### 4.3.1. Vakcína proti sérotypu B

Tato vakcína nebyla dlouhou dobu dostupná oproti vakcínám proti sérotypu A a C, ty se na trhu objevují už velmi dlouhou dobu. Důvod proč tato vakcína nebyla dostupná je ten, že strategie, která se využívá proti ostatním meningokokům, nebyla účinná na MenB (meningokok serotypu B). Kapsulární polysacharid MenB je strukturálně velmi podobný některým hojně se vyskytujícím lidských glykoproteinů (Goldschneider, et al., 1969; Goldschneider, et al., 1969; Borrow, et al., 2005). Proto polysacharid nebyl vhodným kandidátem, a to kvůli hrozícímu autoimunitnímu poškození. Současné vakcíny se zaměřují na polysacharidová pouzdra, ale pouzdro MenB se skládá z polymerů alfa (2-8) vázaných na N-acetylneuramidovou kyselinu, která se nachází i v lidských adhezních nervových molekulách (NCAM) (Devi, et al., 1991; Finne, et al., 1987). Vakcína zaměřená na tyto molekuly buď nevyvolá imunitní odpověď anebo způsobí vyvolání reakce proti buňkám hostitele. Polysacharid MenB není schopný navodit imunologickou reakci u zvířecích modelů ani u lidí (Wyle, et al., 1972). Tato tolerance se očekává, neboť T-buňky s B-buňkami rozpoznají tento antigen jako vlastní. Avšak imunogenosti u myši bylo docíleno tak, že alfa (2-8) vázaný N-acetalneuramidovou kyselinou byl podáván konjugovaný na tetanový toxoid (Devi, et al., 1991). Tolerance proti alfa (2-8) vázaného N-acetalneuroamidovou kyselinou může být přepsána. Existuje však obava, že by to mohlo vést k autoimunitnímu onemocnění.

Když je *Neisseria meningitidis* pěstována v kultuře, vylučuje kulovité váčky z membrány, které obsahují proteiny exprimující se na povrchu membrány (Collins, 2011). Tyto váčky vnější membrány můžou být čištěny a použity pro imunizaci, obvykle po odstranění většiny LiPo-oligosacharidu (LOS) a endotoxinu. Tyto vakcíny vyvolaly ochranu pouze proti kmenům, ze kterých byly vyvinuty, kvůli tomu jsou tyto vakcíny využívány pouze v boji s propuknutými ohnisky epidemie (Tappero, et al., 1999). K dispozici tedy byly tři konkurující strategie. První strategií bylo vytvořit vakcínu z kapsulárního antigenu bez rizika autoimunity, další vyrobit vakcínu z proteinů exprimujících se na povrchu membrány tak, aby byla účinná na více kmenů a poslední strategie spočívala v tom, že by se racionálně navrhla podjednotková vakcína na základě genomové informace.

I přes riziko vzniku autoimunity, může být použit pouzderný polysacharid z MenB jako imunogen. Nejsou zaznamenány žádné případy vzniku autoimunity u lidí po onemocnění MenB, nebo u zvířat očkovaných alfa (2-8) vázaným N-acetylneuroamidovou kyselinou (Robbins, et al., 2011). Navíc lidé, kteří přežili infekci MenB, mají stejné následky jako lidé, kteří prodělali infekci MenC, a to bez zvýšené autoimunity (Gottfredsson, et al., 2011). Výhodou očkování pouzderným polysacharidem je, že tato vakcína má možnou ochranu proti jiným bakteriím, které tento polysacharid používají, například *Escherichia coli* kmene K a *Klebsiela*. Tyto vakcíny byly účinné pouze v bezprostředním okolí vzniku nákazy. Na základě těchto vakcín vznikla snaha o vytvoření více univerzálních vakcín. Jedním z možných řešení je to, že by se vytvořila vakcína s více exprimujícími se proteiny z různých kmenů a tím by se pokryla ochrana proti různým podtypům MenB (Claassen, et al., 1996).

Reverzní vakcinologie je strategie pro racionální konstrukce vakcín. Genom MenB byl sekvenován a kandidáti v podobě povrchových proteinů byli identifikováni a použiti k imunizaci myši (Tettelin, et al., 2000; Pizza, et al., 2000). Protilátky byly využity k hledání příbuzných antigenů a k testování séra na bakteriocidní aktivitu. Tříděním kandidátních proteinů bylo zjištěno, jak moc se kandidáti opakují nebo naopak liší v různých kmenech MenB. Reverzní vakcinologie strategicky určila podmínky, které musí proteiny splňovat, aby byly považovány za ideální antigeny. Protein musí být přístupný pro imunitní systém, imunogenní, indukovat ochranný systém, přítomný ve všech kmenech a s minimální proměnlivostí sekvence (Pizza, 2000). Po selekci vhodných antigenů bylo pět z nich spojeno, aby se utvořila multivalentní pěti komponentí vakcína proti MenB (Giuliani, et al., 2006). Mezi pět proteinů patřily následující antigeny, neisseriální adhezní protein (NadA), neisseria heparin vázající protein (NHBA), H faktor vázající protein (fHbp) a dva z genomu odvozené antigeny (GNA; GNA1030 a GNA2091) fúzané s NHBA (Comanducci, et al., 2002; Welsch, et al., 2003; Serruto, et al., 2010; Massignani, et al., 2003; Madico, 2006). Tato multivalentní vakcína byla účinná proti 95 % z 84 různých kmenů, když byla formulována s adjuvans (MF59). Vakcína byla testována na lidech buď samostatně nebo ve formulaci s proteiny exprimujícími se na povrchu membrány. Obě tyto alternativy byly imunogenní, avšak formulace s exprimujícími se proteiny účinnější. Později byla vakcína přejmenována na 4-komponentní MenB (4CMenB), do té se řadily NHBA-GNA1030, fHbp-GNA2091, NadA a na povrchu membrány exprimující se proteiny. 4CMenB indukuje v séru tvorbu bakteriocidních protilátek proti MenB u kojenců, mladistvých i dospělých (Santolaya, et al., 2012; Gossger, et al., 2012; Toneatto, et al., 2011).

Používání vakcíny podléhá dvěma závažným otázkám. Bude pokrývat všechny kmeny? A bude mít významné vedlejší účinky? Složka exprimujících se proteinů v 4CMenB chrání pouze proti určitým podtypům, vakcína obsahuje pouze jednu variantu ze tří fHbp. Multivalentní 5-komponentní vakcína bez exprimujících se proteinů byla účinná proti 95 % kmenům, avšak 4CMenB byla účinná už jen pouze z 56 % (Beernink, et al., 2007). Pokud jde o otázku závažných vedlejších účinků, během zkušební fáze se u 4CMenB vyskytla v 50-60 % horečka u kojenců (Gossger, et al., 2012). Výskyt horečky je snížen podáváním paracetamolu jako profylaktické léčby. Vzácné, ale závažné nežádoucí účinky nelze zatím posoudit, dokud nebude naočkováno velké množství kojenců. Vakcína prodávaná jako Bexsero Novartis, byla doporučena Evropskou agenturou pro léčivé přípravky a mohla být k dispozici ve Velké Británii koncem roku 2013 (Iacobucci, 2012). Stále se však budou muset sledovat vedlejší účinky a její aplikace, aby se optimalizovaly očkovací plány. Dále musí být neustále zkoumán jakýkoli posun kmenů a musí být zajištěna a ověřena křížová ochrana pro další meningokokové skupiny. Alternativní 5komponentní vakcína je zatím ve stadiu klinické zkoušky (Snape, et al., 2012; Beernink, et al., 2009; Hong, et al., 2012).

#### **4.4. *Bordetella pertussis***

*Bordetella perussis* je gramnegativní bakterie, která je odpovědná za vysoce nakažlivé infekce dýchacích cest u lidí. Tyto infekce se nazývají černý kašel. Dříve byla aplikována vakcína, které obsahovala celé buňky bakterie. Tato vakcína měla v roce 1940, když byla zavedena, velký vliv na snížení úmrtnosti u dětí, avšak kvůli závažným vedlejším účinkům, které zahrnovaly i encefalitidu, byla stažena z trhu. Po této vakcíně se zavedlo užívání acelulární pertusové vakcíny. Acelulární vakcína zlepšila důvěru v užívání a tím pádem se snížil výskyt *Bordetella perussis* u dětí pro mnoho příštích desetiletí. Nicméně zatímco očkování snížilo výskyt této infekce, začínají se objevovat zprávy o znovuobjevování černého kašle u dospělých a mladistvých ve vyspělých zemích, a to i navzdory tomu, že příjem očkování proti tomuto patogenu, je více než dobrý (Rohani et al., 2011).

##### **4.4.1. Návrh nové vakcíny proti černému kašli**

V současné době se očkuje proti černému kašli acelulární vakcínou. Tato vakcína se podává v kombinaci anatoxinů záškrtu a tetanu (DTaP) a acelulárními antigeny zahrnujícími

toxoidy černého kašle, vláknitý hemaglutin (FHA), fimbrie a pertactin. Tyto antigeny patří mezi faktory virulence *Bordetella pertussis*. Avšak v posledních letech, se účinnost vakcíny snižuje. Z důvodu zlepšení očkovací látky proti černému kašli, byly provedeny dvě samostatné studie, které zkoumaly povrchové a secernované proteiny. První studie byla uskutečněna za použití séra myši imunizovaných inaktivovanou *Bordetella pertussis* (Tefon et al., 2011; Altindis et al., 2009). Povrchové imunoproteomy dvou kmenů *Bordetella pertussis*, byly téměř totožné. Mezi 27 imunoreaktivními proteiny obou kmenů, byl nalezen pertactin, což je jedna ze složek schválené vakcíny proti černému kašli. Avšak FHA, který je znám jako vysoce imunogenní protein, nebyl identifikován. To, že tento protein nebyl rozpoznán, může být způsobeno velkou velikostí jeho molekuly a následným nedostatečným přenosem na membránu prostřednictvím Western blotu (Tefon et al., 2011).

Ve druhé studii se analyzovalo sérum od dětí, které byly očkovány celými buňkami *Bordetella pertussis*. Jako imunoreaktivní protein byl opět stanoven pertactin. FHA a pertusový toxin nebyly analyzovány. Při porovnání imunoreaktivních proteinů detekovaných, buď myším nebo lidským sérem, bylo nalezeno mnoho rozdílů v imunoreaktivitě (Zhu et al., 2010). V lidském séru byly detekovány čtyři imunoreaktivní proteiny shodné s těmi, jenž byly určeny pomocí myšího séra. Tento fakt jasně poukazuje na to, že bakteriální antigeny mohou být rozdílně rozpoznávány myším a lidským imunitním systémem. Při výzkumu, by se měla věnovat pozornost, v případě použití antiséra z jiných živočišných druhů (Dennehy, McClean, 2012).

## 5. ZÁVĚR

Je zřejmé, že v budoucnu bude nezbytné v některých případech začít používat zcela jiné vakcíny než doposud.

Příkladem je očkovací látka proti černému kašli, která nutně potřebuje zmodernizovat nebo nahradit účinnější variantou. Imunoproteomické studie již dokázaly identifikovat pár nadějných kandidátů pro výrobu nové účinnější vakcíny.

Velký úspěch se dostavil u vakcíny Bexsero, která je určena pro očkování dětí od 2 měsíců věku až po dospělost proti invazivnímu meningokokovému onemocnění způsobenému *Neisseria meningitidis* typu B. U této vakcíny je nyní stále zkoumán jakýkoli posun kmenů, a dále je zjišťována a ověřována křížová ochrana pro další meningokové skupiny.

Další vakcíny obsahující antigeny, které byly identifikovány imunoproteomickým přístupem, jsou prozatím ve fázi výzkumu. Příkladem je vakcína proti pneumokokovému onemocnění. Na trhu je několik vakcín namířených proti tomuto patogenu, avšak ty pokrývají maximálně 13 sérotypů. Cílem imunoproteomických studií je najít nové kandidáty pro výrobu vakcíny, která by pokryla nedostatky těch prozatímních.

Jiné imunoproteomické výzkumy se zabývají vakcínou, která by chránila před melioidózou způsobenou bakterií *Burkholderia pseudomallei*. Výzkum se zaměřil na nejvíce vyskytovaný protein, který v dalších testech prokázal 70 % ochranu, také výrazně snížil bakteriální zatížení v plicích a slezině.

V současné době existuje mnoho velice slibných vakcinačních antigenů, které byly identifikovány imunoproteomickým přístupem. Pro účely konstrukce nových vakcín je však nezbytné provést na vhodném modelu další studie, které by zhodnotily míru protekce.

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

ABBAS, A. K., A. H. LICHTMAN a S. PILLAI. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders, **c2012**, 545 s. (1-5; 362-364 s.). ISBN 978-0-8089-2425-8.

ALTINDIS, E.; B. E. TEFON; et. al. *Immunoproteomic analysis of bordetella pertussis and identification of new immunogenic proteins*. *Vaccine*, **2009**, 27, 542-548.

ALLWOOD, E.M.; C. A. LOGUE; et. al. Evaluation of recombinant antigens for diagnosis of melioidosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2008**, 54, 144-153.

BAUMANN M., S. MERI. *Expert Rev. Proteomics 1*, 207, **2004**.

BEERNINK P. T., D. A. CAUGANT, et al. *Meningococcal factor H-binding protein variants expressed by epidemic capsular group A, W-135, and X strains from Africa*. *J Infect Dis* **2009**;199(9):1360–8.

BEERNINK P. T., J. A. WELSCH, et al. *Prevalence of factor H-binding protein variants and NadA among meningococcal group B isolates from the United States: implications for the development of a multicomponent group B vaccine*. *J Infect Dis* **2007**;195(10):1472–9.

BENEŠ, J. *Infekční lékařství*. Praha: Galén, **c2009**, 651 s. (76-86 s.). ISBN 978-80-7262-644-1.

BORROW R., P. BALMER, E. MILLER. *Meningococcal surrogates of protection--serum bactericidal antibody activity*. *Vaccine* **2005**;23(17–18):2222–7.

CASH P., E. ARGO, et al.: *Electrophoresis* 20, 2259, **1999**.

CELER, V., I. K. LESNÁ. *Obecná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, **2010**. ISBN 978-80-87009-70-3.

CLAASSEN I., J. MEYLIS, et al. *Production, characterization and control of a Neisseria meningitidis hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine*. *Vaccine* **1996**;14(10):1001–8.

COLE, R. B. (ed.). *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley, **c2010**. ISBN 978-0-471-74107-7.

COLLINS B. S. *Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development*. *Discov Med* **2011**;12(62):7–15.

COLLINSOVÁ M., C. CASTRO, et al.: *Chem. Biol.* 10, 113, **2003**.

COLLINSOVÁ, M., J. JIRÁČEK. *Současný vývoj v protetice..* Chemické listy [online]. **2004**,98(12), 1112-1118 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_12\\_1112-1118.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_12_1112-1118.pdf)

COMANDUCCI M., S. BAMBINI, et al. *NadA, a Novel Vaccine Candidate of Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **2002**;195(11):1445–54.

DANIELY, D; M. PORTNOI; et. al. *Pneumococcal 6-phosphogluconate-dehydrogenase, a putative adhesin, induces protective immune response in mice*. *Clin. Exp. Immunol.*, **2006**, 144, 254-263.

DASS, Ch. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, **c2007**. ISBN 978-047-1682-295.

DE HOFFMANN, E., V. STROOBANT, (ed.). *Mass spectrometry: principles and applications*. 3rd ed. Chichester: John Wiley, **2007**, 502 s. . ISBN 978-0-470-03311-1.

DE HOOG, C. L., M. MANN. Proteomics. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*[online]. **2004**, **5**(1),267-293 [cit.2016-05-17]. DOI: 0.1146/annurev.genom.4.070802.110305. ISSN 1527-8204. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.genom.4.070802.110305>

DELANY, I., R. RAPPUOLI, K. L. SEIB. *Vaccines, Reverse Vaccinology, and Bacterial Pathogenesis*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine [online]. **2013**, **3**(5), a012476-a012476 [cit. 2016-05-20]. DOI: 10.1101/cshperspect.a012476. ISSN 2157-1422. Dostupné z: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a012476>

DENNEHY, R., S. MCCLEAN. *Immunoproteomics: The Key to Discovery of New Vaccine Antigens Against Bacterial Respiratory Infections*. Current Protein and Peptide Science [online]. **2012**, **13**, 807-815 [cit. 2016-05-19]. Dostupné z:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23305366>

DEVI S. J., J. ROBBINS, R. SCHNEERSON. *Antibodies to poly[(2-8)-alpha-N-acetylneuraminic acid] and poly[(2----9)-alpha-N-acetylneuraminic acid] are elicited by immunization of mice with Escherichia coli K92 conjugates: potential vaccines for groups B and C meningococci and E. coli K1*. Proc Natl Acad Sci U S A **1991**;88(August):7175–9.

DEVI S. J., R. SCHNEERSON, et al. *Identity between polysaccharide antigens of Moraxella nonliquefaciens, group B Neisseria meningitidis, and Escherichia coli K1 (non-O acetylated)*. Infect Immun **1991**;59(2):732–6.

Different Types of Vaccines. *History of vaccines* [online]. [cit. 2016-05-19]. Dostupné z: <http://www.historyofvaccines.org/content/articles/different-types-vaccines>

DRUAR, C.; F. YU; et. al. *Evaluating burkholderia pseudomallei bip proteins as vaccines and bip antibodies as detection agents*. FEMS Immunol. Med.Microbiol., **2008**, **52**, 78-87.



ELTE TTK ONLINE [online]. [cit. 23.5.2016]. Dostupný na WWW: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch07s03>

FERENČÍK, M. *Ilustrovaný slovník imunologie a alergologie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, **2011**, 364 s. (346-347 s.). ISBN 978-80-7262-762-2.

FINNE J., D. BITTER-SUERMAN, et al. *IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues*. J Immunol **1987**;138(12):4402–7.

FLEISCHHACKEROVÁ A., P. FARKAŠ, S. BYSTRICKÝ. *Glykokonjugované vakcíny*. Chemické listy [online]. **2014**, **108**(2), 120-126 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014\\_02\\_120-126.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_02_120-126.pdf)

FRASER, C. M. *A genomics-based approach to biodefence preparedness*. Nature Reviews Genetics [online]. **2004**, **5**(1), 23-33 [cit. 2016-05-19]. DOI: 10.1038/nrg1245. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg1245>

GIULIANI M. M., J. ADU-BOBIE, et al. *A universal vaccine for serogroup B meningococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A **2006**;103(29):10834–9.

GOLDSCHNEIDER I., E. C. GOTSCHLICH, M. S. ARTENSTEIN. *Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies*. J Exp Med **1969**;129(6):1307–26.

GOLDSCHNEIDER I., E. C. GOTSCHLICH, M. S. ARTENSTEIN. *Human Immunity to the Meningococcus. II. Development of Natural Immunity*. J Exp Med **1969**;129(6):1327–48.

GÖPFERTO VÁ, J. a J. ŠEJDA. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. Praha: Triton, **1997**, 114 s. ( 16-17;76-79 s.). ISBN 80-858-7548-9.

GÖPFERTO VÁ, D. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. 3. dopl. vyd. Praha: Triton, **2002**, 148 s. (80-89.s). ISBN 80-725-4223-0.

GORG A, W. POSTEL, S. GUNTHER. *Methodology of Ipg-dalt for the analysis of cell lysates and tissue proteins*. *Electrophoresis* **1988**;9:628.

GORG A, W. POSTEL, et al. *Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer*. *Electrophoresis* **1987**;8:122–4.

GORG A, W. POSTEL, et al. *Horizontal two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the 1st-dimension in the presence of nonionic detergent*. *Electrophoresis* **1987**;8:45–51.

GOSSGER N., M. SNAPE, et al. *Immunogenicity and tolerability of recombinant serogroup B meningococcal vaccine administered with or without routine infant vaccinations according to different immunization schedules: a randomized controlled trial*. *JAMA* **2012**;307(6):573–82.

GOTTFREDSSON M., I. K. REYNISSON, et al. *Comparative long-term adverse effects elicited by invasive group B and C meningococcal infections*. *Clin Infect Dis* **2011**;53(9):e117–24.

GROSS, Jürgen H. *Mass spectrometry: a textbook*. 2nd ed. Berlin: Springer, **c2011**. ISBN 978-3-642-10709-2.

GYGI S. P., B. RIST, et al. *Nat. Biotechnol.* 17, 994, **1999**.

HALADA P. ŘEHULKA P., J. CHMELÍK.: *Chem. Listy* 99, 922 (**2005**)

HAMDAN, M., P. G. RIGHETTI. *Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis, and microarray technology* [online]. Hoboken, N.J.: John Wiley, **2005** [cit. 2016-05-17]. Wiley-Interscience series on mass spectrometry. ISBN 04-716-4817-5.

HARA, Y.; R. MOHAMED; S. NATHAN, *Immunogenic burkholderia pseudomallei outer membrane proteins as potential candidate vaccine targets*. PLoS One, **2009**, 4, e6496.

HARDING, S.V.; M. SARKAR-TYSON; S. J. SMITHER; T. P. ATKINS; P. C. OYSTON, et. al. *The identification of surface proteins of burkholderia pseudomallei*. Vaccine, **2007**, 25, 2664-2672.

HOLČAPEK, Michal (ed.). *Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS): sborník přednášek kurzu HPLC/MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice 5.-7.11.2001, Kongresová hala Univerzity Pardubice*. Pardubice: Univerzita Pardubice, **2001**, 191 s. (178-217 s.). ISBN 80-719-4390-8.

HONG E., M. M. GIULIANI, et al. *Could the multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) control Neisseria meningitidis capsular group X outbreaks in Africa?* Vaccine **2012**; 31(7):1113–6.

HOŘEJŠÍ, V. a J. BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, **2009**, 219 s. (s.274-279). ISBN 978-80-7387-280-9.

*How products are made: Vaccines* [online]. [cit. 2016-05-26]. Dostupné z: <http://www.madehow.com/Volume-2/Vaccine.html>

HÜHMER, A. F. R., G. I. ACED, et al. *Separation and analysis of peptides and proteins*. Anal. Chem., **1997**, 69, p. 29R–57R.

CHEN, D.J.; N. OSTERRIEDER; et. al. *Delivery of foreign antigens by engineered outer membrane vesicle vaccines*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **2010**, *107*, 3099-3104.

CHMELÍK, J. *Proteomický průvodce*. Chemické listy [online]. **2005**, *99*(12), 883-885 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_883-885.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_883-885.pdf)

CHOI, C.W.; Y. G. LEE; S. O. KWON; H. Y. KIM; J. C. LEE; et. al. *Analysis of streptococcus pneumoniae secreted antigens by immuno-proteomic approach*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., **2012**, *72*, 318-327.

CHO S., S. G. PARK, J. et al., *Biochem. Mol. Biol.* *37*, 45 **2004**.

IACOBUCCI G. *First meningitis B vaccine could be available in UK next year*. BMJ **2012**;345:e7867.

JAMES P, M. QUADRONI, E. CARAFOLI, G. GONNET. *Protein identification by mass profile fingerprinting*. BiochemBiophys Res Comm **1993**;195:58–64.

JENKINS R. E., S. R. PENNINGTON. *Proteomics 1*, 13, **2001**.

JÍLEK, P. *Základy imunologie. 2.*, přeprac. vyd. Praha: Anyway, **2008**, 79 s. (62-63 s.). ISBN 978-80-254-2422-3.

JULÁK, J. *Identifikace bakterií metodami instrumentální chemické analýzy*. Praha: Karolinum, **1998**, 195 s. (35-40 s.). ISBN 80-718-4451-9.

KELLNER, J. *Update on the success of the pneumococcal conjugate vaccine*. Paediatr. Child Health, **2011**, *16*, 233-240.

KIM, H. S.; M. A. SCHELL; et. al. *Bacterial genome adaptation to niches: Divergence of the potential virulence genes in free burkholderia species of different survival strategies*. BMC Genomics, **2005**, *6*, 174.

KLOSE J., U. KOBALZ. *Electrophoresis* 16, 1034, **1995**.

KODADEK T.: *Chem. Biol.* 8, 105, **2001**.

KOVÁŘOVÁ, H., I. TREBICHAVSKÝ, K. BEZOUŠKA. *Odkud a kam míří proteomika?* Živa [online]. **2005**, **1**, 1-8 [cit. 2016-05-19]. Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/odkud-a-kam-miri-proteomika.pdf>

KOVÁŘOVÁ, H. *Proteomika v postgenomové době*. Chemické listy [online]. **2005**, **99**(12), 886-889 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_886-889.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_886-889.pdf)

KRÁLOVÁ, B. *Bioanalytické metody*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, **2001**, 254 s. (30-57; 80-121 s.). ISBN 978-80-7080-449-0.

KRICKA, L. J. *Nucleic acid detection technologies – labels, strategies, and formats*. Clin. Chem., **1999**, 45, p. 453–458.

LIFSHITZ, S.; R. DAGAN, et. al. *Age-dependent preference in human antibody responses to streptococcus pneumoniae polypeptide antigens*. Clin. Exp. Immunol., **2002**, 127, 344-353.

LING, E.; G. FELDMAN, G.; M. PORTNOI; R. DAGAN; et. al. *Glycolytic enzymes associated with the cell surface of streptococcus pneumoniae are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse*. Clin. Exp. Immunol., **2004**, 138, 290-298.

MACBEATH G., S. L. SCHREIBER: *Science* 289, 1760, **2000**.

MADERA M., Y. MECHREF, M. V. NOVOTNY. *Anal. Chem.* 77, 4081, **2005**.

MADICO G., J. A. WELSCH, et al. *The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance.* J Immunol **2006**;177(1):501–10.

MARIAPPAN, V.; K. M. VELLASAMY; et. al. *Identification of immunogenic proteins from burkholderia cepacia secretome using proteomic analysis.* Vaccine, **2010**, 28, 1318-1324.

MARZOUQI, I.; P. RICHMOND; et. al. *Development of improved vaccines against whooping cough: Current status.* Hum. Vaccin., **2010**, 6, 543-553.

MASIGNANI V., M. COMANDUCCI, et al. *Vaccination against Neisseria meningitidis using three variants of the lipoprotein GNA1870.* J Exp Med **2003**;197(6):789–99.

MCCLEAN, S.; M. CALLAGHAN. *Burkholderia cepacia complex: Epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention.* J. Med. Microbiol., **2009**, 58, 1-12.

MCCOOL, T.L.; T. R. CATE; G. MOY; J. N. WEISER. *The imine response to pneumococcal proteins during experimental human carriage.* J. Exp. Med., **2002**, 195, 359-365.

MEYER, H. E. Proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*[online]. **2003-8-1**, **376**(7), 945-945 [cit. 2016-05-20]. DOI: 10.1007/s00216-003-2036-5. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-2036-5>

MIZRACHI NEBENZAHL, Y.; A. BERNSTEIN; M. PORTNOI; M. SHAGAN; et. al. *Streptococcus pneumoniae surface-exposed glutamyl trna synthetase, a putative adhesin, is able to induce a partially protective immune response in mice.* J. Infect. Dis., **2007**, 196, 945-953.

MORSCZECK, C.; T. PROKHOROVA; J. SIGH; M. PFEIFFER; M. BILLE- NIELSEN; et. al. *Streptococcus pneumoniae: Proteomics of surface proteins for valine development.* Clin. Microbiol. Infect., **2008**, 14, 74-81.

*News medical: Live sciences and medicene* [online]. **2012** [cit. 2016-05-26]. Dostupné z: <http://www.news-medical.net/health/Vaccine-Production.aspx>

NIEVES, W.; S. ASAKRAH; et. al. *A naturally derived outer-membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary burkholderia pseudomallei infection.* *Vaccine*, **2011**, 29, 8381-8389.

OPITECK G. J., J. E. SCHEFFLER. *Expert Rev. Proteomics* 1, 57, **2004**.

OSTER, P.; J. O'HALLAHAN; et. al. *Immunogenicity and safety of a strain-specific menb omv vaccine delivered to under 5-year olds in new zealand.* *Vaccine*, **2007**, 25, 3075-3079.

PETRÁŠ, M., I. K. LESNÁ. *Manuál očkování 2010*. 3. vyd. [Praha: Marek Petráš], **2010**. ISBN 978-80-254-5419-0.

PEUTHERER, J. F., C. B. SLACK a D. GREENWOOD. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Vyd. 1., čes. Praha: Grada, **1999**, 686 s. (662-665; 436-437 s.). ISBN 80-716-9365-0.

PIZZA, M.; V. SCARLATO; V. MASIGNANI, et al., *Identification of vaccine candidates against serogroup b meningococcus by whole-genome sequencing.* *Science*, **2000**, 287, 1816-1820.

PODSTATOVÁ, H. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Olomouc: EPAVA, **2001**, 283 s. (103-105 s.). ISBN 80-862-9707-1.

*RayBiotech* [online] **2016** [cit.23.5.2016]. Dostupný na WWW: <http://www.raybiotech.com/protein-array.html>

RAMASWAMY, S., T. R. GOLUB. *DNA microarrays in clinical oncology*. J. Clin. Oncol., **2001**, 20, p. 1932–1941.

RIEDEL, K.; P. CARRANZA, et. al. *Towards the proteome of burkholderia cenocepacia h111: Setting up a 2-de reference map*. Proteomics, **2006**, 6, 207-216.

RIGHETTI P. G., A. CASTAGNA, et. al.: *Proteomics* 3, 1397, **2003**.

ROBBINS J. B., R. SCHNEERSON, et al. *Capsular polysaccharide vaccine for Group B Neisseria meningitidis, Escherichia coli K1, and Pasteurella haemolytica A2*. Proc Natl Acad Sci U S A **2011**;108(44):17871–5.

ROHANI, P.; J. M. DRAKE. *The decline and resurgence of pertussis in the us*. Epidemics, **2011**, 3, 183-188.

RYŠKOVÁ, O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. Praha: Karolinum, **2007**, 103 s. (58-63 s.). ISBN 978-80-246-0135-9.

SANTOLAYA M. E., M. L. O'RYAN, et al. *Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study*. Lancet **2012**; 379(9816):617–24.

SERRUTO D., T. SPADAFINA, et al. *Neisseria meningitidis GNA2132, a heparin-binding protein that induces protective immunity in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A **2010**;107(8):3770–5.

Shimadzu [online] **2016** [cit.23.5.2016].Dostupný na WWW:

<http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/46/46intro.html>

SNAPE M. D., D. MEDINI, et al *The challenge of post-implementation surveillance for novel meningococcal vaccines*. Vaccine **2012**;30(Suppl 2):B67–72.



SU, Y. C.; K. L. WAN; , R. MOHAMED; S. NATHAN. *Immunization with the recombinant burkholderia pseudomallei outer membrane protein omp85 induces protective immunity in mice*. *Vaccine*, **2010**, 28, 5005-5011.

TALAPATRA, A., R. ROUSE, G. HARDIMAN. *Protein microarrays: challenges and promises*. *Pharmacogenomics*, **2002**, 3, p. 1–10.

TAPPERO J. W., R. LAGOS, et al. *Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile*. *JAMA***1999**;281(16):1520–7.

TEFON, B. E.; S. MAASS; et. al. *A comprehensive analysis of bordetella pertusis surface proteome and identification of new immunogenic proteins*. *Vaccine*, **2011**, 29, 3583-3595.

*ThermoFisher* [online].**2016** [cit. 23.5.2016]. Dostupný na WWW:

<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-mass-spectrometry.html.html>

TEMPLIN, M. F., D. STOLL, et al. *Protein microarray technology*. *Drug Discov. Today*, **2002**, 7, p. 815–822.

TETTELIN H., N. J. SAUNDERS, et al. *Complete Genome Sequence of Neisseria meningitidis Serogroup B Strain MC58*. *Science* **2000**;287(5459):1809–15.

TONEATTO D., P. OSTER, et al. *Early clinical experience with a candidate meningococcal B recombinant vaccine (rMenB) in healthy adults*. *Hum Vaccin* **2011**;7(7):781–91.

Types of Vaccines. *Vaccines.gov* [online] **2012** [cit. 2016-04-30]. Dostupné

z: [http://www.vaccines.gov/more\\_info/types/#dna](http://www.vaccines.gov/more_info/types/#dna)

*Vaccines Europe: An industry for healthy lives* [online]. **2015** [cit. 2016-05-26]. Dostupné z: <http://www.vaccineseuropa.eu/about-vaccines/key-facts-on-vaccines/how-are-vaccines-produced/>

VÁŇA P., J. MARDA, *Chem. Listy* 98, 1130, **2004**.

Vical [online]. **2003** [cit. 23.5.2016]. Dostupný na WWW: <http://www.vical.com/technology/dna-technology/>

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, **2005**, 351 s. (279-283 s.). ISBN 80-868-5000-5.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, **2010**, 495 s. (s. 131-137; 270; 296-299; 309-311). ISBN 978-80-86850-04-7.

Výroba vakcín. *Očkovacie noviny* [online]. Slovensko: Snowball Communications, **2012** [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.ockovacienoviny.sk/vyroba-vakcin/>

WILKINS M. R., J. C. SANCHEZ, et al. *Biotech. Gen. Eng. Reviews* 13, 19, **1995**.

WASINGER V. C., S. J. CORDWELL, et al., *Electrophoresis* 16, 1090, **1995**.

WEISER, J., M. HOLUB, Š. NEZBEDOVÁ a S. BEZOUŠKOVÁ. *Proteomika jako komplexní přístup ke studiu fyziologických regulací u bakterií*. *Chemické listy* [online]. **2005**, **99**(12), 890-895 [cit. 2016-05-17]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_890-895.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_890-895.pdf)

WELSCH J. A., G. R. MOE, et al. *Antibody to genome-derived neisserial antigen 2132, a Neisseria meningitidis candidate vaccine, confers protection against bacteremia in the absence of complement-mediated bactericidal activity*. *J Infect Dis* **2003**;188(11):1730–40

WESTERMEIER R., T. NAVEN. *Proteomics in Practice. A Laboratory Manual To Proteome Analysis*. Wiley- VCH, Weinheim **2002**.

WILSON, D. S., S. NOCK. *Functional protein microarrays*. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, *6*, p. 81–85.

WYLE F. A., M. S. ARTENSTEIN, et al. *Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines*. *J Infect Dis* **1972**;**126**(5):514–21.

ZDRÁHAL Z., J. PLOCEK, P. KONEČNÝ, J. CHMELÍK, *Chem. Listy* *91*, 811, **1997**.

ZHANG, W., B. T. CHAIT. *ProFound: An Expert System for Protein Identification Using Mass Spectrometric Peptide Mapping Information*. *Analytical Chemistry* [online]. **2000**, **72**(11), 2482-2489 [cit. 2016-05-17]. DOI: 10.1021/ac991363o. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac991363o>

ZHU, Y. Z.; C. S. CAI; et. al. *Immunoproteomic analysis of human serological antipody responses to vaccination with whole-cell pertussis vaccine (wcv)*. *PLoS One*, **2010**, **5**, 13915.v