

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Autoreferát dizertační práce

Mgr. Juraj Lenčo

Hradec Králové
2007

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové



Analýza exprese intracelulárního patogena *Francisella tularensis* kultivovaného za stresových podmínek a v průběhu interakce s hostitelskou buňkou

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Juraj Lenčo

Hradec Králové
2007

Dizertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu lékařská biologie na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze a Ústavu molekulární patologie Fakulty vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Univerzita obrany Brno.

Uchazeč: **Mgr. Juraj Lenčo**
Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Univerzita obrany Brno.

Školitel: **Doc. MUDr. Jiří Stulík, CSc.**
Ústav molekulární patologie, Fakulta vojenského zdravotnictví Hradec Králové, Univerzita obrany Brno

Školitel konzultant: **Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.**
Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze

Oponenti: **RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.**
Oddělení bakteriologie
Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno

RNDr. Jaroslav Weiser, CSc.
Mikrobiologický ústav
Akademie věd České republiky

Obhajoba se koná před komisí pro obhajoby disertačních prací v doktorském studijním programu
lékařská biologie

v úterý 25. září 2007 v 11.00 hodin,
zasedací místnost děkanátu LF, Šimkova 870,
500 38 Hradec Králové

Stanovisko k dizertační práci vypracovala oborová rada oboru lékařská biologie akreditovaného na Ústavu lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR č. LN00A033 a projektu MO0FVZ0000501

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, Hradec Králové

Prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu lékařská biologie.

OBSAH

1	Úvod	5
2	Cíl práce.....	6
3	Literární přehled	7
3.1	Bakterie <i>Francisella tularensis</i>	7
3.2	Modulace genové exprese prostředím	8
3.3	Proteom a proteomická analýza	10
4	Metody.....	11
4.1	Kultivace bakterie <i>F. tularensis</i> LVS	11
4.2	Infikování buněk monocyto-makrofágové linie J774.2	12
4.3	Proteomická analýza založená na 2D-PAGE	12
4.4	„Shotgun“ proteomika	13
5	Souhrn výsledků a diskuze.....	14
5.1	Proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> LVS na prostředí hostitele.....	14
5.2	Proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> LVS a <i>F. tularensis</i> LVS $\DeltaiglC1+2$ na oxidativní stres.....	14
5.3	Proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> na nedostatek železa	15
5.4	„Shotgun“ proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> LVS na změny teploty a prodlouženou dobu kultivace.....	16
5.4.1	Proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> na teplotu kultivace 25 °C	18
5.4.2	Proteomická analýza odpovědi bakterie <i>F. tularensis</i> na teplotu kultivace 42 °C	20
5.4.3	Proteomická analýza bakterie <i>F. tularensis</i> ve stacionární fázi růstu	20
6	Souhrn.....	21
7	Summary.....	22
8	Literatura	23
9	Publikace uchazeče	25

POUŽITÉ ZKRATKY

2D-PAGE	Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
CFU	Kolonii tvořící jednotka (Colony Forming Unit)
CHAPS	3-[(3-cholamidpropyl)dimethylamonium]-1-propanosulfonová kyselina
COG	Skupiny orthologních proteinů (Clusters of Orthologous Groups)
CSP	Proteiny chladového šoku (Cold Shock Proteins)
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ESI	Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FPI	Ostrov patogenity bakterie <i>Francisella tularensis</i> (<i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
HSP	Proteiny tepelného šoku (Heat Shock Proteins)
IPG	Ukotvený pH gradient (Immobilized pH Gradient)
iTRAQ	Izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification)
LVS	Živý vakcinační kmen (Live Vaccine Strain)
MALDI	Desorpce a ionizace laserem v prostředí matrice (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSMS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
<i>m/z</i>	Poměr molekulové hmotnosti k náboji
PBS	Fosfáty pufovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
QTOF	Spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu (Quadrupole-Time of Flight)
RP	Chromatografie na reverzní fázi (Reversed Phase Chromatography)
SCX	Silně kation-výměnná chromatografie (Strong Cation Exchange Chromatography)
SDS	Dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl Sulphate)
SSP	Číslo skvrny (Sample Spot Number)

1 ÚVOD

Studium patogenity bakteriálních infekcí v současné době patří mezi oblasti biomedicínského výzkumu, kterým je věnována značná pozornost. Tento stav je zapříčiněn především stále se rozšiřující rezistencí na antibiotika a antimikrobiální chemoterapeutika, v druhé řadě se tak děje v důsledku reálné hrozby zneužití vysoce patogenních bakteriálních kmenů jako teroristických prostředků. Hlubší znalosti molekulární patogenity infekčních chorob mohou v budoucnu vést k objevu nových farmakologických cílů nebo ke konstrukci účinnějších a bezpečnějších

vakcín pro aktivní či pasivní imunizaci. Významným zdrojem informací o molekulární patogenezí bakteriálních infekcí je mimo jiné studium reakcí mikroba na prostředí, se kterým se setkává v průběhu interakce s hostitelským organismem. Evoluce této interakce se z pohledu hostitelských organismů nesla ve znamení neustálého zdokonalování strategií, jak se účinně bránit vzniku bakteriální infekce, nebo strategií, které vedou k eliminaci infekce. Na straně mikroorganismů současně docházelo ke zdokonalování nástrojů, jak zmiňované mechanismy přežít či obejít. Studium reakcí patogenních mikroorganismů na stresové faktory, jež tvoří podstatu zmiňovaných strategií hostitele, v mnoha případech napomáhá identifikovat molekulární nástroje, které jsou pro patogenezí infekce stěžejní.

Nástup proteomických technologií poskytl ideální nástroj pro sledování změn v expresi na proteinové úrovni v důsledku působení nejrůznějších faktorů. Jejich postupně zdokonalování a vývoj v dnešní době umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu až několika tisíců proteinů v jednom zcela automatizovaném experimentu.

2 CÍL PRÁCE

Cílem předložené dizertační práce bylo identifikovat změny v proteomu bakterie *F. tularensis* LVS vzniklé v důsledku působení různých faktorů včetně pobytu v intracelulárním prostředí hostitelské buňky. Analýza adaptačních odpovědí může přispět k odhalení mechanismů, které bakterii *F. tularensis* dovolují přežít nehostinné podmínky včetně podmínek panujících uvnitř hostitelského organismu. V rámci tohoto cíle bylo vytyčeno a postupně řešeno několik klíčových úkolů.

- Nalézt a vyzkoušet **kultivační systém** pro získání bakteriálních kultur s reprodukovatelným proteomem dosaženým jak při standardních podmínkách kultivace tak při působení rozmanitých stresových faktorů. Kultivační systém by měl dále umožňovat snadné monitorování bakteriálního růstu a jeho ovlivnění působením stresového faktoru.
- Pro citlivou detekci změn v proteomu, ke kterým dochází již po krátkém čase od začátku působení stresového faktoru, bylo nezbytné nalézt vhodnou **proteomickou metodu**.
- Pro analýzu změn proteomu, které se odehrávají v důsledku rozdílných teplot a času kultivace, zavést a optimalizovat pokročilou **kvantitativní „shotgun“ proteomickou metodu iTRAQ**.
- Pomocí výše uvedených metodických přístupů postupně charakterizovat změny v proteomu bakterie *F. tularensis* LVS, ke kterým dochází během **oxidativního stresu**, během kultivace v prostředí bez železa, během růstu při teplotách 25 °C a 42 °C, v důsledku prodloužené

dobu kultivace a během intracelulárního pobytu ve fagocytujících buňkách. Pozorované nálezy na závěr uvést do kontextu současných poznatků o molekulárních základech patogeneze tularémie.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Bakterie *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je kauzální původce relativně vzácné, avšak potenciálně nebezpečné zoonózy tularémie. Tento malý, nepohyblivý, gram-negativní kokobacilus se vyskytuje na celé severní hemisféře [1]. Původní klasifikace rozlišovala dva dominantní typy. Typ A představuje nejvíce virulentní kmen. Onemocnění vyvolaná tímto typem bez vhodné léčby často končí fatálně. Jako typ B se označují kmeny vyvolávající onemocnění s mírným průběhem. V současné době se rozlišují čtyři různé subtypy: *tularensis* (původní typ A), *holarctica* (původní typ B), *mediaasiatica* a *novicida*. Jednotlivé subtypy se vzájemně liší místem výskytu a určitou genetickou variabilitou, která rovněž ústí v rozdíly ve virulenci [2]. *F. tularensis* je vysoce infekční pro člověka a celou řadu jiných obratlovců. Inokulace nebo inhalace dávkou obsahující 10 CFU nejvíce virulentního subtypu A vede u neléčených jedinců až k 30% mortalitě [3, 4]. Na základě vysoké virulence a možnosti aerosolového rozšíření je bakterie *F. tularensis* zařazena vedle *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, botulotoxinu, viru pravých neštovic a virů hemoragických horeček Lassa, Ebola, Marburg do kategorie A seznamu potenciálních biologických zbraní zveřejňovaného pracovištěm Centers for Disease Control and Prevention v Atlantě, USA. Také proto je dnes velké úsilí soustředěno například na výzkum rychlých diagnostických a typizačních metod a vývoj bezpečné a účinné vakcíny [5]. V České republice není výskyt tularémie příliš častý a jejím původcem je méně virulentní subtyp *holarctica*. Z těchto důvodů u nás onemocnění nepředstavuje závažnější klinický problém.

Bakterie s tak velkým virulentním potenciálem jako *F. tularensis* musí disponovat sofistikovanými molekulárními nástroji, které jí umožní přežít nebo obejít obranné mechanismy hostitele. Je známo, že pro virulenci *F. tularensis* je stěžejní její schopnost nitrobuněčné proliferace v profesionálních fagocytech. Z 1804 genů obsažených v genomu *F. tularensis* bylo doposud identifikováno pouze několik genů nezbytných pro intracelulární proliferaci. Mezi geny nejlépe charakterizované ve vztahu k virulenci patří *iglA*, *iglC* *pdpA*, *pdpD*, *mgIA*. *F. tularensis* je schopna infikovat a proliferovat uvnitř široké řady fagocytujících i nefagocytujících buněk. Pro vstup bakterie do makrofágů se zdá být kritická opsonizace faktorem komplementu C3. Další možné cesty vstupu do makrofágů jsou založeny na Fcy receptoru, manózovém receptoru a lektinovém

surfaktantovém proteinu A bronchoalveolárního kompartmentu. Fagozom obsahující *F. tularensis* získává časný endozomální antigen EEA1, následně pozdní endozomální markery Lamp1 a Lamp2. Nedochozí však ke kolokalizaci s kathepsinem D a k významné acidifikaci kompartmentu. Za 2 až 4 hodiny po infekci se membrána fagozomu začíná rozpadat a bakterie uniká do cytoplazmy. Mezi 6. a 12. hodinou po infekci se pak mikrob začíná uvnitř buněk množit. Po 10 až 18 hodinách dochází u infikovaných buněk k indukci apoptózy za účasti vnitřní, mitochondriální cesty. Nedávné výzkumy ukazují, že infekce kmenem *F. tularensis* sice nejdříve vede k rychlé zánětlivé odpovědi, ale po internalizaci bakterie dochází k jejímu vymizení nebo prokazatelnému snížení [6, 7].

Po inkubační době, která je v průměru 3 až 6 dnů, se **onemocnění tularémie** manifestuje náhlými nespecifickými příznaky jako únava, bolest hlavy, nauzea, vysoká teplota a zimnice. Vedle těchto symptomů se objevuje tzv. primární komplex. Jedná se o ulceraci v místě vstupu infekce do organismu doprovázenou regionální lymfadenitidou. Průběh onemocnění u jednotlivých subtypů velmi záleží na interindividuálních rozdílech. Po zavedení účinných antibiotik do klinické praxe klesla průměrná mortalita u tularémie typu A z 30 % na 1-2 %. Infekce typem B je pro člověka považována za neletální, dokonce i když onemocnění zůstane neléčeno. **Léčebnou volbu** u tularémie člověka nadále zůstává aminoglykosidové antibiotikum **streptomycin**. Fluorochinolony jsou u tularémie zatím vnímány jako rezervní terapeutika indikována při selhání standardní terapie, při remisích a u komplikovaných případů [5]. Pro **aktivní imunizaci** vysoce rizikových skupin se dnes výjimečně používá živá LVS vakcína. Přímým předchůdcem živého vakcinačního kmene je kmen 155, který byl odvozen v padesátých letech minulého století z plně virulentního subtypu *holarctica*. Genetický základ oslabení kmene LVS není doposud přesně znám, u myší se chová jako avirulentní pouze při intradermálním podání a jeho aplikace nevyvolá protekci u všech vakcinovaných jedinců. Z těchto důvodů LVS vakcína nikdy nezískala povolení potřebná pro užívání v široké klinické praxi. Jelikož si kmen LVS zachoval virulenci pro hlodavce, standardně se používá ve zvířecích modelech tularémické infekce [8, 9].

3.2 Modulace genové exprese prostředím

Patogenní bakterie se během infekčního cyklu setkávají s velmi odlišnými životními podmínkami. Bakterie proto vyvinuly důmyslné mechanismy jak pomocí specifických signálů své okolí vnímat a bezprostředně se na něj změnou fenotypu adaptovat. Mezi nejjednodušší nástroje, kterými bakterie vnímají aktuální podmínky, patří **transkripční faktory**, jež přímo disponují senzorymi vlastnostmi. Složitější nástroje jsou pak zastoupeny **dvoukomponentovými regulačními systémy** spolu s

jejich komplexnější variantou fosforelé a dále „*quorum sensing*“ systémem. Snad nejvýraznější změnu ve fenotypu patogenní bakterie prodělávají během interakce s hostitelským organizmem. Produkce molekul, jež jsou klíčové pro přežití a proliferaci uvnitř hostitele je spouštěna jako reakce na působení určitých specifických podmínek. U rodu *Salmonella* lze velmi přesně popsat změny genové exprese v závislosti na průchodu trávicí trubici [10].

Do dnešní doby byly provedeny desítky analýz genové exprese patogenních bakterií během infekce *in vivo* nebo na *in vitro* modelu, které přispívají k objasnění molekulárních mechanismů virulence. Experiment u *F. tularensis* LVS využívající zablokování proteosyntézy eukaryotických buněk cykloheximidem a selektivní metabolické značení nově syntetizovaných bakteriálních proteinů umožnil identifikovat velmi významný faktor virulence, IglC protein [11].

Patogenní bakterie se v průběhu interakce s hostitelskou buňkou mohou setkat s účinky reaktivních kyslíkatých a dusíkatými radikálů. Jejich produkce je jedním ze stěžejních pilířů přirozené imunity zaměřené na boj proti patogenním mikroorganizmům. Bakteriální adaptivní odpověď na oxidativní stres je nejlépe charakterizována u *E. coli*. Úlohu klíčových regulátorů této odpovědi u *E. coli* a mnoha dalších bakterií hrají OxyR a SoxRS systémy [12].

Významnou součástí interakce hostitel-patogen je také role železa. Proteiny s vysokou afinitou k železu udržují koncentraci jeho volné složky uvnitř a na povrchu makroorganismu přibližně na úrovni 10^{-18} M. Tato hodnota je značně vzdálená od hranice 10^{-7} M, jejíž dosažení je pro zabezpečení proliferace mikrobů nezbytné [13]. Železo se účastní Fentonovy reakce, která je makroorganizmem cíleně využívána pro produkci mikrobicidních látek fagocytujících buněk. Tyto antimikrobiální nástroje představují integrální složku přirozené imunity. Na straně bakteriálních patogenů došlo k vývoji molekulárních nástrojů pro získávání železa přímo z hostitelských železo-vázajících proteinů nebo z hemu [14]. Nízká koncentrace železa v prostředí je pro mnohé patogenní bakterie signálem, který spouští produkci faktorů virulence [15]. U všech gramnegativních bakterií má v této regulaci zásadní význam transkripční faktor Fur. U *E. coli* kontroluje Fur přímo nebo zprostředkovaně expresi více než 90 genů. Mezi ně patří především geny kódující nástroje pro příjem a skladování železa, enzymy základních metabolických cest a proteiny chránící proti oxidativnímu poškození. U mnoha patogenních bakterií včetně patogenních kmenů *E. coli* patří do Fur operonu některé známé faktory virulence [15, 16].

Jako nejčastěji působící faktor může být označen výkyv teploty prostředí. Na patogenní bakterie působí během pobytu v přírodním

rezervoáru či přirozeném vektoru teplota venkovního prostředí, v průběhu interakce s buňkami savčího hostitele pak teplota teplokrevného organismu. Bakterie mají k dispozici několik mechanismů pro sledování teploty [17]. U modelové bakterie *E. coli* hraje ústřední roli v adaptační odpovědi na působení vyšší teploty transkripční faktor σ^{32} a dále σ^E . Vystavení vyšší teplotě vyvolá zvýšení produkce evolučně velmi konzervativních proteinů tepelného šoku označovaných jako HSP. Jejich syntéza probíhá konstitutivně, ale během vystavení vysokým teplotám a jiným stresovým faktorům je výrazně vyšší. Většinu z nich představují molekulové chaperony, které se váží na nově vznikající proteiny a napomáhají jim tak zaujmout správnou konformaci. Během působení stresových faktorů pak zabráňují poškození konformace proteinů a je-li poškozena, přispívají k její nápravě. Další početnou skupinu představují ATP-dependentní proteázy, které degradují proteiny s poškozeným prostorovým uspořádáním, u nichž náprava konformace selhala. Na pokles teploty bakterie reagují produkcí proteinů chladového šoku CSP (Cold Shock Proteins). CSP se rozděluje podle míry indukce při snížení teploty prostředí do dvou tříd a mají rozdílné funkce (zvýšení fluidity membrán, udržování funkční konformace mRNA atd.). Exprese genů regulovaných teplotou u patogenních bakterií může představovat komplexní adaptaci na kontakt s cílovým hostitelským organismem, jak je možné pozorovat u rodu *Shigella*, *Yersinia*, bakterie *Bordetella pertusis* a spirochety *Borrelia burgdorferi* [18].

Během kultivace v laboratorních podmínkách lze u bakterií pozorovat několik rozdílných fází růstu, které jsou způsobeny rozdíly v koncentraci živin a odpadních látek v čase [19]. Tyto podmínky indukují změny v genové expresi, které u mnoha bakterií ústí ve funkční nebo morfologické přizpůsobení. Tyto změny představují cílený adaptační mechanismus, který dovoluje uchovávat energii v prostředí bez živin. Rozhodujícím regulačním faktorem genové exprese v podmínkách nedostatku živin je alternativní faktor σ^S , který je regulátorem genů zapojených také u jiných stresových odpovědí a u *E. coli* kontroluje přibližně 100 genů včetně některých faktorů virulence [20].

3.3 Proteom a proteomická analýza

Změny genové exprese lze studovat na úrovni mRNA nebo na úrovni proteinů. Tak jako v jiných oblastech biologicko-medicínského výzkumu také ve studiu interakce hostitel-patogen se do popředí dostaly metody, jež umožňují analýzu exprese celého genomu nebo jeho rozsáhlé části („DNA microarrays“, v oblasti analýzy proteinů pak dvojrozměrná gelová polyakrylamidová elektroforéza (2D-PAGE) nebo modernější „shotgun“ proteomický přístup).

Termín **proteom** označuje kompletní soubor proteinů v určitém

čase přítomných v buňce, tkáni, orgánu nebo organismu. Nejvýznamnější předností proteomiky je analýza molekul přímo vytvářejících fenotyp organismu. Změny fenotypu organismu sice lze vyvozovat také z analýzy mRNA, porovnání dat z analýzy transkriptomu a proteomu však ukázalo, že jejich kvantitativní korelace je velice slabá. Analýza mRNA navíc nemůže určit konečný funkční stav budoucí proteinové molekuly, přesnou lokalizaci v buňce a molekuly, s kterými bude daný protein interagovat. **Proteomické technologie** dnes umožňují zkoumat tisíce proteinů v jednom experimentu. Aby toto bylo možné, musí být komplexní směs analytu nejprve rozdělena na jednotlivá individua, která budou v dalším kroku identifikována. Každý proteomický přístup proto kombinuje **metodu separační s metodou identifikační**.

Klasický proteomický přístup využívá separaci proteinů pomocí 2D-PAGE. Kvantitativní analýza je prováděna pomocí porovnání optické denzity správně přiřazených proteinových skvrn v gelech. Identifikace vybraných proteinů se provádí metodami založenými na hmotnostní spektrometrii [21, 22]. U „shotgun“ proteomiky k separaci dochází až na úrovni peptidů tzn., že komplexní proteinová směs je nejprve štěpena sekvenčně specifickou proteázou. Vzniklé proteolytické peptidy jsou následně separovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a on-line analyzovány metodou využívající tandemový hmotnostní spektrometr. Vlastní identifikace proteinů je založena na měření fragmentačních spekter peptidů v MSMS módu tandemového hmotnostního spektrometru. Vyhodnocovací software pak na základě fragmentačních spekter jednotlivých peptidů určí složení původní směsi proteinů [23]. U kvantitativní „shotgun“ analýzy je potřebné určit relativní koncentraci pro co největší počet peptidů. K tomuto účelu se používá derivatizace látkami obsahující stabilní izotopy jako např. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$. Peptidy značené látkou, která má totožnou chemickou strukturu, ale rozdílnou molekulovou hmotnost, se při HPLC a ESI ionizaci budou chovat identicky a hmotnostní spektrometr je bude schopen od sebe odlišit. Během posledních let se objevilo několik technik určených pro komparativní „shotgun“ analýzy. Technika iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation), která jako jediná provádí kvantifikaci v MSMS módu, umožňuje analýzu až čtyř vzorků, její nejnovější modifikace pak až osmi vzorků v jednom experimentu [24].

4 METODY

4.1 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS

Zásobní kultury *F. tularensis* LVS a mutantního kmene LVS $\DeltaiglC1+2$ byly získány kultivací na McLeod půdě. Bakteriální buňky určené

pro proteomické analýzy byly připraveny v tekutém Chamberlainovu médiu. Kultivace probíhala při 37 °C v orbitální třepače a proliferace bakterií byla sledována měřením O.D. suspenze. Pro metabolické značení byl použit methionin s radioaktivním izotopem ³⁵S. Za účelem navození oxidativního stresu byl do média přidán peroxid vodíku do finální koncentrace 5 mM. Pro analýzu vlivu nedostatku železa bylo použito médium bez síranu železnatého doplněné o 100 μM deferoxamin mesylátu. Pro sledování proteomu při různých teplotách prostředí byly bakterie kultivovány při 25 °C, 37 °C a 42 °C. Pro navození stacionární fáze byla bakteriální suspenze kultivována 24 h.

4.2 Infikování buněk monocyto-makrofágové linie J774.2

Pro analýzu odpovědi bakterie *F. tularensis* na intracelulární prostředí byly použity buňky myši monocyto-makrofágové linie J774.2 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Velká Británie). Exponenciálně rostoucí bakterie *F. tularensis* LVS (5×10^9) v 500 μl DMEM média bez séra a bez gentamicinu byly přidány k adherovaným buňkám J774.2. Na jednu buňku teoreticky připadalo 500 bakterií. Infekce buněk bakteriemi probíhala 60 min. Po uplynutí této doby byly buňky kultivovány 30 min v médiu bez methioninu a cysteinu a poté byl k buňkám v médiu přidán cykloheximid (200 μg/ml). Za 5 min byly doplněny chybějící aminokyseliny ve formě radioaktivních analogů v dávce 200 μCi/ml. Nově syntetizované bakteriální proteiny byly takto značeny po dobu 2 h.

4.3 Proteomická analýza založená na 2D-PAGE

V analýzách využívajících 2D-PAGE byly bakteriální buňky rozpuštěny ve 20 μl lyzačního pufru složeném z 28 mM Tris-HCl, 22 mM Tris-báze, 0,3 % SDS a přísadkou inhibitorů proteáz. Po precipitaci snižující koncentraci nežádoucího SDS byly proteiny rozpuštěny v 50 μl vzorkového pufru obsahujícím 9 M močovinu, 4 % CHAPS, 40 mM Tris-báze, 1,2 % v/v DeStreak a 5% v/v amfolyty pH 9-17. Pro stanovení obsahu radioaktivního izotopu síry byl použit kapalínový scintilátor LS 6000LL (Beckman, Fullerton, CA, USA).

Pro přípravu analytických gelů byly vzorky s proteiny o obsahu radioaktivity 5×10^6 dpm naředěny do objemu 350 μl rehydratačním pufrem obsahujícím 6 M močovinu, 2 M thiomočovinu, 4 % CHAPS, 40 mM Tris-báze, 1,2 % v/v DeStreak, 0,003 % w/v bromofenolové modři a 1 % v/v nebo 2 % v/v IPG pufru. Pro druhý směr byly připraveny gradientní 9-16% SDS-PAGE gely, které byly po elektroforéze intenzifikovány 2,5-difenyloxazolem, vysušeny na filtračním papíře a následně exponovány po dobu 5 dnů při -80 °C na RayMax Beta filmy (MP Biomedicals, Irvine,

CA, USA). Filmy byly digitalizovány pomocí CCD kamery Image Station 2000R (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) a získané obrazy podrobeny analýze v programu PDQuest (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Pro odhalení změn v syntéze proteinů v důsledku působení stresu bylo nastaveno kvantitativní (dvojnásobná změna intenzity) a statistické kritérium (Studentův *t*-testem, $p < 0.01$). Za účelem identifikace proteinů se změněnou produkcí hmotnostní spektrometrií byl připraven preparativní gel s nanáškou 500 μg obarvený Coomassie modří G-250 (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Skvrny splňující kritéria pro detekci kvantitativních a kvalitativních změn zadaná v softwaru PDQuest byly identifikovány přístupem „peptide mass fingerprinting“ pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) nebo přístupem zahrnujícím určení sekvence peptidů pomocí tandemového hmotnostního spektrometru ESI-QTOF UltimaTM API (Micromass, Manchester, Velká Británie). Pro vlastní porovnávání naměřených spekter byla použita proteinová databáze, která vznikla přeložením genomu *F. tularensis* kmenu SCHU S4.

4.4 „Shotgun“ proteomika

Pro tento metodický přístup byly bakteriální buňky lyzovány v 0,3% roztoku SDS. Po centrifugaci a odstranění nežádoucího SDS ultrafiltrací byla ve vzorku stanovena koncentrace bílkoviny pomocí BCA kitu (Sigma, St. Louis, MO, USA). Ke vzorkům odpovídajícím 100 μg proteinů bylo přidáno redukční a cystein-modifikační činidlo. Posléze byly proteiny přes noc inkubovány s trypsinem a dále zpracovány podle instrukcí výrobce iTRAQ kitu (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Vzorky *F. tularensis* připravené za různých teplot nebo délek kultivace byly značeny dle následujícího schématu.

Vzorek	iTRAQ značka
<i>F. tularensis</i> LVS, 25 °C, kultivace 5 h	iTRAQ 114
<i>F. tularensis</i> LVS, 37 °C, kultivace 5 h	iTRAQ 115
<i>F. tularensis</i> LVS, 42 °C, kultivace 5 h	iTRAQ 116
<i>F. tularensis</i> LVS, 37 °C, kultivace 24 h	iTRAQ 117

Získaná směs kovalentně značených peptidů byla kvůli obrovské komplexnosti nejprve rozdělena pomocí SCX-HPLC na 28 frakcí. Jednotlivé frakce byly zakoncentrovány, následně separovány pomocí RP-HPLC a peptidy analyzovány na tandemovém hmotnostním spektrometru ESI-QTOF UltimaTM API (Micromass, Manchester, Velká Británie).

K vlastnímu vyhodnocení spekter byl použit program Phenyx 2.1. (GeneBio, Ženeva, Švýcarsko) a proteinová databáze uložená v rámci NCBI nr, která vznikla přeložením genomu *F. tularensis* subtypu *holarctica*. Konečné výsledky byly exportovány do souboru, který obsahoval údaje o identifikovaných proteinech, jejich peptidech včetně intenzit iTRAQ reportérových iontů.

Vzhledem k velkému množství dat, které bylo vyprodukováno pomocí „shotgun“ přístupu, bylo nejprve přistoupeno k provedení **explorativních statistických analýz** (hierarchické shlukování, shlukování pomocí *k*-průměrů). Následně byly také provedeny **konfirmatorní analýzy** (Studentův *t*-test na hladině významnosti < 0.05). Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu STATISTICA cz verze 7.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA a StatSoft ČR, Praha, České republiky).

5 SOUHRN VÝSLEDKŮ A DISKUZE

5.1 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS na prostředí hostitele

Pro proteomovou analýzu intracelulárně lokalizovaných bakterií *F. tularensis* byl použit *in vitro* model simulující interakci mikroorganismu s hostitelskými fagocytujícími buňkami. Byl využit přístup založený na selektivním zablokování eukaryotní proteosyntézy cykloheximidem. Tento protokol byl již dříve použit ve studii, která u *F. tularensis* vedla k objevu prvního faktoru virulence [11]. I přes opakovanou snahu se nepodařilo získat dostatečně kvalitní 2D-PAGE proteinovou mapu. Na autoradiografickém filmu bylo možné pozorovat pouze několik skvrn. Porovnáním se standardní 2D-PAGE mapou lze usoudit, že mezi proteiny nejvíce produkované bakterií v intracelulárním prostředí makrofágů kupříkladu patří proteiny tepelného šoku GroES, GroEL, DnaK, protein rodiny AhpC/TSA a IglC protein.

5.2 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* LVS Δ iglC1+2 na oxidativní stres

Podářilo se nalézt celkem 21 proteinových skvrn a z nich úspěšně identifikovat 10 různých proteinů, jejichž produkce je během odpovědi na oxidativní stres významně zvýšena (protein rodiny AhpC/TSA, ATP-vázající podjednotka a peptidázová podjednotka ATP-žávislé proteázy, ClpB protein, HSP, HSP 90, hypotetický protein FTT1441, DnaK, GrpE, GroEL a GroES). Na rozdíl od práce Golovliova [11] nebyla při naší studii prokázána výrazná produkce IglC proteinu během oxidativního stresu. Námi identifikované proteiny se obecně účastní stabilizace proteinové

konformace, nápravy pozměněné konformace (molekulové chaperony) nebo degradace proteinů (ATP dependentní proteázy). Proteiny AhpC/TSA rodiny zahrnují alkylhydroperoxidreduktázy redukují peroxidy lipidů, které vznikají během působení oxidačních činidel. Potvrdila se předpokládaná zvýšená produkce proteinů chaperonu DnaK, a chaperoninů GroEL a GroES. Jejich zvýšená syntéza během odpovědi na oxidativní stres u *F. tularensis* LVS byla pozorována již Ericssonem [25]. Výsledky komparativní analýzy naznačují, že syntéza některých proteinů byla během oxidativního stresu snížena. Příkladem je protein sdružený s vnější membránou. Snížení jeho produkce bylo více jak dvounásobné a statisticky významné.

Cílem proteomické analýzy odpovědi *F. tularensis* na oxidativní stres bylo také ověřit, zda-li delece genů pro IglC protein ovlivní expresi *F. tularensis* LVS během oxidativního stresu. Mezi kmeny se významně lišila pouze syntéza proteinu AhpC/TSA. U obou kmenů byly tedy pozorovány velmi podobné proteinové profily vzniklé v důsledku působení peroxidu vodíku, a tak jeho potenciální regulační funkce v této reakci mohla být vyloučena.

5.3 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* na nedostatek železa

Celkem bylo nalezeno 141 proteinových skvrn, které vykazovaly odlišnou intenzitu mezi vzorky. Z tohoto počtu se podařilo úspěšně identifikovat přibližně 65% proteinů. Vůbec největší nárůst v syntéze vykazovaly varianty proteinu IglC. IglC protein je nejdéle známý a studovaný faktor virulence u *F. tularensis*. Již několik prací potvrdilo nezbytnost *iglC* genu pro schopnost *F. tularensis* přežít v makrofázích [26], schopnost úniku z fagozomu [27] a schopnost indukovat apoptózu v hostitelských buňkách [28]. Nedávno byla objevena také jeho úloha v útlumu prozánětlivé odpovědi hostitele následující po fagocytóze bakterie [29]. Gen *iglC* je lokalizován v předpokládaném *igl* operonu, který sestává celkem ze čtyř genů. Operon se nachází ve zdvojeném ostrovu patogenity FPI [30]. V naší studii jsme rovněž pozorovali zvýšenou produkci IglA a IglB proteinů. Kromě proteinů z *igl* operonu byla zvýšená produkce vlivem strádání železem rovněž pozorována u hypotetického proteinu 1707 kódovaného v FPI. Z množiny doposud známých faktorů virulence byl pozitivní vliv nedostatku železa na produkci pozorován dále u ClpB proteinu. Mezi skvrnami se zvýšenou intenzitou byly identifikovány dva proteiny, které jsou potenciálně zapojeny v procesech získávání a ukládání železa (hypotetický protein 1441, který vykazuje homologii s bakterioferitinem (E-value 1×10^{-42}), a izochorizmatáza hydroláza, jehož úloha je lokalizována na začátku biosyntetické cesty vedoucí k produkci

sideroforů). Dále byla pozorována nadprodukce proteinů zapojených do detoxifikace reaktivních kyslíkatých radikálů (několik variant AhpC/TSA proteinu, peroxidáza/kataláza). Nedostatkem železa v prostředí byla pozitivně ovlivňována produkce několika proteinů s funkcí molekulárních chaperonů a proteinů zapojených do jejich obratu (již zmiňovaný ClpB, dále GroES, GroEL, Hsp90).

Jelikož je železo esenciálním faktorem enzymů různých metabolických cest, buňky trpící jeho nedostatkem nejsou schopny produkovat dostatečné množství energie a substrátů důležitých pro proteosyntézu. Tato situace ústí v nižší rychlost proliferace až nakonec dojde k jejímu úplnému zastavení. Není proto překvapující, že nejvíce proteinů, které vykazovaly sníženou úroveň syntézy, patří do COG kategorie J: translace, struktura ribozomů a jejich biogeneze. V prezentované práci byla pozorována nižší úroveň produkce tRNA syntetáz pro cystein, asparagin, lysin a threonin. Dále byla pozorována snížená produkce dvou proteinů zapojených do transkripce, COG kategorie K a tří proteinů patřících do skupiny COG C: produkce energie a její přeměna.

Studie vlivu nedostatku železa prokázala vliv jeho koncentrace v prostředí na produkci IglA, IglB a IglC proteinů. Dva geny z operonu *igl* byly dříve sledovány jako nezbytné pro virulenci *F. tularensis*. Tyto nálezy podporují hypotézu, že nedostatek železa, tedy faktor, s kterým se patogenní bakterie v průběhu patogenese setkávají velmi často, funguje jako signál pro spuštění produkce faktorů virulence, které mají umožnit přežít nehostinné prostředí hostitele [31].

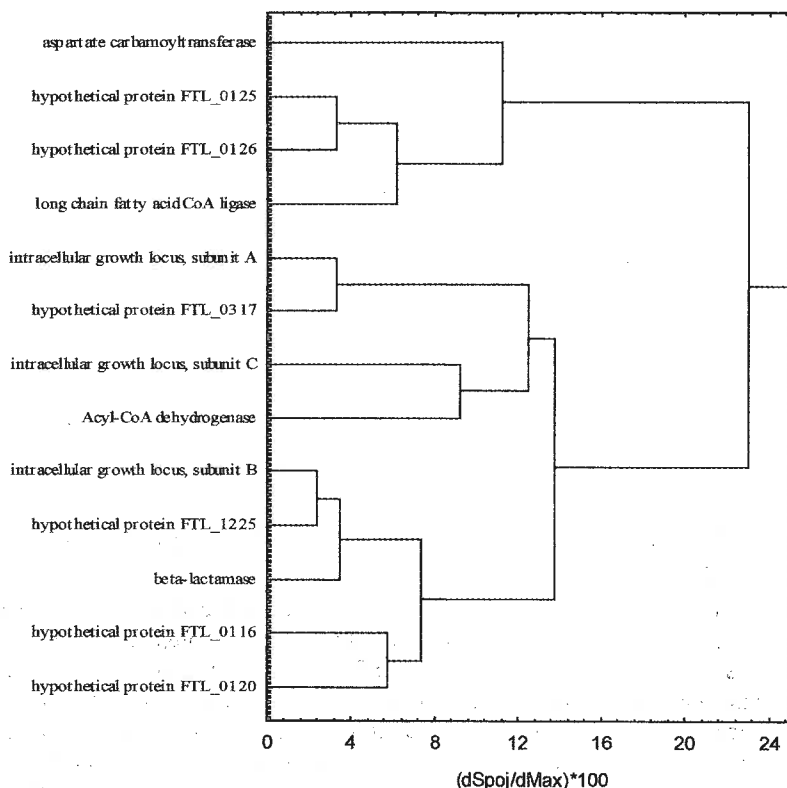
5.4 „Shotgun“ proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS na změny teploty a prodlouženou dobu kultivace

Po enzymatickém štěpení proteinů celobuněčných lyzátů bakterií *F. tularensis* LVS připravených za čtyř různých podmínek kultivace byly peptidy derivatizovány iTRAQ značkami. Modifikované peptidy byly smíšeny a tento vzorek byl frakcionován na SCX koloně. Toto uspořádání vedlo ke sběru celkem 28 frakcí. Nastavení HPLC systému pro RP chromatografii vedlo k účinné separaci značených peptidů každé frakce přibližně v rozmezí 18. až 75. min. Kombinace takto nastavené separace s parametry hmotnostního spektrometru QTOF zvolené v nastavení metody vedly k fragmentaci přibližně 9000 prekurzorových iontů. Z těchto spekter byla k 3712 z nich přiřazena sekvence peptidu, která pochází z proteinové databáze *F. tularensis* subtyp *holarctica*. To vedlo k identifikaci celkem 518 proteinů tohoto kmene s průměrným z-skóre 7,96. Pro kvantitativní analýzy byly vzaty pouze proteiny identifikované na nejméně 3 peptidy. Toto kritérium splňovalo 292 proteinů.

Data z iTRAQ analýzy byla nejprve podrobena explorativním

analýzám, které je umožnily porovnávat z globálního pohledu. Hierarchické shlukování proteinů na základě jejich kvantitativních profilů vedlo k vytvoření dendrogramu, v kterém byly proteiny s podobnými profily sloučeny do své blízkosti. V dendrogramu byly pak dobře patrné oblasti sdružující proteiny o podobné známé funkci. V případě známých faktorů virulence z FPI došlo k přiřazení Igl proteinů A, B a C do společného klastru. K tomuto klastru byly přiřazeny 4 hypotetické proteiny, které leží v blízkosti *igl* lokusu na ostrovu patogenity FPI (Obr. 1). Na základě porovnání podobnosti sekvencí v programu BLASTp byly k proteinům přiřazeny názvy určené pro subtyp *tularensis*: hypotetický protein FTL_0125 jako PdpB protein, hypotetický protein FTL_0126 jako PdpA protein, hypotetický protein FTL_0116 jako protein PdpC a hypotetický

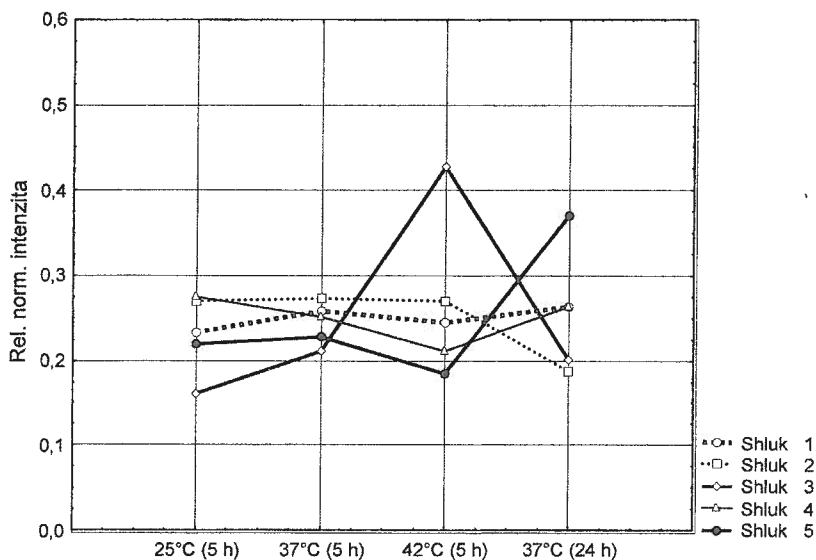
Obrázek 1. Výřez dendrogramu pro 292 proteinů ukazující přiřazení skupiny proteinů z FPI.



protein FTL_0120 jako hypotetický protein FTT1350.

K podobnému přiřazení proteinů bylo dosaženo použitím metody shlukování pomocí *k*-průměrů. Jednotlivé shluky lze velmi dobře charakterizovat podle průměrů svých členů (Obr. 2). Shluk 1 obsahoval proteiny, jejichž produkce se výrazně neměnila v závislosti na teplotě nebo době kultivace. Shluk 2 sdružuje proteiny, u kterých došlo k poklesu produkce ve stacionární fázi růstu. Proteiny výrazně produkované při vyšší teplotě, ale ne na stacionární fázi, jsou obsaženy ve shluku 3. Produkce proteinů sdružených ve shluku 4 negativně koreluje s teplotou kultivace. Proteiny sdružené ve shluku 5 jsou výrazně nadprodukovány během stacionární fáze růstu.

Obrázek 2. Graf průměrů všech shluků



5.4.1 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* na teplotu kultivace 25 °C

Proteiny, jejichž syntéza byla během kultivace při 25 °C snížena patří dle explorativních statistických analýz do shluku 3, který je charakterizován zejména přítomností HSP proteinů. Toto pozorování plně odpovídá významu těchto proteinů v nápravě poškozené konformace, která je na teplotu velmi citlivá. Následná konfirmatorní analýza dále odhalila statistické snížení produkce u několika dalších proteinů. Protein pro rozdělení buňky (gi|89256974) je homolog FtsK proteinu *E. coli*, který se

účastní dělení bakteriálních buněk [32]. Jeho nízká syntéza nejspíše souvisí s pomalou proliferací bakterií *F. tularensis* při 25 °C. Příčina snížené produkce omega podjednotky DNA-řízené RNA polymerázy je (gi|89256817) pravděpodobně shodná. Tento protein byl spolu s ostatními identifikovanými podjednotkami DNA-řízené RNA polymerázy zařazen do shluku 2, který je charakteristický především snížením produkce ve stacionární fázi. U podjednotek této polymerázy dochází ke snížení rovněž během kultivace při 25 °C. Podjednotka D preproteinové translokázy (gi|89256208) je homolog proteinu zajišťující export nově syntetizovaných proteinů SecD u *E. coli* (E-value $2,0 \times 10^{-114}$). Je zajímavé, že kmen s mutovaným *secD* genem je velmi citlivý na růst při teplotě 23 °C [33, 34]. Ke statisticky významnému snížení došlo u 4 hypotetických proteinů. Gen pro hypotetický protein FTL 0120 (gi|89255557) je lokalizován v FPI (lokus FTT1350 u kmene SCHU S4) a shlukování pomocí *k*-průměrů jej zařadilo do shluku 5 mezi známé faktory virulence. Některé identifikované proteiny z FPI rovněž vykázaly pokles v produkci při 25 °C oproti 37 °C. Tento pokles potenciálně může souviset se známou regulací faktorů virulence teplotou. Hypotetický protein FTL 0617 (gi|89256014) je homologem bakterioferitinu/feritinu. Kvantitativní profil jeho produkce vykazuje výraznou indukci syntézy ve stacionární fázi růstu, čímž se zařadil mezi proteiny shluku 5. Toto potvrzuje naše dřívější pozorování o jeho indukcii v prostředí bez železa, které může být při dlouhotrvající kultivaci v médiu vyčerpáno [35]. U hypotetického proteinu FTL 0822 (gi|89256185) nebyl doposud nalezen žádný sekvenčně podobný protein. Explorativní analýza jej zařadila do shluku 5 mezi známé faktory virulence. Membránový hypotetický protein (gi|89256931) byl u subtypu *novicida* označen jako protein sestavující piliny typu IV (zdroj NCBI). Shlukovací analýza jej přiřadila k ostatním identifikovaným proteinům spojeným s piliny do shluku 1.

Statisticky zvýšenou produkci vykázaly 4 proteiny, z nichž 3 byly zařazené do shluku 4, kde produkce proteinů negativně koreluje se vzrůstající teplotou. Chitináza (gi|89256806) je zapojena do transportu a metabolismu sacharidů. Nedávno bylo u subtypu *novicida* prokázáno, že tento protein je sekretován přes sekreční systém založený na pilinu IV [36] do okolního prostředí. Negativní korelace produkce s teplotou je rovněž dobře patrná u vnějšího membránového proteinu (gi|89255458), slaběji pak u enzymu inosin-5-monofosfát dehydrogenázy (gi|89256767). Hypotetický protein FTL 1494 (gi|89256783) není homologní s žádným doposud známým proteinem. Byl zařazen do shluku 5 mezi známé faktory virulence.

5.4.2 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* na teplotu kultivace 42 °C

Statisticky sníženou produkci vykazalo 13 proteinů. Nejčastěji se jednalo o proteiny ze shluku 4. U proteinů tohoto shluku lze obecně vypořovovat negativní korelaci produkce se zvyšující se teplotou prostředí. K této skupině patří 2 podjednotky proteinu P glycin štěpícího systému (gi|89255889, gi|89255890). Úlohou tohoto systému je produkce jednonuhlíkatých stavebních jednotek, které mohou být využity v biosyntéze purinů, thymidinu, histidinu, koenzymu A a methioninu. K poklesu produkce při 42 °C dochází také u dalších 2 identifikovaných proteinů spojených s tímto systémem. Signifikantní snížení produkce bylo pozorováno u 3 proteinů shluku 5, z čehož dva proteiny jsou kódovány na FPI: IglC protein (gi|89255550) a hypotetický protein FTL 0116 (gi|89255553), který byl pojmenován PdpC (lokus FTT1354 u kmene SCHU S4). Snížení produkce lze vypořovovat u všech identifikovaných proteinů kódovaných na *Igl* lokusu. S čím souvisí snížení produkce faktorů virulence *F. tularensis* v prostředí o teplotě 42 °C však není jasné. U hypotetického proteinu FTL 0317 (gi|89255747) není doposud znám žádný jeho homolog mimo rod *Francisella* (lokus FTT0825c u kmene SCHU S4). Také tento hypotetický protein by zařazen do shluku 5 k známým faktorům virulence z FPI.

Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS vedla ke zvýšení produkce celkem 8 proteinů. Všechny patří do rodiny HSP a kromě jednoho byly všechny přiřazeny ke shluku 3. Zvýšená produkce některých HSP byla u *F. tularensis* LVS při 42 °C doložena již dříve [25].

5.4.3 Proteomická analýza bakterie *F. tularensis* ve stacionární fázi růstu.

Proteiny se statisticky sníženou produkci až na výjimky spadaly do shluku 2. Mezi nimi bylo 11 ribozomálních proteinů a několik dalších proteinů, které se účastní transkripce nebo translace. Tento nálezu souvisí se zpomalením proliferace ve stacionární fázi. Protein A DEAD-boxu chladového šoku (gi|89256685) patří do nadrodiny II DNA a RNA helikáz. Pokles produkce ve stacionární fázi je s nejvyšší pravděpodobností zapříčiněn zastavením transkripce a translace v důsledku nedostatku živin v médiu. Při nízké hladině mRNA není potřeba syntetizovat protein, který stabilizuje její strukturu. Největší produkce tohoto proteinu byla pozorována během kultivace při 25 °C, což může souviset s obecnou reakcí na chladový šok. Protein tepelného šoku hsp 40 (gi|89255713) vykazoval výrazné snížení produkce ve stacionární fázi. Pravděpodobně proto byl shlukován pomocí *k*-průměrů zařazen do shluku 2 a nikoli mezi ostatní HSP do shluku 3.

Hypotetický protein FTL 0755 (gi|89256141), u kterého doposud nebyl nalezen žádný homolog, profilem produkce spadá do shluku 2.

Svým významem se jako nejzajímavější jevíly proteiny, jejichž produkce výrazně rostla ve stacionární fázi růstu. Patří mezi několik proteinů kategorizovaných do shluku 5. Je mezi nimi IglB (gi|89255549) a IglC (gi|89255550), hypotetický protein FTL 0116 (gi|89255553), tedy homolog proteinu PdpC (lokus FTT1354 u kmene SCHU S4) a hypotetický protein FTL 0125 (gi|89255562), což je homolog PdpB (lokus FTT1345 u kmene SCHU S4). Geny všech jmenovaných jsou lokalizovány na zdvojeném FPI a některé z nich patří mezi známé faktory virulence. Nedávná publikace potvrdila, že všechny geny v FPI jsou regulovány MglA transkripčním faktorem [37]. Proto mají identifikované proteiny kódované v této oblasti genomu podobné kvantifikační profily. V souladu s tím byly shlukování pomocí *k*-průměrů všechny sloučeny do shluku 5. Statistická významnost byla potvrzena jen v několika případech. Hypotetický protein FTL 1225 (gi|89256546) nemá homolog kromě FTT 0975 u kmene SCHU S4 subtypu *tularensis*. Jeho kvantifikační profil naznačuje spojitost s regulací FPI, což bylo potvrzeno na úrovni mRNA [37]. Statisticky významné změny v produkci byly zaznamenány u dvou proteinů, které se účastní odpovědi na oxidativní stres: protein rodiny AhpC/TSA gi|89256354 a bifunkční enzym peroxidáza/kataláza (gi|89256792). Toto pozorování je v souladu se známými fakty o regulaci genové exprese během stacionární fáze růstu jako odpovědi na přítomnost oxidačního poškození. Vnější membránové proteiny OmpA a OmpH byly zařazeny také do shluku 5. Tyto proteiny mohou být zodpovědné za morfologické změny, které se odehrávají při vstupu bakterií do stacionární fáze růstu. Proteinem výrazně indukovaným ve stacionární fázi, ale přiřazeným k jinému shluku, je člen rodiny proteinů pro vstup mykobakterií do buněk (gi|89256084). Tento protein je potenciálně spojený se vstupem a přežíváním mykobakterií v hostitelských buňkách.

6 SOUHRN

Francisella tularensis patří mezi nejvíce virulentní bakteriální agens vůbec. Experimentálně bylo prokázáno, že k plnému rozvinutí infekce postačuje pouze 10 CFU. Kvůli vzniku reálného nebezpečí zneužití *F. tularensis* k teroristickým účelům se v poslední době dostal tento mikrob do popředí intenzivního vědeckého zájmu.

Ačkoliv je publikováno stále více prací zabývajících se molekulárními mechanismy patogeneze tularémie, většina důležitých poznatků zůstává stále neobjevena. Dizertační práce si kladla za cíl identifikovat proteiny, které mohou v patogenezi tularémie zastávat významnou roli. V rámci zadání bylo provedeno několik proteomických

analýz odpovědi *F. tularensis* na faktory, se kterými se může setkat během infekčního cyklu. Analýza odpovědi na oxidativní poškození kromě indukce syntézy HSP proteinů odhalila zvýšení produkce alkyhydroperoxid-reduktázy. Zvýšená produkce tohoto enzymu byla dále pozorována v prostředí s nedostatkem železa a během stationární fáze růstu. Analýza také prokázala, že na regulaci odpovědi na oxidativní stres se nepodílí nejdéle známý faktor virulence, IglC protein. Později navíc nebyla potvrzena i dříve publikovaná indukce syntézy IglC proteinu v prostředí 5 mM peroxidu vodíku. Na základě výsledků analýzy proteomu bakterie kultivované v nepřítomnosti zdroje železa lze geny *igl* operonu zařadit do početné skupiny bakteriálních faktorů virulence, jejichž exprese je indukována v prostředí s nedostatkem tohoto esenciálního faktoru. Tyto nálezy byly potvrzeny podobnou studií provedenou na úrovni mRNA. „Shotgun“ kvantitativní proteomová studie spolu s explorativními statistickými analýzami odhalila velmi podobnou regulaci exprese genů *iglABC* a *pdpABC* u čtyř kultur kultivovaných za různých podmínek. U genů, které jsou za různých okolností exprimovány ve stejné míře, existuje reálný předpoklad, že se podílí na určitém obecném biologickém ději. Geny operonů *igl* a *pdp* se účastní patogeneze, proto existuje statistická pravděpodobnost, že také ostatní geny zařazené na základě analýzy iTRAQ kvantitativních proteomických dat do stejného shluku se mohou podílet na tomto ději.

Bakterie s tak vysokým patogenním potenciálem jaký je charakteristický pro *F. tularensis* musí disponovat velmi účinnými molekulárními nástroji virulence. K hledání konkrétních molekul s potenciálním vztahem k virulenci jsme v rámci dizertační práce použili proteomické metody. Dosažené a doposud publikované výsledky přesvědčivě dokazují účinnost zvoleného přístupu.

7 SUMMARY

Francisella tularensis belongs to the most virulent bacteria. The infectious dose even in humans is very low, at most 10 CFU. Because of real threat of terrorist misuse, the scientific interest has been focused on the bacterium recently.

Despite of great improvements made in the understanding of its virulence mechanism in recent years, a substantial part of this key process remains to be revealed yet. The main goal of the presented thesis was to identify proteins that may play a significant role in the pathogenesis of tularemia. Based on that goal, we performed proteomics analyses of responses to several environmental factors that may be meet by the bacterium during the infectious cycle. Analysis of oxidative stress response revealed among other the induction of synthesis of HSP species and

AhpC/TSA family protein. Increased production of the same enzyme was also observed during iron-starvation and during the stationary phase of growth as well. Furthermore, analysis of oxidative stress response excluded the regulatory role of IglC protein in the adaptation. Moreover, the detailed analysis performed later on, has clearly ruled out the involvement of IglC protein in a response to the oxidative stress induced by 5 mM hydrogen peroxide. Results obtained from proteome of bacterium grown in medium without any source of iron indicate that genes encoded in *igl* operon belong to a large group of bacterial virulence factors characterized by responsiveness to iron concentration. The findings were further strengthened by the previous study on mRNA level. Shotgun quantitative proteomics study in combination with exploratory data analysis revealed close regulation of expression *iglABC* and *pdpABC* genes under four different growth condition. There is a hope that the similarly regulated genes may be involved in similar biological process. Members of *igl* and *pdp* operons play a crucial role in pathogenesis of tularemia. Thus a hypothesis has arisen that proteins arranged with *k*-means clustering of iTRAQ data in the same cluster as Igl and Pdp proteins may also participate on the virulence.

Bacteria associated with, as high pathogenic potential as *Francisella tularensis*, must dispose very effective molecular tools for its virulence. Within the scope of the presented thesis, we applied the proteomics methods for mapping of molecules potentially associated with virulence in *Francisella tularensis*. The obtained and successfully published results conclusively proved efficiency of selected approach.

8 LITERATURA

- [1] Tamvik, A. and Berglund, L. (2003) Tularaemia. Eur Respir J 21, 361-373.
- [2] Sjøstedt, A. (2005) Francisella. In: The Proteobacteria, Part B (Brenner, K. and Staley, G., Eds.), Vol. pp. 200-210. Springer, New York.
- [3] Saslaw, S., Eigelsbach, H.T. and Wilson, H.E. (1961) Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. Arch Intern Med 107, 689-701.
- [4] Saslaw, S., Eigelsbach, H.T. and Wilson, H.E. (1961) Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. Arch Intern Med 107, 702-714.
- [5] Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O'Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K. and Tonat, K. (2001) Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. Jama 285, 2763-2773.
- [6] Sjøstedt, A. (2005) Intracellular survival mechanisms of Francisella tularensis, a stealth pathogen. Microbes Infect.
- [7] Sjøstedt, A. (2003) Virulence determinants and protective antigens of Francisella tularensis. Curr Opin Microbiol 6, 66-71.
- [8] Isherwood, K.E., Titball, R.W., Davies, D.H., Felgner, P.L. and Morrow, W.J. (2005) Vaccination strategies for Francisella tularensis. Adv Drug Deliv Rev 57, 1403-1414.

- [9] Conlan, J.W. (2004) Vaccines against *Francisella tularensis*--past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 3, 307-314.
- [10] Rychlik, I. and Barrow, P.A. (2005) *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. *FEMS Microbiol Rev* 29, 1021-1040.
- [11] Golovliov, I., Ericsson, M., Sandstrom, G., Tarnvik, A. and Sjostedt, A. (1997) Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infect Immun* 65, 2183-2189.
- [12] Storz, G. and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2, 188-194.
- [13] Schaible, U.E. and Kaufmann, S.H. (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2, 946-953.
- [14] Andrews, S.C., Robinson, A.K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215-237.
- [15] Litwin, C.M. and Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6, 137-149.
- [16] Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 172-177.
- [17] Rowbury, R.J. (2005) Intracellular and extracellular components as bacterial thermometers, and early warning against thermal stress. *Sci Prog* 88, 71-99.
- [18] Konkel, M.E. and Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2, 157-166.
- [19] Finkel, S.E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 4, 113-120.
- [20] Lacour, S. and Landini, P. (2004) SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J Bacteriol* 186, 7186-7195.
- [21] Gorg, A., Weiss, W. and Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.
- [22] Henzel, W.J., Watanabe, C. and Stults, J.T. (2003) Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 931-942.
- [23] Nesvizhskii, A.I. (2006) Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol* 367, 87-120.
- [24] Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlett-Jones, M., He, F., Jacobson, A. and Pappin, D.J. (2004) Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 3, 1154-1169.
- [25] Ericsson, M., Tarnvik, A., Kuoppa, K., Sandstrom, G. and Sjostedt, A. (1994) Increased synthesis of DnaK, GroEL, and GroES homologs by *Francisella tularensis* LVS in response to heat and hydrogen peroxide. *Infect Immun* 62, 178-183.
- [26] Golovliov, I., Baranov, V., Krocova, Z., Kovarova, H. and Sjostedt, A. (2003) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* 71, 5940-5950.
- [27] Lindgren, H., Golovliov, I., Baranov, V., Ernst, R.K., Telepnev, M. and Sjostedt, A. (2004) Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *J Med Microbiol* 53, 953-958.
- [28] Lai, X.H., Golovliov, I. and Sjostedt, A. (2004) Expression of IglC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 37, 225-230.
- [29] Telepnev, M., Golovliov, I. and Sjostedt, A. (2005) *Francisella tularensis* LVS initially activates but subsequently down-regulates intracellular signaling and cytokine secretion in mouse monocytic and human peripheral blood mononuclear cells. *Microb Pathog* 38, 239-247.
- [30] Nano, F.E., Zhang, N., Cowley, S.C., Klose, K.E., Cheung, K.K., Roberts, M.J., Ludu, J.S., Letendre, G.W., Meierovics, A.I., Stephens, G. and Elkins, K.L. (2004) A *Francisella*

tularensis pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol* 186, 6430-6436.

[31] Lenco, J., Hubalek, M., Larsson, P., Fucikova, A., Brychta, M., Macela, A. and Stulik, J. (2007) Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiol Lett* 269, 11-21.

[32] Begg, K.J., Dewar, S.J. and Donachie, W.D. (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* 177, 6211-6222.

[33] Gardel, C., Johnson, K., Jacq, A. and Beckwith, J. (1990) The *secD* locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *Embo J* 9, 3209-3216.

[34] Pogliano, J.A. and Beckwith, J. (1994) SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *Embo J* 13, 554-561.

[35] Lenco, J., Hubalek, M., Larsson, P., Fucikova, A., Brychta, M., Macela, A. and Stulik, J. (2007) Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiol Lett*.

[36] Hager, A.J., Bolton, D.L., Pelletier, M.R., Brittnacher, M.J., Gallagher, L.A., Kaul, R., Skerrett, S.J., Miller, S.I. and Guina, T. (2006) Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol* 62, 227-237.

[37] Brotcke, A., Weiss, D.S., Kim, C.C., Chain, P., Malfatti, S., Garcia, E. and Monack, D.M. (2006) Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 74, 6642-6655.

9 PUBLIKACE UHAZEČE

9.1 Původní vědecké práce přímo se vztahující k dizertační práci

LENČO, J., KLIMTOVÁ, I., BRYCHTA, M., STULÍK, J. Towards proteome analysis of oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS. *Vojenská zdravotnická listy - Suplementum*, 2004, vol. 73, č. 1, s. 10-13.

LENČO, J., STULÍK, J. Identifikace proteinů kombinací peptidového mapování a fragmentace sulfonových peptidů. *Chemické listy*, 2004, vol. 0, č. 98, s. 264-267.

LENČO, J., PÁVKOVÁ, I., STULÍK, J., HUBÁLEK, M. Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant DeltaiglC1+2 by proteomics analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 1, č. 246(1), s. 47-54.

LENČO, J., HUBÁLEK, M., LARSSON, P., FUCIKOVA, A., BRYCHTA, M., MACELA, A., STULÍK, J. Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, vol. 1, č. 269(1), s. 11-21.

9.2 Další vědecké práce ve vědeckých časopisech

HUBÁLEK, M., HERNYCHOVÁ, L., BRYCHTA, M., LENČO, J., ZECHOVSKÁ, J., STULÍK, J. Comparative proteome analysis of cellular proteins extracted from highly virulent *Francisella tularensis* ssp. *tularensis* and less virulent

F. tularensis ssp. holarctica and F. tularensis ssp. mediaasiatica. *Proteomics*, 2004, vol. 4, č. 10, s. 3048-3060.

NEUBAUEROVÁ, V., MACELA, A., STULÍK, J., HERNYCHOVÁ, L., HAVLASOVÁ, J., KROČOVÁ, Z., LENČO, J., BRYCHTA, M., KOPECKÝ, J., PECHOVÁ, J. Identification of selected proteins of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex microbes. *Vojenské zdravotnické listy - Supplementum*, 2004, vol. 73, č. 1, s. 23-26.

ŠLOSROVÁ, K., HERNYCHOVÁ, L., LENČO, J., REICHELOVÁ, M., STULÍK, J., MACELA, A. Proteome analysis of culture filtrate proteins of *Francisella tularensis*. *Vojenské zdravotnické listy - Supplementum*, 2004, vol. 73, č. Suppl. 1, s. 16-20.

HAVLASOVÁ, J., HERNYCHOVÁ, L., HUBÁLEK, M., LENČO, J., BRYCHTA, M., LARSSON, P., LUNDQUIST, M., MACELA, A., KROČOVÁ, Z., STULÍK, J. Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics*, 2005, vol. 5, č. 8, s. 2090-2103.

PÁVKOVÁ, I., HUBÁLEK, M., ZECHOVSKÁ, J., LENČO, J., STULÍK, J. *Francisella tularensis* live vaccine strain: proteomic analysis of membraneproteins enriched fraction. *Proteomics*, 2005, vol. 5, č. 9, s. 2460-2467.

SKULTETY, L., HERNYCHOVÁ, L., TOMAN, R., HUBÁLEK, M., SLABA, K., ZECHOVSKÁ, J., STOFANIKOVA, V., LENČO, J., STULÍK, J. *Coxiella burnetii* whole cell lysate protein. Identification by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, č. 1063, s. 1-8.

SZKANDEROVÁ, S., VÁVROVÁ, J., HERNYCHOVÁ, L., NEUBAUEROVÁ, V., LENČO, J., STULÍK, J. Proteome alterations in gamma-irradiated human T-lymphocyte leukemia cells. *Radiation Research*, 2005, č. 163, s. 307-315.

JANOVSKÁ, S., PÁVKOVÁ, I., HUBÁLEK, M., LENČO, J., MACELA, A., STULÍK, J. Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. *Immunology Letters*, 2007, vol. 15, č. 108(2), s. 151-9.

MUSIL, Z., ZIMČÍK, P., MILETÍN, M., KOPECKÝ, K., PETŘIKA, P., LENČO, J. Influence of electron-withdrawing and electron-donating substituents on photophysical properties of azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2007, č. 186 (2-3), s 316-322.

9.3 Kapitoly v monografiích

KROČOVÁ, Z., STULÍK, J., HARTMANOVÁ, B., HERNYCHOVÁ, L., HUBÁLEK, M., LENČO, J., BRYCHTA, M., KROČA, M., MACELA, A.

Interaction of Francisella tularensis live vaccine strain with eukaryotic cells. In *Immunology*. 1. vyd. Englewood: Medimont, 2004, s. 417-421.

STULÍK, J., HUBÁLEK, M., HERNYCHOVÁ, L., HAVLASOVÁ, J., LENČO, J., MACELA, A., GOLOVLIOV, I., SJOSTEDT, A. Francisella tularensis. In *Biomolecular Applications of Proteomics*. 1. vyd. Weinheim: WILEY, 2004, s. 285-313.

HUBÁLEK, M., HERNYCHOVÁ, L., BRYCHTA, M., LENČO, J., ZECHOVSKÁ, J., STULÍK, J. Comparative proteomic analysis of cellular proteins extracted from highly virulent Francisella tularensis ssp. tularensis and less virulent F. tularensis ssp. holarctica and F. tularensis ssp. mediaasiatica. In *Proteomics of Microbial Pathogens*. 1. vyd. Weinheim: WILEY, 2006, s. 249-265.

STULÍK, J., KROČOVÁ, Z., KROČA, M., HERNYCHOVÁ, L., HÄRTLOVÁ, A., JANOVSKÁ, S., LENČO, J., HUBÁLEK, M., PÁVKOVÁ, I., MACELA, A. Imunita proti tularemii: Lekce z intracelulárního bakteriálního parazitismu. *Alergie*, 2006, vol. 8, č. S2, s. 10-11.

9.4 Abstrakta

SZKANDEROVÁ, S., VÁVROVÁ, J., HERNYCHOVÁ, L., NEUBAUEROVÁ, V., LENČO, J., STULÍK, J. The MOLT-4 cells response to ionizing radiation analyzed by proteomics. In *Understanding Biological Systems through Proteomics*. Basel (Switzerland) 2003, s 175.

HERNYCHOVÁ, L., ŠLOSROVÁ, K., LENČO, J., HUBÁLEK, M., KLIMTOVÁ, I., BRYCHTA, M., STULÍK, J., MACELA, A., MUJER, C.V., DELVECCHIO, V.G.. Analysis of culture filtrate proteins of Francisella tularensis. In *Abstract book of the 6th Siena meeting: From Genome to proteome biomarker discovery & proteome imaging*. Siena (Italy) 2004, s. 228.

NEUBAUEROVÁ, V., HERNYCHOVÁ, L., LENČO, J., BRYCHTA, M., MACELA, A., STULÍK, J., KOPECKÝ, J., PECHOVÁ, J. Identifikace proteinů s rozdílnou expresí u tří zástupců Borrelia burgdorferi sensu lato. In *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*. Praha : Československá společnost mikrobiologická, 2004, vol.45, s. 83.

SZKANDEROVÁ, S., KLIMTOVÁ, I., LENČO, J., STULÍK, J. Immunoproteomic approach for identification of vaccine candidate antigens of Francisella tularensis LVS. In *From genome to proteome: Biomarker discovery and imaging proteomes, 6th Siena Meeting, Abstract book*. Siena (Italy) 2004, s. 372.

ŠKULTÉTY, L., HERNYCHOVÁ, L., TOMAN, R., SLABÁ, K., ZECHOVSKÁ, J., HUBÁLEK, M., LENČO, J., HULST, A.G., DE JONG, A.L., STULÍK, J., MACELA, A. Mapping and identification of major proteins of Coxiella burnetii by

peptide mass fingerprinting. In *Abstract book of The Swiss Proteomics Society 2004 Congress*. Bern (Switzerland) 2004.

ŠLOSROVÁ, K., HERNYCHOVÁ, L., HUBÁLEK, M., ZECHOVSKÁ, J., LENČO, J., SZKANDEROVÁ, S., KLIMTOVÁ, I., STULÍK, J., MACELA, A., MUJER, C.V., DELVECCHIO, V.G.. Identifikace proteinů izolovaných z filtrátu po kultivaci bakterie *Francisella tularensis* v tekutém médiu. In *Bulletin Československé společnosti mikrobiologické*. Praha: Československá společnost mikrobiologická, 2004, vol.45, s. 279.

LENČO, J., HERNYCHOVÁ, L., HUBÁLEK, M., ŠLOSROVÁ K., STULÍK, J., MACELA, A. Analysis of alteration in protein patterns in *Francisella tularensis* LVS induced by iron-restriction. In *Book of Abstracts: 2nd Czech Proteomic Conference*. Lednice, Czech Republic 2005, vol. 2.

LENČO, J., HUBÁLEK, M., FUČÍKOVÁ A, KROČA, M., STULÍK, J. Proteome analysis of the *Francisella tularensis* response to iron restriction. In *Conference proceedings: Expanding Proteomics*. Zurych, Switzerland 2005.

SKULTÉTY, L., HERNYCHOVÁ, L., ŠTOFÁNIKOVÁ, V., TOMAN, R., SLABÁ, K., ZECHOVSKÁ, J., HUBÁLEK, M., LENČO, J., STULÍK, J., MACELA, A. *Coxiella burnetii* whole cell lysate proteins. identification by MS and MS/MS techniques. In *Book of Abstracts - 4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Logrono (La Rioja), Spain 2005, s. 0-14.

LENČO, J., ŠTĚRBA, M., BRYCHTA, M., MAZUROVÁ, Y., POPELOVÁ, O., GERŠL, V., STULÍK, J. Proteomic analysis in the study of anthracycline-induced cardiomyopathy. In *Molecular and Cellular Proteomics*. USA: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2006, vol.5, s. S 83.