

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	BAKTERIE <i>FRANCISELLA TULARENSIS</i>	8
2.1.1	<i>Obecná charakteristika</i>	8
2.1.2	<i>Onemocnění tularemie</i>	9
2.1.2.1	Klinické formy tularemie.....	9
2.1.2.2	Terapie	10
2.1.2.3	Vakcinace	10
2.1.3	<i>Molekulární mechanizmy virulence u F. tularensis</i>	12
2.1.4	<i>Interakce F. tularensis s hostitelskými buňkami</i>	14
2.2	MODULACE GENOVÉ EXPRESE PROSTŘEDÍM	16
2.2.1	<i>Odpověď bakterií na prostředí hostitele</i>	17
2.2.2	<i>Odpověď bakterií na oxidativní stres</i>	17
2.2.3	<i>Odpověď bakterií na nedostatek železa</i>	19
2.2.4	<i>Odpověď bakterií na změny teploty prostředí</i>	20
2.2.5	<i>Odpověď bakterie na prodlouženou dobu kultivace</i>	22
2.3	PROTEOM A PROTEOMICKÁ ANALÝZA.....	23
2.3.1	<i>Klasický proteomický přístup</i>	24
2.3.1.1	Dvojměrná gelová elektroforéza (2D-PAGE).....	24
2.3.1.2	Hmotnostně spektrometrické identifikační techniky následující po 2D-PAGE	25
2.3.2	<i>„Shotgun“ proteomika</i>	27
2.3.2.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	27
2.3.2.2	Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	28
2.3.2.3	Kvantifikační techniky pro „shotgun“ proteomiku	29
2.4	STATISTICKÁ ANALÝZA	32
3	CÍL PRÁCE	33
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
4.1	MATERIÁL	36
4.1.1	<i>Kmeny bakterie F. tularensis</i>	36
4.1.2	<i>Buněčná kultura</i>	36
4.1.3	<i>Chemikálie</i>	36
4.1.4	<i>Přístroje</i>	36
4.2	KULTIVACE BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> LVS.....	37
4.2.1	<i>Kultivace bakterie F. tularensis LVS v intracelulárním prostředí</i>	38
4.2.1.1	Příprava bakterie <i>F. tularensis</i> LVS	38
4.2.1.2	Příprava monocyto-makrofágové linie J774.2	38
4.2.1.3	Infikování buněk J774.2	39
4.2.1.4	Provedení kontrolního experimentu.....	39
4.2.2	<i>Kultivace bakterie F. tularensis LVS a F. tularensis LVS ΔiglCI+2 pro analýzu odpovědi na oxidativní stres</i>	40
4.2.3	<i>Kultivace bakterie F. tularensis LVS pro analýzu odpovědi na nedostatek železa</i>	40
4.2.4	<i>Kultivace bakterie F. tularensis LVS pro analýzu odpovědi na změny teploty prostředí</i>	41
4.2.5	<i>Kultivace bakterie F. tularensis LVS pro analýzu stacionární fáze růstu</i>	41
4.3	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ZALOŽENÁ NA 2D-PAGE	42
4.3.1	<i>Příprava vzorků pro analytickou 2D-PAGE</i>	42
4.3.1.1	Vzorky bakterie <i>F. tularensis</i> LVS po infekci buněk J774.2	42
4.3.1.2	Vzorky bakterie <i>F. tularensis</i> LVS po působení izolovaných stresových faktorů	42
4.3.2	<i>Příprava analytických 2D-PAGE gelů</i>	43
4.3.2.1	Izoelektrická fokusace	43
4.3.2.2	SDS elektroforéza a autoradiografie	44
4.3.3	<i>Digitalizace a softwarové vyhodnocení analytických 2D-PAGE gelů</i>	46
4.3.4	<i>Identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE</i>	47
4.3.4.1	Stanovení koncentrace proteinů.....	47
4.3.4.2	Příprava preparativního 2D-PAGE gelu	47
4.3.4.3	Štěpení proteinů v gelu	48
4.3.4.4	Identifikace proteinů pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF	48
4.3.4.5	Identifikace proteinů pomocí spojení HPLC/ESI-QTOF	51

4.3.5	<i>Analýza vybraných proteinů pomocí 2D-Western blotu</i>	55
4.4	„SHOTGUN“ PROTEOMIKA	56
4.4.1	<i>Testování iTRAQ metody na standardní směsi 6 proteinů</i>	56
4.4.2	<i>Zpracování vzorku pro kvantitativní „shotgun“ analýzu</i>	57
4.4.3	<i>Vysokoučinná kapalinová chromatografie</i>	58
4.4.3.1	SCX chromatografie peptidů	59
4.4.3.2	RP chromatografie peptidů	60
4.4.4	<i>Tandemová hmotnostní spektrometrie</i>	61
4.4.5	<i>Zpracování a vyhodnocení DDA dat</i>	61
4.5	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ KVANTITATIVNÍCH DAT.....	63
5	VÝSLEDKY	65
5.1	KULTIVAČNÍ SYSTÉM PRO PROTEOMICKÉ ANALÝZY <i>F. TULARENSIS</i>	66
5.2	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> LVS NA PROSTŘEDÍ HOSTITELE ..	66
5.3	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> LVS A <i>F. TULARENSIS</i> LVS <i>ΔIGLC1+2</i> NA OXIDATIVNÍ STRES	68
5.3.1	<i>Růst bakterií</i>	68
5.3.2	<i>Metabolické značení a 2D-PAGE</i>	69
5.3.3	<i>Identifikace proteinů se změněnou produkcí v důsledku působení oxidativního stresu pomocí hmotnostní spektrometrie</i>	70
5.3.4	<i>Závěr</i>	72
5.4	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> NA NEDOSTATEK ŽELEZA	72
5.4.1	<i>Růst bakterií</i>	72
5.4.2	<i>Metabolické značení a 2D-PAGE</i>	74
5.4.3	<i>Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie</i>	76
5.4.4	<i>Závěr</i>	80
5.5	„SHOTGUN“ PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> LVS NA ZMĚNY TEPLoty A PRODLouŽENou DOBU KULTIVACE.....	80
5.5.1	<i>Růst bakterií</i>	80
5.5.2	„Shotgun“ kvantitativní analýza	81
5.5.3	<i>Statistická explorativní analýza</i>	84
5.5.4	<i>Kvantitativní a konfirmatorní statistická analýza</i>	95
5.5.4.1	Proteiny se změněnou produkcí v důsledku kultivace při 25 °C	95
5.5.4.2	Proteiny se změněnou produkcí v důsledku kultivace při 42 °C	96
5.5.4.3	Proteiny se změněnou produkcí v důsledku růstu do stacionární fáze	97
6	DISKUZE	99
6.1	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> LVS A <i>F. TULARENSIS</i> LVS <i>ΔIGLC1+2</i> NA OXIDATIVNÍ STRES	100
6.2	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> NA NEDOSTATEK ŽELEZA	102
6.2.1	<i>Proteiny se zvýšenou produkcí v důsledku nedostatku železa</i>	102
6.2.2	<i>Proteiny se sníženou produkcí v důsledku strádání železem</i>	105
6.3	PROTEOMICKÁ ANALÝZA ODPOVĚDI BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> NA RůZNÉ TEPLoty KULTIVACE .	105
6.3.1	<i>Proteomická analýza odpovědi bakterie F. tularensis na teplotu kulivace 25 °C</i>	106
6.3.2	<i>Proteomická analýza odpovědi bakterie F. tularensis na teplotu kulivace 42 °C</i>	107
6.4	PROTEOMICKÁ ANALÝZA BAKTERIE <i>F. TULARENSIS</i> VE STACIONÁRNÍ FÁZI RůSTU.....	108
7	SOUHRNNÝ ZÁVĚR	110
8	PŘÍLOHY	112
9	LITERATURA	136

POUŽITÉ ZKRATKY

2D-PAGE	Dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza (Two Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
CAF	Chemicky zprostředkovaná fragmentace (Chemically Assisted Fragmentation)
CFU	Kolonii tvořící jednotka (Colony Forming Unit)
CHAPS	3-[(3-cholamidpropyl)dimethylamonium]-1-propansulfonová kyselina
CID	Kolizí indukovaná disociace (Collision Induced Dissociation)
COG	Skupiny orthologních proteinů (Clusters of Orthologous Groups)
CSP	Proteiny chladového šoku (Cold Shock Proteins)
DDA	Analýza řízená výsledky (Data Directed Acquisition)
DMEM	Dulbeccoovo 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)
IEF	Izoelektrická fokusace (Isoelectric Focusing)
IPG	Ukotvený pH gradient (Immobilized pH Gradient)
I_(RN)	Relativní normalizovaná intenzita
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)
MMTS	Methylmethanthiosulfonát
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
MSMS	Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
MudPIT	Vícerozměrná technologie pro identifikaci proteinů (Multidimensional Protein Identification Technology)
<i>m/z</i>	Poměr molekulové hmotnosti k náboji
MW	Molekulová hmotnost (Molecular Weight)

O.D.	Optická denzita (Optical Density)
PBS	Fosfáty pufrovaný fyziologický roztok (Phosphate Buffered Saline)
pI	Izoelektrický bod (Isoelectric point)
PMF	Peptidový otisk palce (Peptide Mass Fingerprinting)
PSD	Rozpad za iontovým zdrojem (Post Source Decay)
QTOF	Spojení kvadrupólu a analyzátoru doby letu (Quadrupole-Time of Flight)
RP	Chromatografie na reverzní fázi (Reversed Phase Chromatography)
SCX	Silně kationt-výměnná chromatografie (Strong Cationt Exchange Chromatography)
SDS	Dodecylsulfát sodný (Sodium Dodecyl Sulphate)
SSP	Číslo skvrny (Sample Spot Number)
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfín hydrochlorid

1 ÚVOD

Studium patogeneze bakteriálních infekcí v současné době patří mezi oblasti biomedicínského výzkumu, kterým je věnována značná pozornost. Tento stav je zapříčiněn zejména 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. Urychlení výzkumu patogeneze infekčních onemocnění spolu s vývojem účinnějších vakcín a pokrokem v oblasti rychlých detekčních a typizačních technologií jsou logickou odpovědí států západního světa na události z 11. září 2001.

Poznatky o molekulární patogenezi infekčních chorob mohou vést k objevu nových farmakologických cílů nebo ke konstrukci účinnějších a bezpečnějších vakcín pro aktivní či pasivní imunizaci. Významným zdrojem informací o molekulární patogenezi bakteriálních infekcí je mimo jiné studium reakcí mikroba na prostředí, se kterým se setkává v průběhu interakce s hostitelským organizmem. Evoluce této interakce se z pohledu hostitelských organizmů nesla ve znamení neustálého zdokonalování strategií, jak se účinně bránit vzniku bakteriální infekce, nebo strategií, které vedou k eliminaci infekce. Na straně mikroorganismů mezitím docházelo ke zdokonalování nástrojů, jak zmiňované mechanismy přežít či obejít. Studium reakcí patogenních mikroorganismů na stresové faktory, jenž tvoří podstatu zmiňovaných strategií hostitele, v mnoha případech napomáhá identifikovat konkrétní molekulární nástroje, které jsou pro patogenezi infekce stěžejní.

Nástup proteomických technologií poskytl ideální nástroj pro sledování změn v expresi na proteinové úrovni. Jejich postupné zdokonalování a vývoj v dnešní době umožňuje provádět kvalitativní a kvantitativní analýzu až několika tisíců proteinů v jednom plně automatizovaném experimentu.

Cílem předložené dizertační práce bylo pomocí proteomických technologií zmapovat reakce bakterie *Francisella tularensis* na různé stresové faktory včetně intracelulárního pobytu v buňkách myší monocyto-makrofágové linie, a alespoň částečně tak přispět k výzkumu molekulárních nástrojů stojících za adaptací na hostitelské prostředí, potažmo virulencí *F. tularensis*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Bakterie *Francisella tularensis*

2.1.1 Obecná charakteristika

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]. Pro jeho kultivaci se používají agarové půdy obohacené o cystein a hemoglobin nebo tekutá půda dle Mueller-Hintona a chemicky definované tekuté médium dle Chamberlaina [2]. Původní klasifikace rozlišovala dva dominantní typy. **Typ A** představuje nejvíce virulentní kmen. Bez léčby onemocnění vyvolaná tímto typem 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 mimo jiné ústí v rozdíly ve virulenci [3]. Jednotlivé subtypy lze od sebe jednoznačně odlišit pomocí některých genomických a proteomických metod [4-7].

F. tularensis je **vysoce infekční pro člověka** a celou řadu jiných obratlovců. Bakterie byla izolována z více jak 250 druhů živočichů, převážně savců a členovců [3]. Nedávno byla její přítomnost prokázána rovněž u vodních améb [8]. U člověka je onemocnění často způsobeno přenosem patogena z infikovaného klíštěte nebo jiného krev sajícího vektora [9, 10]. Inokulace nebo inhalace dávkou obsahující 10 CFU nejvíce virulentní *F. tularensis* subtyp *tularensis* vede u neléčených jedinců až k 30% mortalitě [11, 12]. V České republice není výskyt tularémie příliš častý. Podle údajů Národního referenčního centra pro analýzu epidemiologických dat během let 1994-2003 incidence onemocnění na našem území kolísala mezi 30 až 225 případy ročně. Původcem onemocnění na území České republiky je méně virulentní subtyp *holarctica*. Z těchto důvodů u nás onemocnění nepředstavuje závažnější klinický problém.

Dnes je na tularémii pohlíženo především z hlediska bezpečnostního. 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 [13]. V porovnání s jinými lidskými patogeny zůstával až do

nedávné doby původce tularémie mimo intenzivní vědecký zájem. Vědecký zájem o tularémii vzbudil především vznik reálné hrozby bioteroristických útoků. Proto je velké úsilí soustředěno také na výzkum rychlých diagnostických a typizačních metod [14] a vývoj bezpečné a účinné vakcíny, která stále není dostupná [15, 16]. Zcela přelomovou událost ve výzkumu virulence *F. tularensis* určitě představuje zveřejnění kompletní genomové sekvence *F. tularensis* subtyp *tularensis* [17]. Avšak ani znalost genomu zatím nevedla k úplnému objasnění vysoké virulence tohoto organismu. Dalším velmi významným mezníkem je nalezení metody pro konstrukci cílených delečních mutantů [18].

2.1.2 Onemocnění tularémie

Po inkubační době, která je v průměru 3–6 dnů [19], náhle přicházejí nespecifické příznaky jako vysoká teplota, zimnice, únava, bolest hlavy a nauzea [20, 21]. Vedle nespecifických příznaků 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 [1].

2.1.2.1 Klinické formy tularémie

Dle místa vniku bakterie *F. tularensis* do lidského organismu dochází s různou závažností k rozdílným klinickým manifestacím. Tularémie se může manifestovat ve formě ulceroglandulární, glandulární, okuloglandulární, orofaryngeální, gastrointestinální, respirační a tyfoidní [1, 13, 22]. Nejčastější podobou onemocnění je **ulceroglandulární forma**. Pokud se manifestuje pouze lymfadenitidou bez ulcerace, jedná se o **formu glandulární**. Tato forma vzniká nejčastěji přenosem z krve sajícího vektora [9, 10]. Ke vzniku **okuloglandulární formy** dochází po kontaktu oka s kontaminovaným vzduchem nebo objekty, nejčastěji prsty. Mezi charakteristické symptomy patří konjunktivitida a lymfadenitida. **Orofaryngeální forma** je důsledkem požití kontaminované vody nebo potravy, kdy ke kolonizaci dojde ve vrchních oddílech

trávicí trubice. Charakteristická pro ni je ulcerace v ústech. Při **gastrointestinální formě** vzniká v závislosti na infekční dávce mírný perzistující průjem až akutní smrtelné onemocnění v důsledku ulcerace střevní stěny. **Respiratorní forma** je důsledkem inhalace aerosolizované bakterie *F. tularensis*. Tato forma, není-li léčena, je charakterizovaná vysokou mortalitou. Uvádí se, že inhalace již 10 CFU může vyvolat smrt organismu [12]. Symptomaticky se projevuje jako pneumonie s dyspnoe, častý je dráždivý kašel a bolest na hrudi. Sekundární tularémická pneumonie je spíše vyvolána hematogenním rozsevem mikroorganismu [23]. U **tyfoidní formy** převládají systémové příznaky a je těžké určit cestu vniku bakterie do organismu. Průběh této formy je prudký, bez včasné léčby dochází k septickému šoku.

2.1.2.2 Terapie

Kmeny *F. tularensis* vykazují *in vitro* velmi vysokou citlivost k **fluorochinolonům**, dále jsou citlivé k **chloramfenikolu**, **aminoglykosidům** a **tetracyklinům** [24-29]. Citlivost k těmto antimikrobiálním látkám byla prokázána také *in vitro* u bakterií intracelulárně lokalizovaných v buňkách myši monocytomakrofágové linie, což lépe napodobuje podmínky reálné infekce [30]. Kmeny *F. tularensis* jsou v drtivé většině případů rezistentní ke všem čtyřem skupinám beta-laktamových antibiotik a makrolidům [25, 28-30]. Nedávná studie prokázala význam genů *tolC* a *ftlC* u *F. tularensis* pro citlivost k různým antibiotikům a dezinfekčním prostředkům. Produkty těchto genů jsou homologní s proteinem TolC u *E. coli*, který je součástí sekrečního systému typu I a efluxní pumpy [31].

Lékem volby u tularémie člověka nadále zůstává aminoglykosidové antibiotikum **streptomycin** [13]. Léčba ciprofloxacinem vede k pětkrát nižšímu selhání terapie a nižšímu výskytu vedlejších účinků v porovnání s terapií streptomycinem [20]. Fluorochinolony jsou však zatím vnímány jako rezervní terapeutika indikována při selhání standardní terapie, při remisích a u komplikovaných případů.

2.1.2.3 Vakcinace

Přímým předchůdcem živého vakcinačního kmene LVS je kmen 155, který byl

odvozen v padesátých letech minulého století v bývalém Sovětském svazu opakovaným pasážováním plně virulentního subtypu *holarctica*. Kmen byl následně získán Spojenými státy americkými, kde během pasážování došlo k oddělení šedě a modře zbarvených kolonií. Z lyofilizovaných modrých kolonií byl po pěti pasážích odvozen **živý vakcinační kmen LVS**, který byl produkován jako živá vakcína [22]. Genetický základ oslabení kmene LVS není doposud přesně znám, u myši se chová jako avirulentní pouze při intradermálním podání [32] a jeho aplikace nevyvolá protekci u všech vakcinovaných jedinců [12]. Z těchto důvodů LVS vakcína nikdy nezískala povolení potřebná pro užívání v široké klinické praxi [15, 16]. LVS vakcína se dnes výjimečně používá pro aktivní imunizaci vysoce rizikových skupin. Jelikož si kmen LVS zachoval virulenci pro hlodavce, standardně se používá ve zvířecích modelech tularemické infekce.

Stěžejní úlohu v obranné reakci hostitele proti *F. tularensis* hraje, podobně jako u jiných intracelulárních patogenů, **buněčná imunita** [33]. Bylo však dokázáno, že **protilátková imunitní** odpověď postačuje k zamezení rozvoje infekce u některých intracelulárních patogenů [34, 35]. Z těchto poznatků pramení logické úsilí nalézt antigeny, které by člověka mohly před tularémií efektivně chránit. Proteomická analýza proteinů *F. tularensis* reaktivních s myšími a lidskými séry odhalila desítky potenciálně protektivních antigenů [36, 37]. Podobně koncipovaná studie odhalila protilátky, které jsou spojené s účinnou vakcinací u myši [38]. Mezi ideální protektivní antigeny patří proteiny, ke kterým by měl v případě infekce imunitní systém hostitele okamžitý přístup. Z tohoto důvodu se analýza imunogenních vlastností soustřeďuje na secernované [39] a povrchové proteiny [40].

Jiným způsobem vakcinace, který nespolehá jen na humorální složku imunity, je použití **definovaných oslabených živých kmenů**. U subtypu *novicida* bylo transpozonovou mutací získáno pět různých definovaných kmenů, které vykazovaly omezený intracelulární růst v myších makrofázích a zároveň účinně chránily před infekcí vysokou dávkou divokého kmene [41]. U stejného subtypu vedla nazální aplikace mutantního kmene $\Delta igIC$ k úspěšné imunogenizaci myši [42]. Na myším modelu infekce kmenem LVS byl úspěšně otestován mutantní kmen pro *purMCD* citelně oslabený ve virulenci, ale schopný účinně chránit proti opakované infekci [43]. Pro konstrukci živého oslabeného vakcinačního kmene byl použit i nejvíce virulentní

subtyp *tularensis*. Studium spontánního oslabeného kmene vyústilo v konstrukci definovaného kmene defektního v syntéze 58 kDa proteinu, který vykazoval protekci proti vysoce virulentnímu kmenu SCHU S4 [44].

2.1.3 Molekulární mechanizmy virulence u *F. tularensis*

Jednou z nich, se kterou se patogenní bakterie během svého života setkávají, je vnitřní prostředí hostitele. Bakterie s vysokým virulentním potenciálem jako *F. tularensis* musí disponovat sofistikovanými molekulárními nástroji tzv. **faktory virulence**, které jí umožní přežít nebo obejít obranné mechanizmy hostitele a také v tomto prostředí následně proliferovat. Je známo, že pro virulenci *F. tularensis* je stěžejní její **schopnost vnitrobuněčné proliferace v profesionálních fagocytech**. Z 1804 genů obsažených v genomu *F. tularensis* [17] jich bylo již popsáno několik jako nezbytných pro intracelulární proliferaci. Během vnitrobuněčného růstu *F. tularensis* LVS v myši monocyto-makrofágové linii pozoroval Golovliov zvýšenou produkci 23 kDa proteinu, který byl později pojmenován IglC. Indukce syntézy IglC proteinu byla dále pozorována po expozici bakterie peroxidem vodíku, naproti tomu nedocházelo k nárůstu produkce při zvýšení teploty na 42 °C [45]. Protein nevykazuje homologii s žádným doposud známým proteinem a molekulární podstata jeho působení je stále neznámá. Experimenty s kmenem defektním v expresi IglC proteinu potvrdily, že je nezbytný pro proliferaci patogena uvnitř makrofágů [18, 46]. Defekt v intracelulární proliferaci vykazoval dále subtyp *F. novicida* se spontánní mutací v oblasti *mglAB* operonu [47]. MglA a MglB proteiny vykazují podobnost k SspA a SspB proteinům *E. coli*, což jsou regulátory transkripce v průběhu nutričního stresu. Pozdější studie pak odhalila, že MglA protein je pozitivním regulačním faktorem pro expresi genů operonu *iglABCD* a dále genů *pdpA* a *pdpD* [48]. Následné analýzy u subtypu *F. novicida* vedly k objevu **ostrovu patogenity FPI** v rozsahu přibližně 30 kBp, ve kterém se nachází oba již zmiňované operony *igl* a *pdp*. Jak v genomu kmene LVS tak v genomu subtypu *tularensis* se FPI nachází ve dvou kopiích. Také *pdpA* a *pdpD* se ukázaly pro intracelulární proliferaci zcela nezbytné [49]. Nedávná studie odhalila přes sto genů kontrolovaných MglA. Do skupiny pozitivně regulovaných genů byly mimo jiné zařazeny všechny geny, které se nacházejí v FPI. Pomocí konstrukce delečních mutantů bylo mezi MglA regulovanými geny nalezeno pět faktorů virulence: *pdpB*, *cds2*, *oppB*,

FTT0989, FTT1209 [50]. Pro nalezení dalších genů nezbytných pro intracelulární proliferaci realizovaly dvě výzkumné skupiny rozsáhlou studii pomocí transpozonové mutagenese. U kmenů neschopných proliferovat v buňkách myši monocyto-makrofágové linie byly identifikovány mutace v genech pro alanin racemázu, glutamin fosforibozylpyrofosfát amidotranspeptidázu a ClpB protein [46]. Stejnou metodou bylo na SCHU S4 kmenu subtypu *tularensis* připraveno přibližně 2000 mutantů, u kterých byla testována schopnost invaze a proliferace v buňkách jaterní linie HepG2 a buňkách myši monocyto-makrofágové linie J774. Tímto způsobem bylo nalezeno celkem 18 genů, které se zdají být pro intracelulární proliferaci *F. tularensis* nezbytné. Osm z těchto mutantů představují autotrofní kmeny. Nejčastěji k mutagenesi došlo v genech biosyntetické cesty nukleotidů, transportérů a proteinů, které se účastní modifikací proteinů, a genů kódujících hypotetické proteiny [51]. Analýza spontánního mutantního kmene FSC043 odvozeného od vysoce virulentního subtypu *tularensis* nedávno odhalila spojitost mezi delecí genu pro 58 kDa hypotetický protein a nižší schopností intracelulární proliferace. Nově připravený kmen s definovanou mutací tohoto genu navíc u myši vykazuje protektivní vlastnosti proti plně virulentnímu subtypu *tularensis* [44]. U subtypu *novicida* byl potvrzen vliv fosfatázy AcpA na virulenci. AcpA patří mezi proteiny schopné tlumit respirační vzplanutí a dále vykazuje aktivitu fosfolipázy C. U delečního mutantního kmene byla zjištěna nižší fosfatázová a lipázová aktivita, vyšší citlivost k intracelulárnímu usmrcení a byl pozorován výrazně zpožděný únik z fagozómu [52].

Genomová analýza subtypu *tularensis* odhalila přítomnost dalších genů potenciálně významných pro virulenci mikroba např. pilinů typu IV, sekrečního systému typu II, povrchového polysacharidu, dále lze předpokládat tvorbu poly-D-glutamátového obalu [17]. Nedávná práce ukázala význam pilinu typu IV pro sekreci a virulenci subtypu *novicida* [53]. Práce odhalila sedm sekretovaných proteinů a příslušný sekreční systém založený na pilinu typu IV. Expresí dvou z nich se ukázala být pod regulací MglA. Infekce myši mutantním kmenem pro sekreční systém založený na pilinu typu IV nebo mutantním kmenem pro jeden ze sekretovaných proteinů ukázala pozitivní změnu ve virulenci. Na myším modelu infekce kmenem LVS byla prokázána role ve virulenci genu *tolC*, který je u *E. coli* součástí sekrečního systému typu I a efluxní pumpy. Tyto nálezy naznačují přítomnost funkčního sekrečního systému

typu I [31]. Velký význam v interakci patogena s hostitelem má schopnost bakterie adherovat na eukaryotní buňky. Porovnáním schopnosti adheze kmene LVS a subtypu *novicida* byl zjištěn význam FsaP proteinu [54]. Po adhezi je bakterie fagocytována. Jednou z možností jak přežít tento způsob eliminace je ochrana proti účinkům reaktivních forem kyslíku. Mutantní kmen LVS defektní v produkci superoxidodismutázy byl k oxidačním činidlům velmi citlivý a na myším modelu infekce byla zjištěna jeho nižší virulence [55].

Komparativní genomové a proteomové analýzy subtypů, které se liší ve virulenci pro člověka, odkryly množinu genů a proteinů, které jsou unikátní pro vysoce virulentní subtyp *tularensis* [5-7]. Většina z těchto potenciálních faktorů virulence se však pravděpodobně zapojuje do jiných dějů než je intracelulární proliferace.

2.1.4 Interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami

F. tularensis je schopna infikovat a proliferovat uvnitř široké řady fagocytujících i nefagocytujících buněk jako například buněk monocyto-makrofágové linie, hepatocytů a epiteliálních buněk. V *in vitro* studiích byl nedávno pozorován unikátní, na mikrofilamentech závislý způsob **vstupu mikroba** do makrofágů. Je charakteristický tvorbou asymetrických klikatých panožek, které mikroba následně zcela obklopí. Tento způsob se strukturálně nepochodá žádnému doposud známému typu. Pro vstup bakterie do makrofágů se zdá být kritická opsonizace faktorem komplementu C3 a jeho receptor C3R [56, 57]. Další možné cesty vstupu do makrofágů jsou založeny na Fc γ receptoru, manóзовém receptoru a lektinovém surfaktantovém proteinu A bronchoalveolárního kompartmentu [57]. Význam komplementu C3 a receptorů C3R a C4R byl prokázán i u vstupu *F. tularensis* do dendritických buněk [58]. U neopsonizovaných bakterií se na vstupu do makrofágů v největší míře podílí manóзовý receptor [59]. Tento receptor je bohatě zastoupen v membráně primárních makrofágů, není však přítomen na krevních monocyttech a na buňkách myši monocyto-makrofágové linie J774. Těmto nálezům pak odpovídá pětikrát vyšší počet fagocytovaných bakterií v makrofázích odvozených od monocytů v porovnání s monocyty a buňkami linie J774.

Doposud byly popsány tři strategie, kterými se patogenní bakterie brání vnitrobuněčné **eliminaci následující po fagocytóze** [60]. *Coxiella burnetii* je příklad bakterie, která je schopna přežít drsné podmínky panující ve fagolysozomu. Zástupci

rodu *Shigella* unikají do cytoplazmy dříve, než dojde k vyvržení fagozomu na fagolysosom. Poslední skupinu tvoří patogeny, které jsou schopny ovlivnit maturaci fagozomu do té míry, že v něm panují podmínky příznivé pro jejich existenci. Takto se chová např. *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* a *Brucella melitensis*. Fagozom obsahující *F. tularensis* označovaný FCP (*F. tularensis* containing phagosome) dozrává do stádia raného endozomu a získává časný endozomální antigen EEA1 [61]. Přibližně za 4 hodiny po infekci získává fagozom pozdní endozomální markery Lamp1 a Lamp2 [61, 62]. *F. tularensis* je pravděpodobně schopná modifikovat vyvržení fagozomu, protože nedochází ke kolokalizaci s kathepsinem D a nedochází k významné acidifikaci kompartmentu [61]. Už za 2 až 4 hodiny po infekci se membrána fagozomu začíná rozpadat a *F. tularensis* uniká do cytoplazmy [61-63]. Mezi 6. a 12. hodinou po infekci se pak mikrob začíná uvnitř buněk množit. Stejná pozorování byla sledována u lidských makrofágů při použití kmene LVS i subtypu *tularensis* [61], z čehož vyplývá, že oslabení LVS kmene nemá význam pro časné fáze infekce. Co se tedy odehrává na pozadí těchto dějů, zůstává nadále nejasné. Je ale zřejmé, že schopnost úniku je závislá na expresi *mgIA* a *igIC* genů [64, 65] a pozitivně ji také ovlivňuje kyselá fosfatáza AcpA [52]. Počet bakterií, které unikly do cytoplazmy a u kterých maturace FCP pokračuje fúzí s lysozomy, je výrazně nižší u makrofágů aktivovaných IFN- γ [62, 66]. Jako hlavní prostředek IFN- γ aktivovaných makrofágů, který vede k eliminaci fagocytovaného mikroba, byl identifikován peroxydusitan produkovaný enzymem iNOS [66].

Mnoho intracelulárních bakteriálních patogenů spouští u infikovaných hostitelských buněk **apoptickou buněčnou smrt**, anebo naopak blokuje kontrolovanou apoptózu, která má zamezit další proliferaci patogena [67-69]. Také *F. tularensis* výrazným způsobem zasahuje do vnitrobuněčné a mezibuněčné signalizace. Už po 10 až 18 hodinách dochází u infikovaných buněk monocyto-makrofágové linie k indukci apoptózy [70] za účasti vnitřní, mitochondriální cesty [71]. Dále bylo prokázáno, že indukce apoptózy je závislá na aktivaci cesty p42/p44 MAPK (Erk 1/2) [72] a infekce narušuje signalizaci vedoucí přes p38 MAPK [73]. Ze strany patogena je indukce apoptózy závislá na expresi *igIC* genu [74]. Po 30 hodinách buněčná smrt infikovaných buněk začíná vykazovat znaky nekrózy [72]. U infikovaných buněk dochází k aktivaci NF- κ B a degradaci jeho inhibitoru I- κ B. V důsledku toho buňky nesekretují

prozánětlivé cytokiny TNF- α a IL-1 β , a to ani po přidání agonistů Toll-like receptorů [73]. 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. Druhá fáze nebyla pozorována u buněk infikovaných mutantním kmenem *ΔiglC* [75].

2.2 Modulace genové exprese prostředím

Patogenní bakterie se během infekčního cyklu setkávají s velmi odlišnými životními podmínkami. Nejčastějšími proměnnými jsou teplota, přítomnost živin, dostupnost kyslíku, pH a osmolarita prostředí. Některé podmínky prostředí jsou pro růst bakterie nevýznamné, jiné však mohou být likvidační. 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**, jenž přímo disponují sensorovými vlastnosti. Patří mezi ně proteiny OxyR, SodS, Fur apod. Složitější nástroje jsou pak zastoupeny **dvoukomponentovými regulačními systémy** spolu s jejich komplexnější variantou **fosforelé** [76, 77] a dále „**quorum sensing**“ **systémem** [78]. Mechanizmy transkripce a translace, ale i rychlost degradace mRNA u bakterií jsou nastaveny tak, aby změna ve fenotypu v reakci na stresový podnět proběhla co nejrychleji. U bakterií se tak setkáváme s polycistronickými geny a velmi krátkou životností mRNA.

Snad nejvýraznější změnu ve fenotypu musí patogenní bakterie prodělat během interakce s hostitelským organizmem. Molekuly, jenž jsou klíčové pro přežití a proliferaci uvnitř hostitele, představují faktory virulence. Jejich produkce je spouštěna rovněž jako reakce na působení určitých specifických podmínek [79]. Zdokumentováno je ovlivnění exprese genů kódujících faktory virulence teplotou [80], dostupností zdroje železa [81, 82] a osmolaritou [83].

Ačkoliv je **prostředí hostitele** velmi komplexní, lze jej rozložit na jednotlivé signály, které jsou patogenní bakterie schopné citlivě vnímat. Kombinace signálů patogenním bakteriím sděluje, zda se nacházejí ve vnějším prostředí nebo uvnitř hostitele, o jaký druh hostitele se jedná, a rovněž určují přesnou lokalizaci v hostiteli [84]. Patogenní bakterie neprodukují všechny své faktory virulence

simultánně nebo se stejnou intenzitou. U rodu *Salmonella* jsou jednotlivé sady faktorů virulence exprimovány až po působení specifických spouštěcích signálů, jejichž dostupnost se během infekčního procesu mění [85, 86]. Lze velmi přesně popsat změny genové exprese v závislosti na průchodu trávicí trubici [87]. Patrně nejdůležitější podmínky, které musí intracelulární parazité přežít, představují buněčné nástroje určené k jejich eliminaci. Úspěšní intracelulární parazité vyvinuli cesty, jak se působení těchto degradačních mechanismů v makrofázích vyhnout nebo je přežít [60].

2.2.1 Odpověď bakterií na prostředí hostitele

Do dnešní doby již byly provedeny desítky komplexních analýz genové exprese patogena během infekce *in vivo* nebo na *in vitro* modelu [88, 89]. Mnohem složitější je však provádět analýzy genové exprese na úrovni proteinů. Jednou z cest je použití *in vitro* modelu, kdy dochází k zastavení proteosyntézy eukaryotických buněk a selektivnímu metabolickému značení nově syntetizovaných bakteriálních proteinů. Tento přístup byl použit pro analýzu změn fenotypu po interakci s hostitelskými buňkami například u bakterií *Legionella pneumophila* [90], *Chlamydia pneumoniae* [91], *Listeria monocytogenes* [92] a *Salmonella typhimurium* [93]. Podobný experiment s *F. tularensis* LVS umožnil identifikovat velmi významný faktor virulence, IglC protein [45]. Nedávno byla publikována proteomická analýza odpovědi *F. tularensis* subtypu *tularensis* na intracelulární pobyt v buňkách sleziny infikovaných myší, která potvrdila zvýšenou produkci IglC proteinu během interakce s hostitelskými buňkami [94].

Více zjednodušené modely sledují účinek jednoho stresového faktoru, jenž se pravděpodobně během interakce hostitel-patogen uplatňuje. Izolované stresové podmínky mohou však jen těžko nahradit komplexní stres, který pro bakteriální patogeny představuje prostředí hostitele, ať už extra- nebo intracelulární.

2.2.2 Odpověď bakterií na oxidativní stres

K oxidativnímu poškození buňky dochází, když vznikne nepoměr v redoxní rovnováze ve prospěch látek působících jako oxidační činidla. Mezi oxidační činidla produkované živými organismy patří peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (HO^\cdot) a superoxidový aniont ($O_2^{\cdot-}$). Hlavním zdrojem těchto látek u aerobně žijících

organismů, včetně bakterií, jsou procesy spojené s dýchacím řetězcem [95, 96]. Patogenní bakterie mohou přijít do styku s exogenními reaktivními kyslíkatými radikály a rovněž s reaktivními dusíkatými látkami v průběhu infekce hostitele. Jejich produkce je jedním ze stěžejních pilířů přirozené imunity organismů zaměřené na boj proti patogenním mikroorganismům [97].

V místě infekce bakterií *F. tularensis* dochází ke vzniku zánětlivé odpovědi, která zahrnuje vcestování fagocytujících buněk a lymfocytů [98], které jsou schopny u makrofágů aktivovat mechanismy eliminace patogenů závislé na kyslíku. Vystavení takovým podmínkám pak u bakterie může vyvolat expresi genů stěžejních v ochraně proti účinkům mikrobicidních mechanismů včetně produkce kyslíkatých radikálů.

Regulovaná adaptivní odpověď na oxidativní stres je nejlépe charakterizována u *E. coli* [99]. Úlohu klíčových regulátorů této odpovědi u *E. coli* a mnoha dalších bakterií hrají OxyR a SoxRS systémy. Aktivace exprese genů *oxyR* regulonu začíná oxidací cysteinů na transkripčním faktoru OxyR za vzniku intramolekulárních disulfidických můstků [100]. Aktivace *soxRS* regulonu se odehrává ve dvou stupních. Nejprve dojde k oxidaci $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ center SoxR na $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$. Aktivní forma SoxR zvyšuje expresi transkripčního faktoru SoxS, což následně vyústí v aktivaci *soxRS* regulonu [101].

Většina proteinů, jejichž produkce je aktivována transkripčními faktory OxyR nebo SoxRS, působí přímo antioxidantně nebo se účastní ochrany proti oxidačnímu poškození. Patří mezi ně mimo jiné hydroperoxidáza I, alkylhydroperoxidreduktáza, glutathionreduktáza, thioredoxin 2, manganová superoxidodismutáza [99]. OxyR vedle toho indukuje expresi *dps*, který kóduje nespecifický DNA vázající protein. Jeho funkce spočívá v ochraně DNA proti poškození a mutacím [102]. OxyR/SoxRS zprostředkovaná aktivace genu *fur*, který kóduje globální represor pro příjem železa, zabraňuje poškození buňky hydroxylovým radikálem HO[•] [103]. Do regulonu *soxRS* dále patří DNA opravný enzym endonukleáza IV a gen pro glukóza-6-fosfátdehydrogenázu, která zvyšuje celkovou redukční sílu buňky. Aktivace SoxRS ústí také v indukci izoenzymů fumarázy (*fumC*) a akonitázy (*acnA*), jenž jsou rezistentní k působení superoxidového aniontu [104, 105].

2.2.3 Odpověď bakterií na nedostatek železa

Železo je esenciálním prvkem jak pro prokaryotické tak eukaryotické organizmy. U prokaryotických organismů jsou známy pouze dva druhy bakterií, které pravděpodobně ke svému životu železo nepotřebují: *Borrelia burgdorferi* [106] a *Lactobacillus* sp. [107]. Jako kofaktor nebo prostetická skupina se železo účastní nejružnějších biologických pochodů v živých organizmech.

Železo se v životním prostředí vyskytuje převážně v oxidovaném stavu jako železité sloučeniny, které jsou za neutrálního pH těžce rozpustné. Volné železo, tedy nevázané v komplexech, katalyzuje cestou Fentonovy reakce vznik velmi toxických reaktivních oxidativních radikálů. Kvůli těmto vlastnostem organizmy během evoluce vyvinuly sofistikované nástroje jak zabezpečit příjem železa pokrývající fyziologické potřeby a současně jej bezpečně skladovat, aby byla jeho toxicita minimální [108, 109]. Železo je významnou součástí interakce hostitel-patogen. K železu vysoce afinitní proteiny 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 [82]. Výše zmiňovaná Fentonova reakce je makroorganizmem cíleně využívána jako mikrobicidní prostředek fagocytujících buněk. Na tyto antimikrobiální nástroje může být pohlíženo jako na 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 [108]. Nízká koncentrace železa v prostředí je pro mnohé patogenní bakterie signálem, který spouští produkci faktorů virulence [81].

Bakterie obecně regulují metabolismus železa v závislosti na jeho dostupnosti. U všech gram-negativních bakterií má v této regulaci zásadní význam transkripční faktor Fur. Fur je pozitivní represor využívající železnaté ionty jako svůj korepresor. Dereprese transkripce regulovaných genů pak nastane při nedostatku železa [108]. 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 [110]. U mnoha patogenních bakterií včetně patogenních kmenů *E. coli* patří do Fur operonu některé známé faktory virulence [81, 110].

Ačkoliv v genomu *F. tularensis* bylo predikováno několik genů zapojených do

metabolizmu železa, včetně genu pro Fur, přesný mechanismus jeho příjmu není doposud znám. Nedávná studie však odhalila produkci sideroforů u *F. tularensis* kultivované v prostředí bez železa [111]. Významným krokem byla také identifikace genů, jejichž exprese byla v důsledku nedostatku železa v prostředí u *F. tularensis* LVS změněna [112].

2.2.4 Odpověď bakterií na změny teploty prostředí

Výkyvy teploty jsou pro živé organizmy nejčastějšími stresovými faktory vůbec. 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. Při působení chladu klesá fluidita membrán, což se projeví utlumením funkcí, které jsou s nimi spojeny. Určitou úlohu ve vnímání chladu dále hrají ribozomy a nukleové kyseliny. Mezi senzory vyšší teploty patří především intracelulárně, ale i extracelulárně lokalizované proteiny [113].

U modelové bakterie *E. coli* hraje ústřední roli v adaptační odpovědi na působení vyšší teploty transkripční faktor σ^{32} . Jedním z prvků v jeho regulaci představuje působení nepříznivých podmínek, pod jejichž vlivem se mění jeho nestabilní fyziologická konformace na velmi stabilní [114]. Dalším regulátorem transkripce, který se účastní odpovědi na účinek vyšší teploty, je faktor σ^E . Jím regulované geny zabezpečují udržování fyziologické konformace proteinů extracytoplazmatického prostoru, účastní se však i jiných procesů lokalizovaných na povrchu bakteriální buňky [115, 116]. 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 zabráňují poškození konformace proteinů a je-li poškozena, přispívají k její nápravě [117-119]. Mezi hlavní chaperonové systémy patří GroEL-GroES a DnaK-DnaJ-GrpE [120]. Bakteriální, ale i hostitelské molekulové chaperony hrají velmi důležitou úlohu v patogenezi infekčního onemocnění. Jsou výrazně indukované během interakce s hostitelskými buňkami na obou stranách.

Chaperony bakteriálního původu mají silný imunogenní potenciál a mohou být induktory skřížené reaktivity u autoimunitních onemocnění. Patří mezi tzv. s patogeny asociované molekulové vzory (PAMP) a některé z nich jsou známými faktory virulence bakteriálních agens. Jsou jedinou skupinou proteinů, které lze zařadit rovněž mezi receptory pro patogenní vzory (PPR) [121]. Další početnou skupinu představují **ATP-dependentní proteázy**, které degradují proteiny s poškozeným prostorovým uspořádáním, u nichž náprava konformace selhala [122].

Bakterie reagují na pokles teploty expresí **proteinů chladového šoku** označovaných jako CSP (Cold Shock Proteins). CSP se rozděluje podle míry indukce při snížení teploty prostředí do dvou tříd a mají rozdílné funkce [123]. Vystavení mikroorganismů nízkým teplotám postihuje především membrány, u kterých se sníží fluidita. Reakci *E. coli* a *Bacillus subtilis* na tuto změnu představuje zvýšení zastoupení mastných kyselin s nenasycenými uhlíkovými řetězci v membránách [124, 125]. Citlivými strukturami k teplotě jsou také ribozomy [126], které jsou za nízkých teplot pro obyčejné proteiny neaktivní. Během adaptační fáze jsou produkovány proteiny, které zajistí sestavení iniciačního komplexu translace za nízkých teplot: RNA helikáza CsdA, ribozom vázající faktor A a iniciační faktor 2. Jmenované tři proteiny jsou pro efektivní růst při nízkých teplotách nepostradatelné. Za nižších teplot dochází k nadměrnému stočení DNA a RNA molekul, což se projeví zpomalením transkripce, translace a replikace DNA. Z tohoto důvodu byly mezi CSP nalezeny DNA vázající protein H-NS [127] a podjednotka DNA gyrázy GyrA [128]. Funkce proteinu CspA a některých dalších členů rodiny Csp spočívá především v udržování fyziologické konformace mRNA. Tyto proteiny jsou označovány jako RNA chaperony [129, 130].

Expresí genů regulovaných teplotou u patogenních bakterií nemusí souviset jen s odpovědí na tepelný šok, ale může představovat komplexní adaptaci na kontakt s cílovým hostitelským organizmem. U rodu *Shigella* jsou pro morčata virulentní jen bakterie, které byly kultivovány při 37 °C, zatímco bakterie kultivované při 30 °C jsou avirulentní. Příčinou je inhibice produkce VirR při 37 °C, který je represorem induktorů transkripce faktorů virulence kódovaných operony *ipa*, *spa* a *mxi* [80, 131]. *Bordetella pertussis* reguluje expresi faktorů virulence téměř výhradně prostřednictvím dvoukomponentového regulačního systému BvgA-BvgB. Pro aktivaci tohoto systému je mimo jiné zcela nezbytná teplota 37 °C [77, 80]. Zástupci rodu *Yersinia* během

životním cyklu infikují blechy, které během sání patogena přenášejí na hlodavce, a sáním infikovaných hlodavců se cyklus opakuje. Teprve u teplokrevného organismu dochází k expresi faktorů virulence, které zahrnují součásti sekrečního systému typu III, cytotoxické efektorové proteiny, proteiny inhibující fagocytózu apod. [80, 132]. Podobná situace je u klíšťaty přenášené spirochety *Borrelia burgdorferi*, kde zvýšení teploty vyvolá produkci vnějších povrchových proteinů spoluodpovědných za virulenci [80, 133].

2.2.5 Odpověď bakterie na prodlouženou dobu kultivace

Během kultivace v laboratorních podmínkách lze u bakterií pozorovat několik rozdílných fází růstu (lag fáze, logaritmická nebo exponenciální fáze, stacionární fáze, fáze smrti a dlouhotrvající stacionární fáze), které jsou způsobeny rozdíly v koncentraci živin a odpadních látek v čase [134]. Tyto podmínky indukují změny v genové expresi, které u mnoha bakterií ústí ve funkční [135] nebo morfologické přizpůsobení [136]. Tyto změny představují cílený adaptační mechanismus, který mikroorganismům dovoluje uchovávat energii v prostředí bez živin. Působí-li nedostatek živin delší období, nastupuje dlouhotrvající stacionární fáze růstu, při které může docházet také ke změnám na úrovni genomu. Bakterie vyvinuly celou řadu mechanismů vedoucích k mutacím u neproliferujících buněk, na něž působí neletální selekční tlak např. nedostatek živin ve stacionární fázi [137]. Takto vzniká i fenotyp označovaný GASP (Growth Advantage in Stationary Phase). Bakterie s GASP fenotypem jsou schopny z kultury vytěsnit mladší buňky. U *E. coli* byly doposud nalezeny čtyři mutace odpovědné za GASP fenotyp. Ačkoliv jsou všechny mutované geny zapojeny do jiných procesů, mutace vždy ústí ve schopnost bakterie využívat aminokyseliny jako zdroj uhlíku a energie [138].

Rozhodujícím regulačním faktorem genové exprese v podmínkách nedostatku živin je alternativní faktor σ^S , který je regulátorem genů zapojených také u jiných stresových odpovědí [139]. U *E. coli* bylo identifikováno přibližně 100 genů, které patří do regulonu alternativního faktoru σ^S [140, 141]. Patří mezi ně například proteiny chránící proti oxidativnímu poškození (kataláza a superoxiddismutáza), dále proteiny DNA opravného aparátu (exonukleáza, methyltransferáza a nespecifický DNA vázající protein) a v neposlední řadě faktory virulence jako produkty genů *scgBA* u *E. coli*.

Většina reálných podmínek v přírodě nedovoluje bakteriím růst, a proto přežívají za podmínek hladovění. Studium fenotypu, který se vytváří za těchto podmínek, pomáhá k odhalení nástrojů pro přežití v reálném prostředí.

2.3 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, jenž umožňují analýzu exprese celého genomu nebo jeho rozsáhlé části [88]. Jedná se především o technologie „DNA microarrays“, v oblasti analýzy proteinů pak o dvojrozměrnou gelovou polyakrylamidovou elektroforézu (2D-PAGE) nebo modernější „shotgun“ proteomický přístup. Proteomika je logickou odpovědí na dokončení sekvenace genomů mnoha bakterií, modelových organismů a člověka. Genomické i proteomické technologie mají své přednosti i limitace [142-144], a tak mohou být jejich výstupy komplementární.

Termín **proteom** byl poprvé prezentován M. R. Wilkinsem v roce 1994 na konferenci v Sieně a později jím publikován [145]. 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 organismu sice lze vyvozovat také z analýzy mRNA, porovnání dat z analýzy transkriptomu a proteomu však ukázalo, že jejich kvantitativní korelace je velice slabá [146, 147]. Analýza mRNA navíc nemůže určit konečný funkční stav budoucí proteinové molekuly, přesnou lokalizaci v buňce a molekuly, s kterými bude 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**. Z obecného schématu vybočuje nejnovější proteomický přístup založený na proteinových čípech [148].

Nezastupitelné místo v proteomice mají identifikační metody využívající **hmotnostní spektrometrii**. Hmotnostní spektrometry jsou přístroje, které velice přesně určují molekulové hmotnosti látek. Každý hmotnostní spektrometr se skládá ze tří částí.

Zdroj iontů má za úkol převést analyt do plynného stavu a ionizovat jej. Úlohou **analyzátoru iontů** (analyzátor doby letu (TOF), kvadrupól, iontová past, lineární iontová past, Fourierova transformace cyklotronové rezonance iontů) je rozlišit od sebe molekuly s rozdílnými molekulovými hmotnostmi, které pak dopadají na **detektor**. Pro potřeby proteomiky došlo k vývoji přístrojů, které kombinují různé analyzátory s dvěma měkkými ionizačními technikami ESI a MALDI [149]. Při ionizaci MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) [150, 151] se analyt musí smísit se slabou aromatickou organickou kyselinou tzv. maticí. Matrice absorbuje energii velmi krátkých laserových impulsů, což způsobí její přechod do plynného stavu, při čemž s sebou strhává i molekuly analytu. V průběhu vypařování současně dochází k přenosu protonu z matrice na analyt. Při ionizaci ESI (Electrospray Ionization) [152] proudí analyt kapilárou ústící do hmotnostního spektrometru, na kterou se aplikuje vysoké napětí, jenž způsobuje kontinuální tvorbu nabitých mikroskopických kapiček. Kapičky pomocí proudu zmlžovacího plynu zmenšují svůj objem až zůstanou jednotlivé nabité molekuly analytu. Přínos hmotnostní spektrometrie pro analýzu labilních biomolekul, jakými proteiny jsou, byl v roce 2002 oceněn udělením Nobelovy ceny pro objevitele měkkých ionizačních technik MALDI a ESI.

2.3.1 Klasický proteomický přístup

Klasický proteomický přístup, který byl použit u poloviny prezentovaných analýz, kombinuje separaci pomocí 2D-PAGE a identifikaci vybraných proteinů hmotnostní spektrometrií.

2.3.1.1 Dvojměrná gelová elektroforéza (2D-PAGE)

2D-PAGE dovoluje separovat komplexní proteinové směsi podle **izoelektrických bodů** (pI) a **molekulových hmotností** (MW) jednotlivých proteinů. Kombinace dvou charakteristických vlastností proteinů umožňuje dosáhnout velmi vysokého rozlišení. Vlastní provedení zahrnuje několik na sebe navazujících kroků [153]. Aby došlo k uvolnění proteinů, musí být struktury biologického materiálu nejprve rozpuštěny použitím silného detergentu, chaotropní látky nebo jejich kombinací. Dále je nezbytné pomocí redukčního činidla přerušit disulfidické můstky

mezi cysteiny proteinů. Pro odstranění látek, které interferují s izoelektrickou fokusací (IEF) jako jsou anorganické soli, polysacharidy, lipidy, silné ionogenní detergenty apod., se využívá precipitace proteinů. Pokud je nutné odstranit pouze soli, lze využít dialýzu.

IEF rozdělující proteiny na základě jejich pI se dnes provádí již výhradně v gelu s ukotveným pH gradientem [154]. Gely různých formátů jsou komerčně dostupné ve formě IPG proužků (Immobilized pH Gradient). Toto provedení snížilo náročnost na manuální práci, výrazně zvýšilo reprodukovatelnost, rozlišení 2D-PAGE i nanášku proteinů [155], a proto postupně vytlačilo původní IEF proteinů prováděnou v gelu s přidavkem volných nosných amfolytů [156]. Pro rozdělení proteinů na základě jejich MW se používá elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS), která probíhá ve směru kolmém na směr IEF.

K **vizualizaci proteinů** rozdělených pomocí 2D-PAGE lze použít např. metabolické značení proteinů s následnou autoradiografií. Konvenční způsoby využívají afinitu organického barviva Coomassie Blue G-250 k proteinům [157] nebo barevnou reakci založenou na redukci stříbrných iontů na povrchu proteinů [158]. Stále více používanými se stávají barviva s fluorescenčními vlastnostmi jako Sypro Ruby [159]. Velmi výhodné je použití rozdílného fluorescenčního barvení DIGE (Differential Gel Electrophoresis), které je založeno na kovalentní modifikaci proteinů barvivy Cy2, Cy3 a Cy5. Po smísení mohou být různě značené vzorky analyzovány na jednom gelu díky rozdílným vlnovým délkám excitačních a emisních záření [160].

Digitalizované obarvené gely jsou následně podrobeny softwarové analýze. Na trhu je dostupných několik softwarů, např. Z3, PDQuest, Melanie a Progenesis, které dovolují kvalitativní, kvantitativní a jednoduchou statistickou analýzu obrazu [161, 162]. Výstupem softwarové analýzy obrazu je seznam proteinových skvrn, jejichž kvantita se statisticky významně liší mezi kontrolním vzorkem a vzorkem připraveným z ovlivněného biologického materiálu.

2.3.1.2 Hmotnostně spektrometrické identifikační techniky následující po 2D-PAGE

Identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE se rutinně provádí na

hmotnostních spektrometrech typu MALDI-TOF. **Identifikační metoda PMF** (Peptide Mass Fingerprinting) je založena na enzymovém štěpení proteinu trypsinem nebo jinou sekvenčně specifickou proteázou na proteolytické peptidy. V hmotnostním spektrometru se pak měří molekulové hmotnosti intaktních proteolytických peptidů v MS módu. MS spektrum představuje charakteristiku každého proteinu s podobnou specifikou jako je otisk palce pro každého člověka. Molekulové hmotnosti jsou pak v databázových programech porovnávány s teoreticky vypočtenými hodnotami proteolytických peptidů. Na základě shody experimentálních a teoretických hodnot lze ke spektru s určitou pravděpodobností přiřadit protein [163, 164]. Teoretické hodnoty uložené v databázích byly získány virtuálním překladem sekvence DNA do sekvence aminokyselin, z které byly následně vypočítány molekulové hmotnosti proteolytických peptidů. Z tohoto je zřejmé, že provádění identifikací proteinů u organismů s neznámým genomem, vyžaduje zcela odlišný přístup.

Z mnoha důvodů nelze vždy všechny proteiny pomocí PMF jednoznačně identifikovat. V těchto případech je nutné určit sekvenci aminokyselin v některém z proteolytických peptidů. K tomu se dnes rutinně používají tandemové hmotnostní spektrometry. Také hmotnostní spektrometry typu MALDI-TOF mají však jistou možnost poskytnout informace o sekvenci aminokyselin. Zvýšením intenzity laseru při ionizaci dochází k nadměrné excitaci molekulu peptidů, které se tím stávají nestabilními a mohou podléhat fragmentaci. K fragmentaci dochází za zdrojem, a proto je tento typ označován jako **Post Source Decay (PSD)** [165, 166]. Nevýhodou této metody je, že k fragmentaci dochází pouze u některých peptidů. Fragmentace peptidů nemusí být zdaleka kompletní a měřená spektra jsou často velmi komplikovaná. Tyto nevýhody dokáží překonat techniky, které na N-konec peptidů připojují silně kyselou funkční skupinu, jako technika chemicky zprostředkované fragmentace (CAF - Chemically Assisted Fragmentation), která je založena na modifikaci peptidů pomocí sukcinimidylesteru 3-sulfopropanové kyseliny [167]. CAF peptidy pak velmi ochotně podléhají fragmentaci a navíc negativně nabitý N-konec činí b-ionty celkově neutrální, nejsou proto detekovány a měřené fragmentační spektrum tvořené výhradně z iontů y-série (viz kapitola 2.3.2.2) je velmi snadno interpretovatelné [168, 169].

U části proteinů se z různých důvodů nepodaří naměřit žádné MALDI-TOF spektrum nebo je spektrum velmi nízké kvality. V těchto případech lze pro identifikaci

použit **tandemový hmotnostní spektrometr** [170], který umožňuje fragmentaci peptidů a zaznamenání MSMS spekter. MSMS spektra jsou použita k prohledávání proteinových databází. K jednoznačné identifikaci v tomto případě stačí shoda molekulových hmotnostní fragmentů s teoreticky vypočtenými hodnotami u jednoho proteolytického peptidu [171] (podrobněji viz kapitola 2.3.2.2).

2.3.2 „Shotgun“ proteomika

Tento přístup dostal název podle „shotgun“ sekvenování DNA, kdy je nejprve určena posloupnost bází v krátkých fragmentech DNA. Díky částečnému překryvu jednotlivých fragmentů je pak softwarově sestavena kompletní sekvence původní molekuly DNA.

Také u „shotgun“ proteomiky se sdružují separační a identifikační metody. Od předešlé skupiny se však odlišuje několika zásadními charakteristikami [172]. **K separaci dochází až na úrovni peptidů** tzn., že komplexní proteinová směs je nejprve štěpena sekvenčně specifickou proteázou. Vzniklé proteolytické peptidy jsou následně separovány, v naprosté většině pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Separační technika je on-line spojena s identifikační metodou využívající tandemový hmotnostní spektrometr. On-line režim se vyznačuje současně probíhající separací a identifikací peptidů, kdy v okamžiku eluce peptidu z kolony dochází k jeho analýze v hmotnostním spektrometru. 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 [173].

2.3.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se v proteomice v naprosté většině používá k separaci peptidů [174]. Separované peptidy jsou eluovány kapalnou fází, proto je při on-line zapojení s hmotnostním spektrometrem používáno výhradně ESI zdroje. Při off-line zapojení lze využít i kombinaci s přístrojem MALDI-TOF/TOF [175]. Nejpoužívanější se pro separaci peptidů stala **stacionární reverzní fáze C₁₈** (RP-HPLC). Samotná jednorozměrná RP-HPLC však nemá dostatečnou kapacitu pro

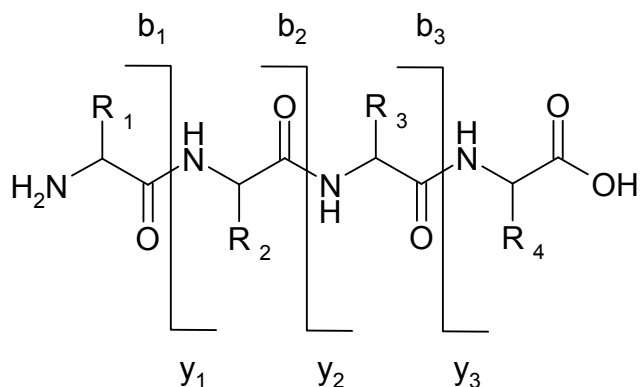
separaci směsi obsahující desítky tisíc různých peptidů. Proto byla vyvinuta **MudPIT technologie** (Multidimensional Protein Identification Technology), která před RP-HPLC on-line předřazuje kationt-výměnnou chromatografii (SCX) [176]. SCX chromatografie může být používána také v off-line režimu. Byly vyvinuty i jiné, ve většině případů off-line multidimenzionální separační postupy. IEF peptidů na komerčně dostupných přístrojích může nahradit SCX chromatografii v první dimenzi [177]. IEF na IPG proužku místo SCX chromatografie dokonce vedla k identifikaci většího počtu proteinů a navíc lze pro potvrzení identifikace využít teoretické hodnoty pI peptidů [178]. GeLC-MS/MS přístup kombinuje SDS-PAGE separaci proteinů, rozřezání gelu a následné štěpení trypsinem s RP-HPLC vzniklých peptidů [179].

2.3.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemový hmotnostní spektrometr si lze jednoduše představit jako dva hmotnostní spektrometry sériově spojené **kolizní celou**, ve které dochází k fragmentacím. Mezi nepoužívanější typy v proteomice patří iontová past, lineární iontová past, QTOF a TOF/TOF [180]. Toto uspořádání dovoluje nejprve změřit MS spektrum peptidů, detekované peptidy následně izolovat a podrobit fragmentaci v kolizní cele. Vzniklé fragmenty pak poskytují MSMS spektrum. Cyklus měření MS a MSMS spekter se pravidelně opakuje, přičemž spouštěcím signálem je detekce vhodného peptidu v MS módu.

K fragmentaci může docházet například pomocí kolizní energie a přítomností neutrálního kolizního plynu (CID-Collision Induced Dissociation) [181]. Peptidy se v tomto případě fragmentují nejčastěji za vzniku **y-** a **b- iontů** (Obr. 1). Rozdíl m/z sousedících y- nebo b-iontů odpovídá molekulové hmotnosti určité aminokyseliny. Tak lze z MSMS spekter určit sekvenci aminokyselin. Informace o aminokyselinové sekvenci jednoho peptidu většinou postačuje k identifikaci celého proteinu. Kromě CID fragmentací jsou v proteomice používány disociace založené na záchytu (ECD-Electron Capture Dissociation) [182] nebo přenosu elektronu (ETD-Electron Transfer Dissociation) [183]. Tyto techniky ústí ve fragmentaci peptidů za dusíkem peptidové vazby a vzniklé fragmenty se nazývají c- a z-ionty.

Obrázek 1. Schéma tvorby y- a b- iontů u tetrapeptidu při CID fragmentaci.



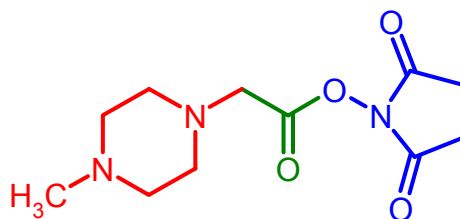
Během typického „shotgun“ experimentu může být naměřeno 10000 až 100000 MSMS spekter, ke kterým je nutné přiřadit správnou sekvenci aminokyselin. Tento požadavek vyřešil vývoj algoritmů, které dokáží porovnat m/z fragmentů naměřených v MSMS módu se sadou fragmentů teoreticky vypočítaných pro všechny proteiny obsažených v určité databázi. Porovnání je možné provádět díky přesným pravidlům vzniku fragmentů v MSMS módu. Nejčastěji používané programy Sequest [184], Mascot [185] a Phenix [186] pak k naměřeným MSMS spektrům s určitou statistickou pravděpodobností přiřadí sekvenci peptidu. Pravděpodobnost identifikace peptidu pozitivně koreluje s počtem fragmentů v MSMS spektru a s přesností, se kterou hmotnostní spektrometr měří MS spektra prekurzorů a MSMS spektra z něj vzniklých fragmentů. Na závěr jsou k sobě sdruženy sekvence identifikovaných peptidů, které pocházejí ze stejného proteinu, a je určena pravděpodobnost správné identifikace celého proteinu. Tato pravděpodobnost pozitivně koreluje s počtem peptidů, u kterých byla správně určena sekvence aminokyselin.

2.3.2.3 Kvantifikační techniky pro „shotgun“ proteomiku

U komparativní „shotgun“ analýzy je potřebné určit relativní koncentraci u co největšího počtu peptidů. Z důvodu komplexnosti proteomických vzorků nelze k tomuto účelu použít postup obvyklý pro kvantifikaci malých organických molekul založený na přidání chemicky podobného standardu a následné HPLC analýze. Pro relativní kvantifikaci stejných peptidů ve dvou různých komplexních vzorcích musí být vzorky smíchány, aby se zabránilo rozdílům vznikajícím díky interferencím složek analytu při

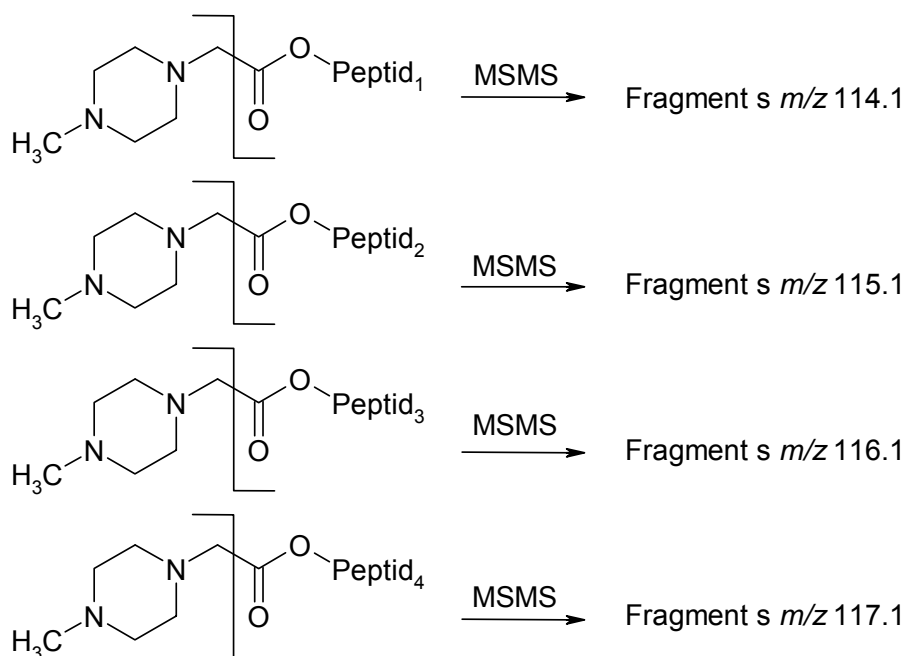
HPLC separaci a ESI ionizaci. Peptidy však musí být zároveň označeny způsobem, který umožní rozpoznat, ke kterému vzorku patří. Řešení nabízí derivatizace látkami obsahující stabilní izotopy jako např. $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$, $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$. Peptidy 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 [187]. Velice výhodné je metabolické značení proteinů v živých buňkách pomocí aminokyselin obsahujících $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ [188]. Novější přístup **SILAC** (Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture) používá pro jednodušší vyhodnocování naměřených spekter lehký a těžký arginin [189]. Dalším možným postupem je značení peptidů pomocí výměny ^{16}O na C-konci peptidu za ^{18}O během štěpení proteinu trypsinem v H_2^{18}O [190]. Další techniky již vyžadují kovalentní připojení izotopických sloučenin. **GIST** technologie (Global Internal Standard Technology) je založena na značení peptidů H_3/D_3 -N-acetoxysukcinimidem [191]. U techniky **ICPL** (Isotope-Coded Protein Labeling) se provádí značení intaktních proteinů, které jsou následně štěpeny [192]. **ICAT** (Isotope-Coded Affinity Tags) je kvantifikační metoda, která je navíc spojena s afinitní chromatografií modifikovaných peptidů. Separace značených peptidů založená na interakci biotinu s avidinem tak umožňuje výrazné snížení komplexity vzorku [193]. Uvedené techniky dovolují provádět relativní kvantifikaci proteinů pocházejících ze dvou, u modifikované SILAC techniky ze tří, různých vzorků [194]. Technika **iTRAQ** (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation), která jako jediná provádí kvantifikaci v MSMS módu, umožňuje analýzu až čtyř vzorků [195], její nejnovější modifikace pak až osmi vzorků v jednom experimentu. Čtyři iTRAQ značky jsou připraveny tak, aby derivatizované peptidy měly stejnou molekulovou hmotnost v MS módu (Obr. 2).

Obrázek 2. Zavedení různých stabilních izotopů do reportérových (červeně) a vyrovnávajících (zeleně) částí u čtyř iTRAQ značek slouží k dosažení stejných molekulových hmotností derivatizovaných peptidů. Část reagující s peptidem je vyznačena modře.



Při fragmentaci v MSMS módu se od modifikovaných peptidů odděluje reportérová část, která v závislosti na použité značce nabývá molekulových hmotností 114.1, 115.1, 116.1 nebo 117.1 (Obr. 3). Při použití iTRAQ metody jsou z tohoto důvodu diskvalifikovány tandemové hmotnostní spektrometry s analyzátoři typu iontové pasti, které nedovolují měřit fragmentační spektra v nízkém rozsahu m/z .

Obrázek 3. Schéma fragmentace derivatizovaných peptidů v MSMS módu.



Z intenzit reportérových iontů ve spektru pak lze vypočítat relativní koncentraci jednotlivých peptidů. Výhodou iTRAQ techniky je, že zavedení piperazinového kruhu

do peptidu zlepšuje fragmentaci ve prospěch snadno interpretovatelných y- a b-iontů. Nevýhodou naopak je, že ačkoliv se ve vzorcích liší zastoupení pouze několika proteinů, musí být provedena MSMS analýza všech peptidů přítomných po proteolytickém štěpení.

Všechny uvedené techniky vyžadují speciální software, který naměřená spektra kvantitativně vyhodnotí. Komerčně je dostupných několik programů a další jsou nabízené k volnému užívání. Navíc se objevují i jednoduché, volně dostupné algoritmy jako i-Tracker [196].

2.4 Statistická analýza

Proteomické analýzy produkují ohromné množství dat, které je nutné správně a citlivě vyhodnotit [197, 198]. Obecně lze rozlišit dva typy statistických analýz: konfirmatorní a explorativní. Konvenční přístupy využívají **konfirmatorních analýz** k ověření předem navržené hypotézy. Naměřená data se vyhodnocují klasickými parametrickými testy jako *t*-test, ANOVA apod. U dat s nenormálním rozdělením lze použít testy neparametrické jako Wilcoxonův test nebo Mann-Whitneyův test. Studované biologické systémy jsou však velmi komplexní a často jim nelze zcela porozumět. Aplikace konfirmatorní analýzy proto může vést k nepříjemnému zjednodušení. **Explorativní analýza** proteomických dat, která jsou navíc často vícerozměrná, má za úkol rozpoznat vztahy, tendence nebo výjimky. Zjištěné jevy pak mohou vést k vytvoření nových hypotéz, jenž budou posléze testovány. Mezi nástroje explorativní analýzy patří např. analýza hlavních komponent, faktorová a shluková analýza a zvláště pak spoléhá na grafické nástroje.

3 CÍL PRÁCE

Cílem předložené dizertační práce bylo identifikovat změny v proteomu bakterie *F. tularensis* kmen LVS vzniklé v důsledku působení různých faktorů prostředí včetně pobytu v intracelulárním prostředí hostitelské buňky. Analýza adaptačních odpovědí umožňuje vytipovat mechanismy, které bakterii *F. tularensis* dovolují přežít nehostinné podmínky včetně podmínek panujících uvnitř hostitelského organismu. V rámci tohoto cíle bylo postupně řešeno několik dílčích úkolů:

- Zavést 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.
- Zavést proteomickou metodu, která by byla schopná citlivě zachytit změny v proteomu, ke kterým dochází již po krátkém čase od začátku působení stresového faktoru.
- Pomocí zavedeného kultivačního systému a proteomické metody nalézt změny v proteomu, které se odehrávají následkem působení stresového faktoru, a následně tyto změny identifikovat metodami založenými na hmotnostní spektrometrii.
- Optimalizace a zavedení pokročilé „shotgun“ proteomické metody a její aplikace do studia reakcí bakterie *F. tularensis* LVS na působení stresových faktorů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Kmeny bakterie *F. tularensis*

Kmen *F. tularensis* LVS je oslabený vakcinační kmen, který byl odvozen od kmene 155 subtypu *holarctica*. Pro experimenty prováděné v rámci dizertační práce byl použit kmen získaný z americké sbírky American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) pod označením ATCC 29684.

Pro analýzu odpovědi na oxidační působení peroxidu vodíku byl použit mutantní kmen *F. tularensis* LVS $\Delta iglC1+2$ připravený metodou alelické výměny [18]. Kmen byl získán darem od I. Golovliova (Ústav klinické bakteriologie, Univerzita Umeå, Umeå, Švédsko). Buňky tohoto kmene v genomu postrádají obě alely genu *iglC*. Práce s kmenem *F. tularensis* LVS $\Delta iglC1+2$ splňovala veškerá nařízení plynoucí z platné legislativy pro práci s geneticky modifikovanými organizmy.

4.1.2 Buněčná kultura

Pro analýzu odpovědi bakterie *F. tularensis* na intracelulární prostředí byly použity buňky myši monocyto-makrofágové linie J774.2. Buněčná kultura byla pořízena ze sbírky European Collection of Cell Cultures (Salisbury, Velká Británie).

4.1.3 Chemikálie

Běžné a některé speciální chemikálie použité v rámci dizertační práce byly zakoupeny od následujících výrobců: Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švédsko), Bio-Rad (Hercules a Richmond, CA, USA), Fluka (Buchs, Švýcarsko), Invitrogen (San Diego, CA, USA), Merck (Darmstadt, Německo), MP Biomedicals (Irvine, CA, USA), Promega (Madison, WI, USA), Roche Diagnostics (Mannheim, Německo), Serva (Heidelberg, Německo) a Sigma (St. Louis, MO, USA). Chemikálie pocházející od jiných než výše uvedených společností nebo chemikálie mimořádného významu jsou specifikovány v dalším textu.

4.1.4 Přístroje

- Gradientní mixér Gradient former 395, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Hybridizér HYBRIDISER HB-1D, Techne (Cambridge, Velká Británie)

- Chladicí zařízení Multitemp II, Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švédsko)
- Chladicí zařízení Refrigerated Recirculator Model 4860, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Inkubátor INKUBATOR 1000, Heidolph Instruments (Schwabach, Německo)
- Inkubátor Orbital Shaking Incubator SI6, ShellLab (Cornelius, OR, USA)
- Laminární box S@FE FLOW 1.2, Bio-air Instruments (Siziano, Itálie)
- Multiphor II, Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Švédsko)
- Mrazicí box PowerFREEZE -87 °C VXE, Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- MS1 aMS2 Minishaker, IKA (Wilmington, NC, USA)
- PROTEAN II Multi-Cell, Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
- PROTEAN Plus Dodeca Cell, Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
- Protein IEF Cell, Bio-Rad (Richmond, CA, USA)
- Příruční denzitometr CO8000 Cell Density Meter, WPA Biowave (Cambridge, Velká Británie)
- Sonikační lázeň Ultrasonic LC 30 H, Elma (Singen, Německo)
- Vakuová centrifuga Speed Vac, Eppendorf (Hamburg, Německo)
- KODAK Image Station 2000R, Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA)
- Zdroj elektrického napětí a proudu EC 6000P, Hoefer Pharmacia Biotech (San Francisco, CA, USA)
- Zdroj elektrického napětí a proudu PowerPac Universal, Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
- Běžné laboratorní přístroje a materiál: analytické váhy, navážky, centrifuga, magnetická míchačka, termomixér, třepačka, pH metr, skleněné zkumavky, plastové zkumavky, zátky na baňky, plastové pipety, očkovací klička, misky na barvení gelů, pinzeta, skalpel, filtrační papír, odměrné válce, celofán, automatické mikropipety.
- Speciální přístroje, které nejsou uvedeny výše, jsou specifikovány v dalším textu.

4.2 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS

Z analýzy genomu vyplynulo, že *F. tularensis* má narušeny mnohé metabolické cesty [17], což má za následek vyšší požadavky na nutriční faktory v kultivačních půdách. V prezentovaných experimentech byly používány dva typy půd.

Pro přípravu kultur pro experimenty byly použity pevné půdy připravené dle **McLeoda** obsahující Thayer-Martinův agarový základ, Bacto agar, hemoglobin a IsoVitalex (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA). Nejprve byla rozmrazena zásobní suspenze bakterií, která byla uchovávána při -80 °C. Suspenze byla inokulována na půdy dle McLeoda a následně kultivována minimálně 48 h při 37 °C. Takto připravené kultury byly označeny a uchovány při 4 °C až do dalšího použití, maximálně však po dobu čtyř týdnů.

Pro vlastní proteomické analýzy byla kultura přeočkována do tekutého média připraveného dle **Chamberlaina** [2] a následně kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Použití chemicky definovaného média dovoluje přesně měnit jeho složení pro navození stresu. Pro některé experimenty bylo navíc použito metabolické značení, kdy byl v médiu cíleně nahrazen methionin za radioaktivní ekvivalent s izotopem síry ³⁵S. K tomuto účelu byl použit Tran ³⁵S-Label (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), který obsahuje 70 % [³⁵S]-methioninu.

4.2.1 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS v intracelulárním prostředí

4.2.1.1 Příprava bakterie *F. tularensis* LVS

Den před pokusem byla zásobní kultura *F. tularensis* LVS na McLeod půdě přeočkována do kompletního tekutého média dle Chamberlaina a přes noc kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Druhý den byla z této kultury připravena suspenze o O.D._{600 nm} 0,10-0,15, která byla kultivována za stejných podmínek další tři hodiny.

4.2.1.2 Příprava monocyto-makrofágové linie J774.2

Kultivace buněk monocyto-makrofágové linie J774.2 probíhala v kompletním DMEM médiu s 10 % inaktivovaného fetálního telecího séra a gentamicinem při 36,7 °C a v atmosféře 5% CO₂. Posledních 48 h před provedením infekce byly buňky kultivovány v médiu bez gentamicinu. Před pokusem byly buňky přeneseny na Petriho misky pro buněčné kultury, kde se nechaly přes noc adherovat. V den pokusu bylo k dispozici 1x10⁷ buněk.

4.2.1.3 Infikování buněk J774.2

Z exponenciálně rostoucí bakteriální kultury byla připravena suspenze s celkovým obsahem 5×10^9 bakterií, což přibližně odpovídá 1 ml kultury s $O.D._{600\text{ nm}} 0,50$. Bakterie byly stočeny a resuspendovány v 500 μl předeřátého DMEM média bez séra a bez gentamicinu. Z této suspenze byl určen skutečný počet bakterií vyšetím CFU. Suspenze byla spojena s 3,5 ml předeřátého DMEM média bez séra a bez gentamicinu a tento objem byl přidán k adherovaným buňkám. Na jednu buňku tak teoreticky připadalo 500 bakterií. Celkový objem média 4,0 ml byl zvolen, aby tekutina s rezervou pokrývala všechny buňky na Petriho misce, ale počet bakterií na ml byl co nejvyšší. Infekce buněk probíhala 60 min při $36,7\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosféře 5% CO_2 . Po této době byly adherované buňky dvakrát promyty v předeřátém DMEM médiu bez methioninu, cysteinu a gentamicinu. Ve 3 ml tohoto média byly buňky dále kultivovány 30 min, aby byly spotřebovány intracelulární zásoby methioninu a cysteinu. Po 30 min byl k buňkám v médiu nejprve přidán cykloheximid v dimethylsulfoxidu do finální koncentrace 200 $\mu\text{g/ml}$ a za 5 min byly doplněny chybějící aminokyseliny ve formě radioaktivních analogů obsažených v Tran ^{35}S -Label v dávce 200 $\mu\text{Ci/ml}$. Nově syntetizované bakteriální proteiny byly takto značeny po dobu 2 h. Po této době byly buňky opakovaně promyty ledovým kompletním DMEM bez séra a gentamicinu a suspenze buněk v médiu byla přenesena do 50 ml zkumavky. Buňky byly stočeny při 1000 rpm 5 min při $4\text{ }^\circ\text{C}$ a supernatant odstraněn.

4.2.1.4 Provedení kontrolního experimentu

Z exponenciálně rostoucí bakteriální kultury byl připraven 1 ml suspenze s $O.D._{600\text{ nm}} 0,50$. Bakterie byly stočeny a resuspendovány v 500 μl předeřátého DMEM média bez séra a gentamicinu. Tato suspenze byla přidána ke 3 ml kompletního DMEM bez séra a gentamicinu předeřátého na $37\text{ }^\circ\text{C}$. Takto byly bakterie kultivovány 60 min v polystyrenové zkumavce při $37\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byly bakterie v médiu 5 min centrifugovány při 2400 g při laboratorní teplotě a promyty v DMEM bez methioninu, cysteinu a gentamicinu. V 1 ml tohoto média byly buňky 5 min kultivovány a poté byl ke kultuře přidán cykloheximid (Sigma, St. Louis, MO, USA) v DMSO do finální

koncentrace 200 µg/ml. Za 5 min bylo médium doplněno radioaktivními analogy methioninu a cysteinu obsaženými v Tran ³⁵S-Label v dávce 200 µCi/ml. Takto byly bakterie inkubovány další 2 h. Pro ukončení značení byl k bakteriím přidán 1 ml ledového kompletního DMEM bez séra a gentamicinu. Bakterie byly dvakrát promyty ve stejném ledovém médiu a přeneseny do označené zkumavky. Pak byly bakterie stočeny 5 min při 2400 g a 4 °C.

4.2.2 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* LVS Δ iglC1+2 pro analýzu odpovědi na oxidativní stres

Kultivace divokého kmene LVS i mutantního kmene Δ iglC1+2 probíhala za stejných podmínek [199]. Kultury obou kmenů na McLeod půdách uchovávané při 4 °C byly přeočkovány do kompletního tekutého média dle Chamberlaina. Poté byly kultury přes noc inkubovány v orbitální třepačce při 37 °C. Druhý den byly z každé kultury připraveny dvě suspenze o objemu 1 ml a O.D._{600 nm} 0,10-0,12. Přibližně po 4 h kultivace v orbitální třepačce při 37 °C kultury dosáhly exponenciální fáze růstu (O.D._{600 nm} 0,50-0,55). Bakterie byly centrifugovány, promyty a následně resuspendovány v médiu dle Chamberlaina bez methioninu. Do jedné kultury byl ihned přidán peroxid vodíku do finální koncentrace 5 mM, do kontrolní kultury byla přidána deionizovaná voda o stejném objemu. Po 5 minutách bylo médium doplněno o 200 µCi [³⁵S]-methioninu. Metabolické značení bylo zastaveno po 60 min přidáním 1 ml ledově studeného kompletního média. Z důvodu odstranění zbytků neinkorporovaného [³⁵S]-methioninu byly bakterie na závěr pětkrát promyty v ledovém PBS.

4.2.3 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS pro analýzu odpovědi na nedostatek železa

Kultura *F. tularensis* LVS na McLeod půdě uchovávané při 4 °C byla přeočkována do kompletního tekutého média dle Chamberlaina. Tato kultura byla přes noc kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Druhý den byly z této kultury připraveny dvě suspenze o O.D._{600 nm} 0,05-0,06. První byla připravena v kompletním médiu dle Chamberlaina, druhá pak v médiu dle Chamberlaina bez síranu železnatého s přídatkem 100 µM deferoxamin mesylátu (Sigma, St. Louis, MO, USA). Po 5 hodinách byly kultury centrifugovány a vzniklé pelety resuspendovány v médiích, kde byl methionin

vyměněn za [³⁵S]-methionin o celkové aktivitě 200 μCi. Metabolické značení bylo zastaveno po 60 min kultivace v orbitální třepačce při 37 °C přidáním 1 ml ledově studeného kompletního média. Z důvodu odstranění zbytků neinkorporovaného [³⁵S]-methioninu byly bakterie na závěr pětkrát promyty v ledovém PBS.

4.2.4 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS pro analýzu odpovědi na změny teploty prostředí

Pro tuto analýzu byly vybrány tři různé teploty kultivace. Teplota 25 °C simulovala běžné prostředí mimo hostitele, teplota 37 °C odpovídá teplotě těla lidského hostitele a teplota 42 °C byla použita pro studium adaptačních mechanismů při působení tepelného šoku.

Kultura *F. tularensis* LVS na McLeod půdě uchovávané při 4 °C byla přeočkována do kompletního tekutého média dle Chamberlaina a přes noc kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Druhý den byly z této kultury připraveny tři suspenze vždy o objemu 25 ml a O.D._{600 nm} 0,10-0,12. První kultura byla kultivována v orbitální třepačce při 25 °C, druhá kultura byla kultivována v orbitální třepačce při 42 °C a kontrolní kultura byla kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Kultivace byla zastavena, až kultura dosáhla O.D._{600 nm} 0,70. Bakterie byly poté centrifugovány a jednou promyty v ledovém PBS.

4.2.5 Kultivace bakterie *F. tularensis* LVS pro analýzu stacionární fáze růstu

Pro tuto analýzu byla vedle kontrolní kultury připravena kultura, která dosáhla stacionární fáze růstu. V této fázi je proliferace bakterií velice omezená z důvodu vyčerpání živin v médiu nebo nahromadění odpadních metabolitů.

Kultura *F. tularensis* LVS na McLeod půdě uchovávané při 4 °C byla přeočkována do kompletního tekutého média dle Chamberlaina a přes noc kultivována v orbitální třepačce při 37 °C. Druhý den byly z této kultury připraveny dvě suspenze vždy o objemu 25 ml a O.D._{600 nm} 0,10-0,12. První kultura byla kultivována v orbitální třepačce po dobu 5 h. Druhá kultura byla kultivována po dobu 24 h. Bakterie byly poté centrifugovány a jednou promyty v ledovém PBS.

4.3 Proteomická analýza založená na 2D-PAGE

4.3.1 Příprava vzorků pro analytickou 2D-PAGE

4.3.1.1 Vzorky bakterie *F. tularensis* LVS po infekci buněk J774.2

K buňkám, které po posledním promytí a centrifugaci vytvořily pelet, bylo přidáno 5 ml ledového 0,1% deoxycholátu sodného v PBS. Tento detergent by měl způsobit dezintegraci eukaryotických buněk bez vlivu na integritu bakteriálních buněk. Suspenze byla řádně zamíchána a po 2 min k ní bylo přidáno 45 ml ledového PBS. Nerozpuštěné zbytky eukaryotických buněk včetně bakterií byly získány centrifugací při 35000 g po dobu 15 min při 4 °C. Peleta byla resuspendována v PBS a vzniklá suspenze přenesena do mikrozkušavek. K promytým peletám bylo přidáno 20 µl lyzačního pufru obsahujícího 28 mM Tris-HCl, 22 mM Tris-báze, 0,3 % SDS, DeStreak Reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švédsko) [200] a inhibitory proteáz (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). Pelet byl řádně resuspendován a na 3 min vložen do vařicí vodní lázně. Poté byly vzorky okamžitě přeneseny na led a po vychladnutí byly inkubovány 30 min s 30 U benzonázy (Sigma, St. Louis, MO, USA) v termomixeru při 8 °C.

K peletám připraveným z kontrolního experimentu bylo rovnou přidáno 20 µl stejného lyzačního pufru a postup byl dále shodný s postupem pro intracelulární bakterie.

4.3.1.2 Vzorky bakterie *F. tularensis* LVS po působení izolovaných stresových faktorů

V analýzách využívajících 2D-PAGE byly bakteriální buňky po ukončení kultivace a opakovaném promytí v PBS rozpuštěny ve 20 µl lyzačního pufru složeném z 28 mM Tris-HCl, 22 mM Tris-báze, 0,3 % SDS a přidavkem inhibitorů proteáz. Vzorky ve zkumavkách byly po řádném zamíchání na 3 min ponořeny do vařicí vodní lázně a následně zchlazeny na ledu. Pro odstranění nukleových kyselin, které výrazně zvyšují viskozitu lyzátu, byla použita degradace pomocí benzonázy. Pro odstranění

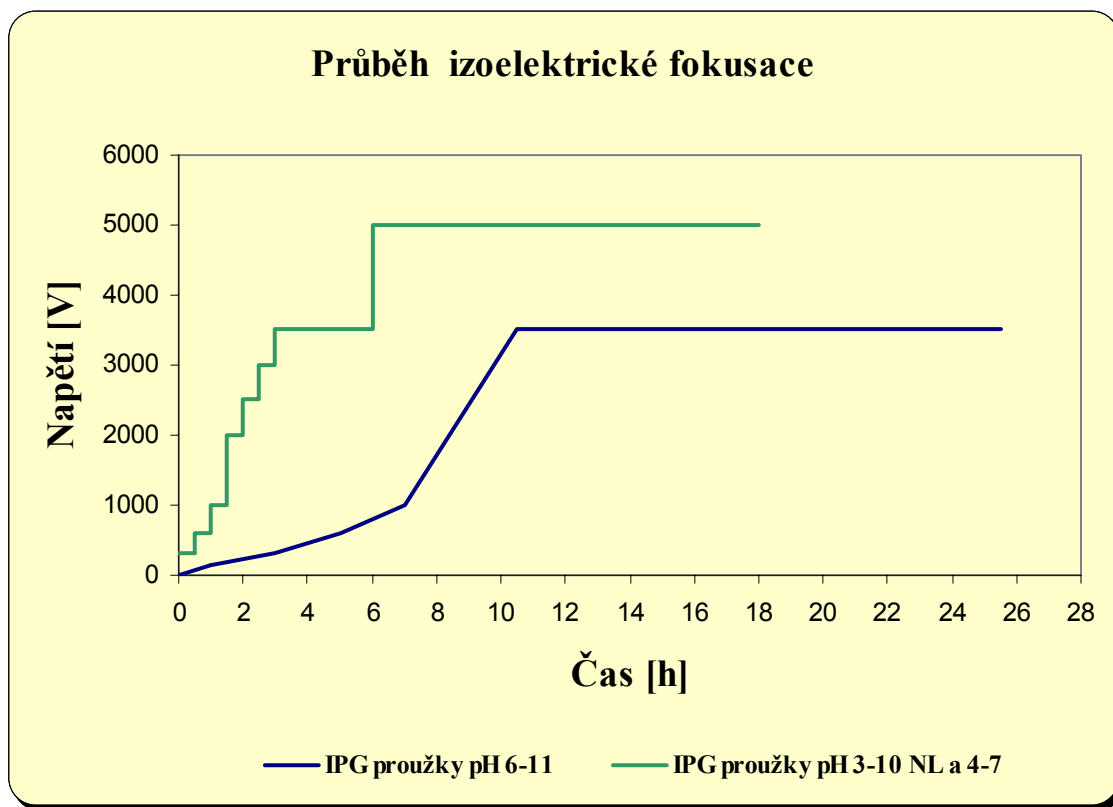
s IEF interferujícího SDS byla provedena precipitace proteinů pomocí ReadyPrep 2D-CleanUp Kitu (Bio-Rad, Hercules a Richmond, CA, USA) využívajícího snížení rozpustnosti proteinů při okyselení roztoku trichloroctovou kyselinou. Po centrifugaci byly vysrážené proteiny rozpuštěny v 50 μ l vzorkového pufru obsahujícím 9 M močovinu, 4 % CHAPS, 40 mM Tris-báze, 1,2 % v/v DeStreak [200], 5 % v/v amfolyty pH 9-17. Pro stanovení obsahu radioaktivního izotopu síry v bakteriálních proteinech bylo z každého naředěného vzorku odebráno vždy dvakrát 5 μ l a toto množství bylo přidáno k 5 ml scintilační kapaliny obsahující 0,6 % 2,5-difenyloxazolu, 0,02 % [1,4-bis(5-fenyl-2-oxazolyl)]benzenu a 6 % naftalenu v dioxinu. K vlastnímu stanovení byl použit kapalinový scintilátor LS 6000LL (Beckman, Fullerton, CA, USA).

4.3.2 Příprava analytických 2D-PAGE gelů

4.3.2.1 Izoelektrická fokusace

Pro přípravu analytických gelů byly vzorky s proteiny o obsahu radioaktivity 5×10^6 dpm naředěny do objemu 350 μ l rehydratačním pufrům 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 odpovídajícího IPG pufru, v případě použití IPG proužku s bazickým pH rozsahem 2% v/v IPG pufru. Roztok byl nanesen na IPG proužek o délce 18 cm, který se takto přes noc nechal pasivně rehydratovat. V rámci dizertační práce byly použity IPG proužky s celkem třemi různými gradienty pH: 3-10 NL, 4-7, 6-11. Druhý den ráno byly rehydratované IPG proužky s gradientem pH 3-10 NL nebo 4-11 přeneseny do přístroje pro fokusaci Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech Uppsala, Švédsko), IPG proužky s gradientem pH 6-11 do přístroje Protein IEF Cell (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Proužky byly umístěny tak, aby se oběma konci dotýkaly příslušných elektrod a následně byly převrstveny tekutým parafínem, který zabraňoval odpařování vody a krystalizaci močoviny. Aplikací elektrického napětí začala probíhat vlastní izoelektrická fokusace proteinů. Průběh izoelektrické fokusace, tzn. hodnota napětí, doba působení napětí a nejvyšší povolený odpor 50 mA, byl nastaven v závislosti na použitých IPG proužcích (Obr. 4).

Obrázek 4. Průběh izoelektrické fokusace v závislosti na použitých IPG proužcích.



Po dokončení izoelektrické fokusace byly IPG proužky 15 min inkubovány v redukující ekvilibrační lázni obsahující 36 % w/v močoviny, 50 mM Tris-báze pH 8,8, 30 % v/v glycerolu, 1% w/v DTT a následně 15 min v alkyluačním ekvilibračním roztoku obsahujícím místo 1% w/v DTT 4% w/v amid kyseliny 2-jodoctové.

4.3.2.2 SDS elektroforéza a autoradiografie

Pro druhý směr byly připraveny gradientní 9-16% SDS-PAGE gely o rozměrech 18 x 20 cm. Pro tyto účely byly použity roztoky akrylamidu pro přípravu 9% a 16% polyakrylamidových gelů dle rozpisu uvedeného v tabulce 1. Roztoky byly míchány v gradientové míchačce a současně vlévány do skleněných komor, kde následně během 2 hodin polymerizovaly.

Tabulka 1. Roztoky použité pro přípravu gradientního 9-16% SDS-PAGE gelu.

Název roztoku a jeho složení	Koncentrace	Množství
Roztok akrylamidu s piperazindiakrylamidem		
Akrylamid	30 % (w/v)	96 g
Piperazindiakrylamid	8 % (w/v)	2,56 g
Deionizovaná voda		do 320 ml
9% polyakrylamidový gel		
Roztok akrylamidu s piperazindiakrylamidem	20,71 % (v/v)	104,1 ml
Tris-báze, pH 8,8	18,18 % (v/v)	91,4 ml
5% roztok thiosulfátu		1,785 ml
Deionizovaná voda	32,99 % (v/v)	165,8 ml
10% roztok persíranu amonného		1,381 ml
N, N, N',N'-tetramethylethylendiamin	27,48 % (v/v)	138,13 ml
16% polyakrylamidový gel		
Roztok akrylamidu s piperazindiakrylamidem	40,75 % (v/v)	204,9 ml
Tris-báze, pH 8,8	18,17 % (v/v)	91,4 ml
5% roztok thiosulfátu		1,785 ml
Deionizovaná voda	12,43 % (v/v)	65,2 ml
10% roztok persíranu amonného		1,381 ml
N, N, N',N'-tetramethylethylendiamin	27,47 % (v/v)	138,13 ml

Po polymerizaci byl na horní hranu každého gelu přiložen fokusovaný IPG proužek, který byl zalitím do 1% roztoku agarózy okamžitě znehybněn. Po ztuhnutí agarózy byl gel vložen do elektroforetické nádoby s elektroforetickým pufrem obsahující 384 mM glycinu, 50 mM Tris-báze, 0,1% w/v SDS a následně provedena elektroforéza. Elektroforéza probíhala nejprve 90 min při 5 mA/gel a maximálním napětí 500 V a dalších 5 hodin při 40 mA/gel a maximálním napětí 500 V. Po elektroforéze byly gely opláchnuty v neionizované vodě a separované proteiny fixovány přes noc v lázni obsahující 50 % methanolu, 10 % kyseliny octové a 40 % destilované vody. Následně byly gely dvakrát 5 min promyty v 7% kyselině octové a dvakrát 45 min v dimethylsulfoxidu. Pro autoradiografii byly gely intenzifikovány 45 min ve 22% roztoku 2,5-difenyloxazolu v dimethylsulfoxidu. Po několikanásobném promytí v destilované vodě byly gely umístěny na filtrační papír a vloženy do sušičky Gel

Dryer Model 583 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) připojené k vývěvě HydroTech Vakuum Pump (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Sušení gelů probíhalo 1 h při 60 °C a 1 h při 70 °C. Po vysušení byly v ochranných kazetách exponovány na RayMax Beta filmy (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) po dobu 5 dnů při –80 °C.

4.3.3 Digitalizace a softwarové vyhodnocení analytických 2D-PAGE gelů

Pro zabezpečení reprodukovatelnosti byly pro každý studovaný typ stresové odpovědi připraveny minimálně tři 2D-PAGE gely. Filmy byly digitalizovány pomocí CCD kamery Image Station 2000R (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) v rozlišení 150 dpi. Digitalizované obrazy exportované do 16 bitového TIFF formátu byly podrobeny obrazové analýze v programu PDQuest 7.2.0. později 7.3.1. (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Po nezbytné úpravě obrazu bylo provedeno rozpoznání skvrn, které vznikly autoradiografií značených proteinů. Za tímto účelem byly zadány hladiny minimální intenzity skvrny, minimální průměr skvrny a maximální intenzita pozadí. Pro automatickou eliminaci chybně rozpoznávaných skvrn byly použity funkce pro odstranění vertikálně a horizontálně rozmazaných skvrn a vyhlazení skvrn. Na závěr byly všechny gely prohlédnuty a chyby v rozpoznání byly ručně upraveny. S ohledem na dynamický rozsah autoradiografických filmů byla u všech skvrn stanovena optická denzita. Skvrny, jejichž intenzita přesahovala dynamický rozsah autoradiografických filmů, a které proto nemohou být kvantifikovány automaticky, byly ručně označeny prostřednictvím vymezení jejich obrysu. Pro potlačení případné variability v nanáškách byly u každé skvrny použity normalizované intenzity vypočítané jako podíl mezi intenzitou skvrny a součtem intenzit všech skvrn rozpoznávaných na gelu. Konečnou pracovní jednotkou byly hodnoty vyjádřené v ppm.

Na každém z obrazů bylo v různých částech označeno přibližně 15 skvrn, u kterých bylo podle intenzity a polohy okolních skvrn zřejmé, že představují tentýž protein. Pomocí těchto skvrn software provedl přiřazení zbývajících skvrn na všech gelech. Přiřazení bylo manuálně zkontrolováno a případné chyby a nedostatky byly ručně opraveny.

Pro odhalení změn v syntéze proteinů v důsledku působení stresu bylo nastaveno kvantitativní a statistické kritérium. Skvrny musely vykazovat minimálně dvojnásobné

snížení či dvojnásobné zvýšení intenzity oproti kontrole a současně tato změna musela být statisticky potvrzena Studentovým *t*-testem na hladině významnosti $p < 0.01$. Program poté označil skvrny, které současně splňovaly oba zadané parametry.

Pro kontrolu správné identifikace proteinu hmotnostní spektrometrií lze využít shody teoreticky vypočítaného pI a MW s hodnotami odečtenými z 2D-PAGE gelu. Z tohoto důvodu jsou gely kalibrovány pomocí pI a MW v minulosti správně identifikovaných proteinů. Tímto způsobem tak mohou být ke všem skvrnám na gelech přiřazeny přibližné hodnoty těchto veličin.

4.3.4 Identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE

4.3.4.1 Stanovení koncentrace proteinů

Za účelem identifikace proteinů hmotnostní spektrometrií bylo nutné připraven preparativní gel s použitím konvenčního, neradioaktivního vzorku pocházejícího ze stresované kultury bakterie *F. tularensis* LVS. Nanáška byla v tomto případě odměřena na množství proteinů. Po krocích extrakce, precipitace a rozpuštění proteinů ve vzorkovém pufru provedených obdobně, jak je popsáno v kapitole 4.3.1, byla ve vzorcích stanovena koncentrace proteinů. Koncentraci proteinů lze měřit spektrofotometricky díky jejich reakci s bicinchoninovou kyselinou a měďnatými ionty v alkalickém prostředí za vzniku barevných komplexů mědných iontů [201]. Protože některé složky vzorkového pufru interferují s činidly nezbytnými pro stanovení proteinů, bylo nejprve nutné proteiny precipitovat kyselinou trichloroctovou v přítomnosti deoxycholátu sodného a vysrážené proteiny rozpustit ve vodném roztoku 5% SDS a 0,1M hydroxidu sodného. Dále bylo stanovení prováděno podle instrukcí výrobce. Měření absorbance probíhalo na spektrofotometru Helios γ (Thermo Spectronic, Cambridge, Velká Británie) při vlnové délce 562 nm.

4.3.4.2 Příprava preparativního 2D-PAGE gelu

Preparativní gely o různých pH gradientech s nanáškou 500 μ g proteinů byly připraveny stejným postupem jak je popsáno v kapitole 4.3.2. Po SDS elektroforéze

byly gely opláchnuty v destilované vodě. K barvení proteinů byla použita Coomassie modř G-250 obsažená v Colloidal Blue Staining Kitu (Invitrogen, San Diego, CA, USA). Barvení probíhalo přes noc dle instrukcí výrobce. Během dalších 24 h bylo pozadí gelů odbarveno destilovanou vodou. Gely byly až do dalšího upotřebení uchovávány zatavené ve fólii s přidavkem 20% síranu amonného při 4 °C.

4.3.4.3 Štěpení proteinů v gelu

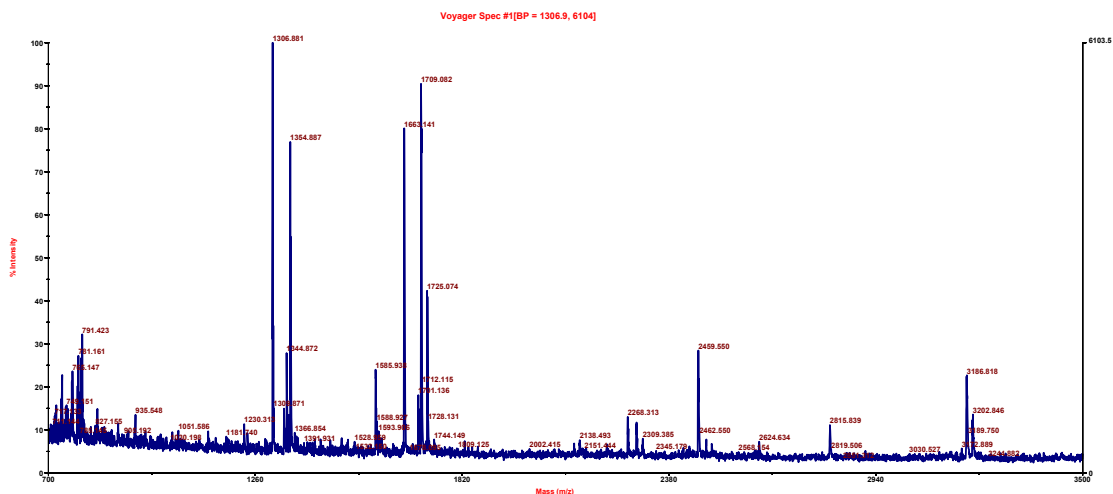
Skvrny splňující kritéria pro detekci kvantitativních a kvalitativních změn zadaná v softwaru PDQuest byly z preparativního gelu vyřezány a vloženy do mikrozkušavky. Po rozmělnění gelů byly vzniklé menší kousky během 20 min inkubací ve 200 μ l roztoku obsahujícího 100 mM Tris-báze v 50% acetonitrilu, pH 8,5 při 30 °C odbarveny. Tekutina s barvivem byla odstraněna a gely byly po dobu 30 min při 30 °C inkubovány ve 200 μ l ekvilibračního roztoku složeného z 50 mM hydrogenuhličitanu amonného v 5% acetonitrilu, pH 7,8. Po odstranění tekutiny byly gely vakuově vysušeny a následně k nim bylo přidáno 5 μ l ekvilibračního pufru s 0,1 μ g modifikovaného trypsinu (Promega, Madison, WI, USA). Po 15 min inkubaci při 4 °C byly nabobtnalé gely převrstveny 25 μ l ekvilibračního pufru a přes noc inkubovány při 37 °C za stálého míchání v termomixéru. Pro identifikaci byly použity peptidy přítomné v supernatantu a peptidy extrahované z gelů vzrůstající koncentrací acetonitrilu.

4.3.4.4 Identifikace proteinů pomocí hmotnostního spektrometru MALDI-TOF

Hmotnostní spektra směsi peptidů vzniklých po štěpení trypsinem byla měřena v pozitivním reflektornovém módu na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Pro každý protein byl na terčík nanášeno 0,5 μ l směsi proteolytických peptidů, která byla těsně pře kompletním vysušením překryta 0,5 μ l vodného roztoku matrice obsahující 5 % 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny, 33 % acetonitrilu a 0,3 % kyseliny trifluoroctové. Přístroj byl nejprve externě kalibrován pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, France). Spektra obsahující autolytické peptidy trypsinu m/z 842,510 a 2211,104 byly navíc kalibrovány interně. Pro obsluhu přístroje byl použit

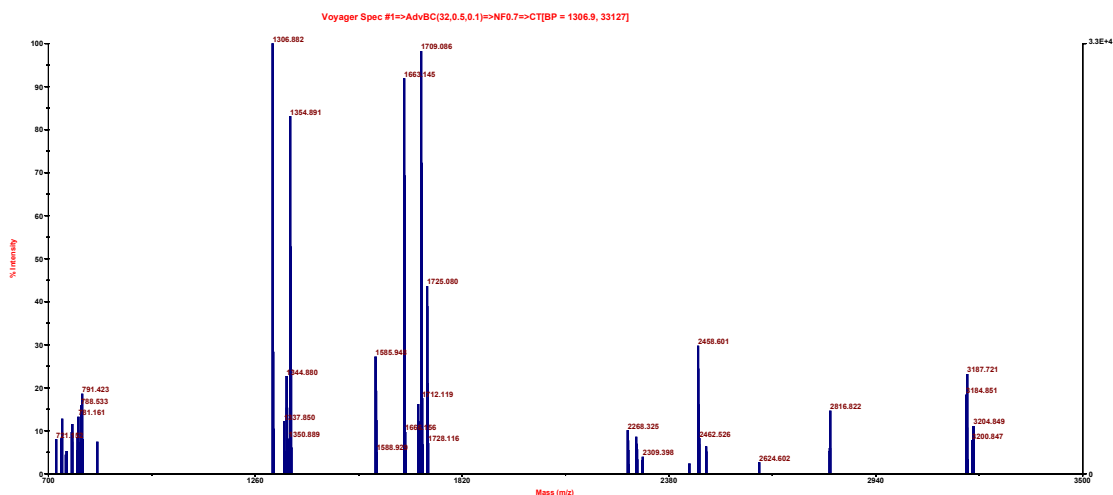
software Voyager Control Panel. Spektra byla měřena v rozmezí m/z 700-3500, konečné spektrum bylo průměrem tří nezávislých spekter, která byla naměřena ze sta záblesků laseru (Obr. 5).

Obrázek 5. Typický vzhled surového spektra naměřeného na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF.



Surová spektra byla upravována v softwaru Data Explorer 3.5. Po vyhlazení a úpravě základní linie byly nastaveny minimální hranice pro intenzitu píku a pro plochu pod píkem. Píky, které tato kritéria splňovaly, se pak objevily v deizotopovaném spektru. Z každého vzorku byl tímto způsobem získán seznam monoizotopických hodnot m/z pro peptidy obsaženy ve směsi po proteolytickém štěpení (Obr. 6).

Obrázek 6. Vzhled spektra po úpravě v programu Data Explorer.



K vlastní identifikaci proteinů z naměřených MALDI-TOF spekter byla použita proteinová databáze uložená v rámci NCBI, která vznikla přeložením genomu *F. tularensis* kmenu SCHU S4 do sekvence aminokyselin a zahrnuje *m/z* teoretických proteolytických peptidů. Pro prohledávání této databáze byl použit nástroj MS-FIT softwaru ProteinProspector 4.0.5. (University of California, San Francisco Mass Spectrometry Facility, San Francisco, CA, USA) volně dostupný na <http://prospector.ucsf.edu>. Pro porovnávání naměřených hodnot s teoreticky vypočítanými hodnotami byly použity parametry uvedené v tabulce 2.

Správnost identifikací byla posuzována dle hodnoty MOWSE skóre [202], procentuálního pokrytí sekvence, počtu správně přiřazených peptidů, rozsahu chyby u přiřazených peptidů a konečně dle shody MW a pI proteinů odečtených z 2D-PAGE gelů s hodnotami teoreticky vypočítanými ze sekvence aminokyselin uloženými v proteinové databázi.

CAF PSD analýza byla provedena pouze v několika případech. Vždy ale vedla k jednoznačnému potvrzení nejisté identifikace. Pro přípravu CAF značených peptidů byl použit optimalizovaný protokol [169]. V dalším průběhu byla pro účely potvrzení identifikace používána výhradně metoda LC/ESI-QTOF.

Tabulka 2. Parametry použité pro prohledávání proteinových databází programem ProteinProspector.

Parametr	Zvolené nastavení
Databáze	Aktuální verze NCBIInr
Taxonomie	<i>Francisella tularensis</i>
MW a pI proteinů	Bez omezení
Maximální odchylka <i>m/z</i> peptidů	100 ppm
Minimální počet peptidů pro identifikaci proteinu	4
Použitá proteáza	Trypsin
Modifikace peptidů	Pevná modifikace cysteinů amidem kyseliny 2-jodoctové vedoucí ke karbamidomethylaci
	Fakultativní oxidace methioninu
	Fakultativní tvorba pyroglutamátu na N-koncovém

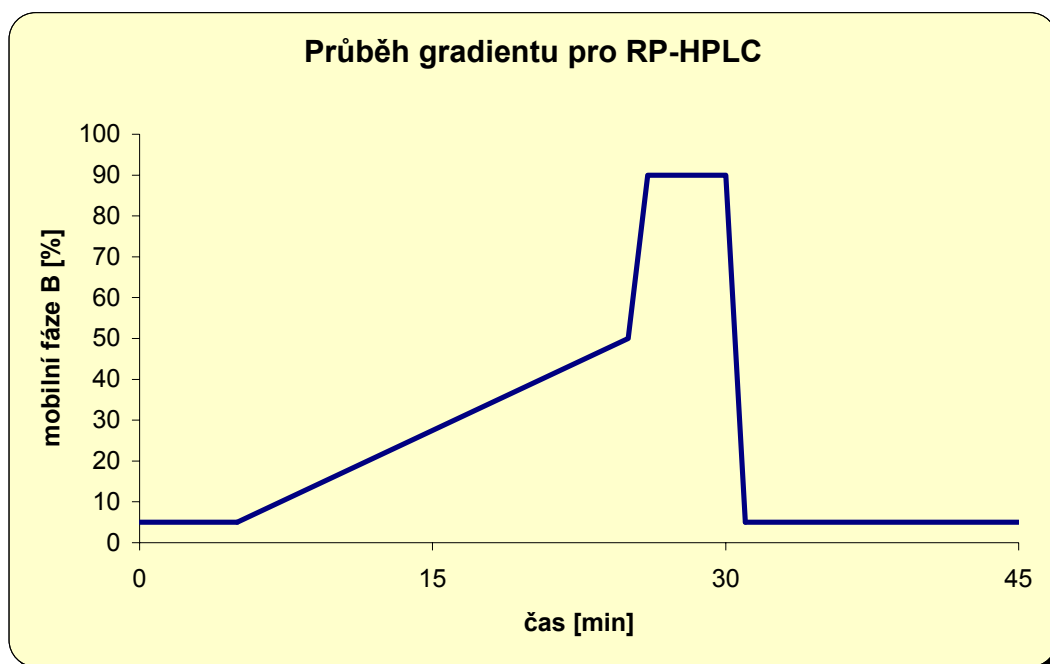
	glutaminu
	Fakultativní acetylace na N-konci proteinu
Možná nerozštěpená místa	1
Seznam známých nečistot	<i>m/z</i> autolytických peptidů trypsinu
	<i>m/z</i> peptidů vzniklých z keratinu
	<i>m/z</i> charakteristické pro použitou matici kyseliny 2,5-dihydroxybenzoovou

4.3.4.5 Identifikace proteinů pomocí spojení HPLC/ESI-QTOF

V případech, kdy výsledky identifikace separovaného proteinu pomocí MALDI-TOF MS byly nejednoznačné, např. kvůli nízkému MOWSE skóre, nízkému pokrytí sekvence, nízkému počtu identifikovaných peptidů či neshodě mezi MW a pI teoreticky vypočítanými s hodnotami odečteným z 2D-PAGE gelu, bylo přistoupeno k fragmentační analýze na tandemovém hybridním hmotnostním spektrometru ESI-QTOF.

Pro identifikaci separovaných proteinů pomocí HPLC/ESI-QTOF MSMS analýzy byly objemy roztoků peptidů po proteolytickém štěpení v gelu nejprve redukovány ve vakuové centrifuze. Poté byl roztok zředěn mobilní fází A o složení 2 % acetonitril, 97,9 % vody a 0,1 % kyseliny mravenčí. Vzorek byl nastříknut na HPLC systém CapLC (Waters, Milford, MA, USA) pracující v „nano“ provedení. Směs peptidů byla po nástřiku unášena mobilní fází A na předkolonu m-PrecolumnTM 300 mm x 5 mm (LC Packings, Sunnyvale, CA, USA), se stacionární fází PepMapTM C₁₈, 5 mm, 100 Å (LC Packings, Sunnyvale, CA, USA), kde došlo k jejímu záchytu. Po změně zapojení byly z předkolony v opačném směru vymývány peptidy elučním gradientem tvořeným mobilní fází A a mobilní fází B (80 % acetonitrilu, 19,9 % vody a 0,1 % kyseliny mravenčí) při průtoku 300 nl/min, který byl dosažen pasivním rozdělením průtoku 5 µl/min. Během 20 min se kontinuálně zvýšilo zastoupení mobilní fáze B v gradientu z původních 5 % na 50 %, následovalo promytí kolony 90 % fáze B a ekvilibrace na počáteční gradient (Obr. 7).

Obrázek 7. Průběh zastoupení mobilní fáze B v gradientu pro RP-HPLC peptidů vzniklých z jednoho proteinu.



Peptidy byly separovány na analytické koloně NanoEaseTM 75 mm x 150 mm se stacionární fází AtlantisTM dC₁₈, 3 mm (Waters, Milford, MA, USA). CapLC systém byl on-line spojen s ESI-QTOF hmotnostním spektrometrem UltimaTM API (Micromass, Manchester, Velká Británie). Přístroj se sestává z kvadrupólového analyzátoru, kolizní cely, která umožňuje CID fragmentaci, a ortogonálně připojeného analyzátoru doby letu TOF. Toto uspořádání umožňuje vysoce selektivní fragmentaci peptidů a měření jejich fragmentů v rozmezí m/z 50-4000 s velmi vysokou přesností a s vysokým rozlišením.

Na začátku každého dne, kdy probíhalo měření vzorků, bylo nutné přístroj vyladit pro maximální citlivost, rozlišení a správně nakalibrovat pro minimální odchylku měření. K tomuto účelu byl použit 100 fmol roztok lidského [Glu¹]-fibrinopeptidu B v 50% methanolu a 1% kyselině octové. Tento peptid je při ESI ionizován dvěma protony, a tudíž je v MS spektru pozorovatelný jeho pík o m/z 785,835 [(M+2H⁺)/2]. V optimálním případě vyvolal průtok 300 nl/min tohoto roztoku při 2,4 s trvajícím skenu 500 dopadů/sken. Kalibrace byla prováděna na známé ionty, které vznikají při CID fragmentaci [Glu¹]-fibrinopeptidu B.

Následně byly nastaveny a uloženy parametry hmotnostního spektrometru pro DDA analýzu. Tento typ analýzy je založen na ovládní hmotnostního spektrometru

právě měřenými výsledky. Data byla měřena v pozitivním módu ve 4 kanálech. Měření začalo 5 min po nástřiku vzorku a skončilo po 40 min. Tento časový interval koreloval s efektivní separací na RP-HPLC. Kanál 1: MS TOF sloužil k zaznamenávání MS spekter. V každé sekundě s prodlevou 0,1 s bylo získáno spektrum peptidů, které byly právě eluovány z kolony a on-line přicházely ESI zdrojem do hmotnostního spektrometru. MS spektra byla měřena v rozmezí hodnot m/z 400-1600. Při detekci peptidu v MS spektrech měřených v kanálu 1: MS TOF software zjistí, zda-li splňuje kritéria pro prekurzorový peptid určený k fragmentaci: peptid musí být vícekrát nabitý (2^+ , 3^+ nebo 4^+) a intenzita vícekrát nabitého peptidu musí přesáhnout 35 dopadů/sken. Při splnění zadaných podmínek software změní nastavení hmotnostního spektrometru na MSMS mód, kdy dojde k izolaci prekurzorového peptidu na prvním kvadrupólu, jeho CID fragmentaci v kolizní cele a změření vzniklých fragmentů v TOF analyzátoru. Hmotnostní spektrum fragmentů je pak měřeno v kanále 2: MSMS TOF. Při detekci několika peptidů v kanále 1: MS-TOF jsou vybrány tři nejvíce intenzivní peptidy, které splňují kritéria zadaná pro prekurzorový peptid určený k fragmentaci, a fragmentační spektra z těchto peptidů jsou měřena v kanálech 2-4: MSMS TOF. Fragmentační spektra se zaznamenávala v rozsahu m/z 50-1600 vždy po dobu 1,0 s s prodlevou 0,1 s. Fragmentace peptidů byla ukončena, jestliže intenzita nejvyššího píku v MSMS spektru klesla pod 8 dopadů/s nebo po uplynutí doby 5,0 s. Aby nebyl stejný peptid vybrán pro fragmentaci v MSMS módu vícekrát po dobu jeho eluce, byla jeho m/z po dobu 120 s vyloučena z MSMS analýzy. Intenzita kolizní energie použité při CID fragmentaci byla automaticky softwarem nastavena podle vzorce, který zohledňoval náboj peptidů (2^+ , 3^+ nebo 4^+) a m/z peptidů. Jestliže dojde k naplnění hodnot pro ukončení měření v MSMS módu, software znovu změní nastavení hmotnostního spektrometru pro MS mód a peptidy jsou měřeny opět v kanálu 1: MS TOF. Toto nastavení DDA analýzy spolu se separací HPLC systému bylo testováno pomocí standardní směsi peptidů, která vznikla po trypsinovém štěpení kvasinkové enolázy. Měření probíhalo po nástřiku 100 fmol v 1 μ l vzorku. Po úpravě a vyhodnocení naměřených dat v softwaru PLGS 2.0. (Waters, Milford, MA, USA) s použitím aktuální proteinové databáze NCBIInr byl posuzován počet správně přiřazených fragmentačních spekter k proteolytickým peptidům kvasinkové enolázy. V optimální případě došlo k správnému přiřazení 10 fragmentačních spekter.

Každá směs peptidů byla měřena v DDA módu, který byl popsán výše. Po změření byl celý soubor dat automaticky upraven v softwaru PLGS 2.0. Nejprve byla upravena základní linie spekter, následně bylo provedeno vyhlazení spekter dle metody Savitzky-Golay na tři kanály a deizotopizace spekter na 4 kanály při vrcholu píku v 80 % jeho výšky. Z každého vzorku byl tímto způsobem získán soubor upravených MSMS spekter, kdy každé spektrum vzniklo fragmentací jednoho prekurzorového peptidu a je představováno seznamem monoizotopických hodnot m/z přítomných fragmentů. K vlastní identifikaci proteinů z naměřených HPLC/ESI-QTOF MSMS spekter byla použita proteinová databáze *F. tularensis* SCHU S4 nebo později NCBI nr verze 20060131, která vznikla přeložením genomů do sekvence aminokyselin a zahrnuje m/z teoretických proteolytických peptidů a m/z teoretických fragmentů peptidů. Pro porovnávání naměřených hodnot s teoreticky vypočítanými hodnotami bylo použito nastavení a parametry uvedené v tabulce 3.

Tabulka 3. Parametry nastavené pro porovnávání hodnot naměřených na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF s proteinovými databázemi.

Parametr:	Zvolené nastavení
Databáze	F. tularensis SCHU S4 NCBI nr verze 20060131
Taxonomie	Francisella tularensis
MW a pI proteinů	Bez omezení
Maximální odchylka m/z prekurzorového peptidu	50 ppm
Maximální odchylka m/z fragmentů	0,1 Da
Minimální počet fragmentovaných peptidů pro identifikaci proteinu	1
Použitá proteáza	Trypsin
Možná nerozštěpená místa	1
Modifikace peptidů	Pevná modifikace cysteinů amidem kyseliny 2-jodoctové vedoucí ke karbamidomethylaci Fakultativní oxidace methioninu

	Fakultativní tvorba pyroglutamátu na N-koncovém glutaminu
	Fakultativní acetylace na N-konci proteinu

4.3.5 Analýza vybraných proteinů pomocí 2D-Western blotu

Pro ověření změn v produkci jednotlivých izoform proteinu IglC u proteomické analýzy odpovědi bakterie na nedostatek železa v prostředí byl použit Western blot. Tato metoda je založena na specifické reakci určitého proteinu s monoklonální protilátkou s následnou detekcí vazby antigen-protilátka. Toto uspořádání umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu vybraného proteinu.

Nejprve byly připraveny 2D-PAGE gely s nanáškou 100 µg proteinu podle postupu popsáném v kapitole 4.3.2. Z důvodu maximálního zachytu izoform proteinů byly z kontrolního a stresovaného vzorku připraveny gely s použitím IPG proužků o rozmezí pH 4-7 a 6-11. Kvůli úspoře protilátky byly 2D-PAGE gely seříznuty a analyzovány byly jen pruhy v rozmezí MW 10-35 kDa. Gely byly vloženy do transferového pufru o složení 25 mM Tris-báze, 190 mM glycin a 20 % methanolu. Přenos proteinů z gelu na PVDF membránu byl proveden přes noc pod konstantním napětím 30 V a proudem 0,1 mA a následně 60 min při 60 V a 0,3 mA. Membrána byla 10 min promývána v TBS pufru obsahujícím 20 mM Tris-báze, 137 mM NaCl pH 7,6 a následně hodinu inkubována v blokačním pufru složeném z TBS pufru, 5 % mléka a 0,05 % Tween 20. Inkubace s myší monoklonální protilátkou proti IglC proteinu (Moravian Biotechnology, Brno, Česká republika) probíhala v blokačním pufru 100 min při pokojové teplotě. Následně byla PVDF membrána vložena do hybridizéru, kde byla při 30 °C promyta v 0,05 % Tween 20 v TBS pufru, v blokačním pufru a nakonec 45 min inkubována v blokačním roztoku se sekundární kozí protilátkou proti myšimu imunoglobulinu s navázanou peroxidázou (Dako, Kodaň, Dánsko). Na závěr byla membrána promyta v 0,05% Tween 20 v TBS pufru a v TBS pufru.

Membrána byla na 1 min vložena do roztoku chemiluminiscenčního kitu (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) připraveného podle instrukcí výrobce obsahující peroxid vodíku a luminol. Membrána byla vložena do fólie a složena s filmem CL-XPosure (Pierce, Rockfold, IL, USA), který byl následně vyvolán ve vývojce FOMA DP (Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká republika) a ustálen

v ustalovači Fomax (Foma Bohemia).

4.4 „Shotgun“ proteomika

Modernější přístup označovaný jako „shotgun“ proteomika v drtivé většině sdružuje dvojdimenzionální separaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s identifikací proteinů z fragmentačních spekter peptidů měřených na tandemových hmotnostních spektrometrech. Stejně technologie byly použity během analýzy odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS na změnu teploty prostředí a na stacionární fázi růstu. Pro komparativní studii bylo však nutné k těmto technologiím ještě připojit jednu z dostupných kvantifikačních metod. Proto byla na Ústavu molekulární patologie FVZ UO v Hradci Králové vyzkoušena a optimalizována kvantitační technika nazývaná iTRAQ.

4.4.1 Testování iTRAQ metody na standardní směsi 6 proteinů

iTRAQ technika byla nejprve ověřena na standardní směsi 6 proteinů (bovinní sérový albumin, β -galaktosidáza, α -laktalbumin, β -laktglobulin, lysozym a apotransferin) dodané v rámci vývojového iTRAQ kitu (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Rozpouštění, redukce disulfidických můstků v prostředí tris(2-karboxyethyl)fosfin hydrochloridu (TCEP) a modifikace volných sulfhydrylových skupin pomocí methylmethanthiosulfonátu (MMTS), štěpení proteinů a iTRAQ derivatizace vzniklých peptidů byly provedeny podle instrukcí výrobce. Následně byla směs derivatizovaných peptidů rozdělena pomocí RP-HPLC a on-line analyzována na tandemovém hmotnostním spektrometru QTOF obdobně, jak bylo popsáno v kapitole 4.3.4.5. Uspořádání tohoto hmotnostního spektrometru dovoluje měřit fragmentační spektra již od nízkých m/z . Tato vlastnost je velmi důležitá, jelikož iTRAQ reportérové ionty, nezbytné pro vlastní kvantifikaci, vykazují m/z 114, 115, 116 a 117. Pro podpoření tvorby fragmentů o nízkých m/z muselo být pozměněno nastavení parametrů Gain a Offset hmotnostního spektrometru. K identifikaci proteinů byl použit program Phenyx 2.1 (GeneBio, Ženeva, Švýcarsko), který dokáže ve fragmentačních spektrech detekovat hodnoty reportérových iontů a exportovat je pro následné vyhodnocení. Pro porovnávání naměřených hodnot s teoreticky vypočítanými hodnotami uloženými v proteinové databázi NCBIInr bylo použito nastavení a parametry uvedené v tabulce 4.

Tabulka 4. Parametry nastavené pro porovnávání hodnot naměřených na hmotnostním spektrometru QTOF s proteinovými databázemi.

Parametr	Zvolené nastavení	
Databáze	Aktuální verze NCBIInr	
Taxonomie	Eukaryota	
Model skórování	ESI-QTOF	
Náboj parentních peptidů	2 ⁺ , 3 ⁺	
	První kolo prohledávání	Druhé kolo prohledávání
Modifikace peptidů	iTRAQ modifikace N-koncových aminoskupin a aminoskupin lysinu	iTRAQ modifikace N-koncových aminoskupin a aminoskupin lysinu
	Modifikace všech cysteinů MMTS	Modifikace všech cysteinů MMTS
	Fakultativní oxidace methioninu nejvýše u dvou případů na peptid	Fakultativní oxidace methioninu nejvýše u tří případů na peptid
Použitá proteáza	Trypsin	Trypsin
Možná nerozštěpená místa	1, standardní způsob štěpení	1, povoleno nespecifické štěpení
Maximální odchylka <i>m/z</i> parentního peptidu	0,08 Da	0,08 Da
Prahové hodnoty pro peptid	Délka peptidu minimálně 6 aminokyselin	Délka peptidu minimálně 6 aminokyselin
	Skóre minimálně 6,0	Skóre minimálně 5,0
	p-hodnota nižší než 1,0x10 ⁻⁶	p-hodnota nižší než 1,0x10 ⁻⁵
Minimální skóre proteinu	6,0	6,0
Řešení konfliktů	Bez řešení	Povoleno

4.4.2 Zpracování vzorku pro kvantitativní „shotgun“ analýzu

Bakteriální buňky byly po ukončení kultivace promyty v PBS a centrifugovány. Pelet byl resuspendován v 0,3 % roztoku SDS a suspenze následně inkubována 3 minuty ve vařící vodní lázni. Nerozpuštěné součásti bakteriálních buněk byly centrifugovány a v odebraném supernatantu byla stanovena koncentrace bílkoviny

pomocí BCA kitu, jak je popsáno v kapitole 4.3.4.2. Objemy vzorků odpovídající 100 µg proteinu byly 10x naředěny 0,5 M triethylamonium bikarbonátovým pufrem pH 8,5 a zakoncentrován pomocí centrifugačních ultrafiltrů Microcon MWCO 3000 (Millipore, Bedford, MA USA) na objem 40 µl. Tím bylo také dosaženo snížení zastoupení SDS, který je ve vyšších koncentracích nekompatibilní s RP-HPLC, na 0,03 % ve vzorku. Disulfidické můstky proteinů byly rozrušeny reakcí s 2 µl 50 mM TCEP, která probíhala 60 min při 60 °C. Vzniklé volné thiolové funkční skupiny byly modifikovány 1 µl 200 mM MMTS 30 min při 25 °C. Následně byl ke vzorkům přidán trypsin v poměru 1:50 a vzorek byl přes noc inkubován při 37 °C za stálého míchání v termomixéru. Druhý den byly vzorky zakoncentrovány ve vakuové centrifuze na objem 20 µl. K peptidům vzniklým proteolytickým štěpením proteinů byly přidány roztoky iTRAQ značek v 70 µl absolutním ethanolu dle tabulky 5. Reakce probíhala při pokojové teplotě hodinu.

Tabulka 5. Schéma značení 4 vzorků různými iTRAQ značkami.

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

Následně byl ke každému vzorku přidán nadbytek vody, který vyvolal hydrolyzu nezreagovaných iTRAQ značek. Značené peptidy pocházející ze čtyř vzorků byly ekvimolárně smíchány a vysušeny ve vakuové centrifuze. Poté byly peptidy rozpuštěny ve 100 µl mobilní fáze A pro SCX chromatografii obsahující 50 mM dihydrogenfosforečnanu draselného pH 3,0 ve vodě.

4.4.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

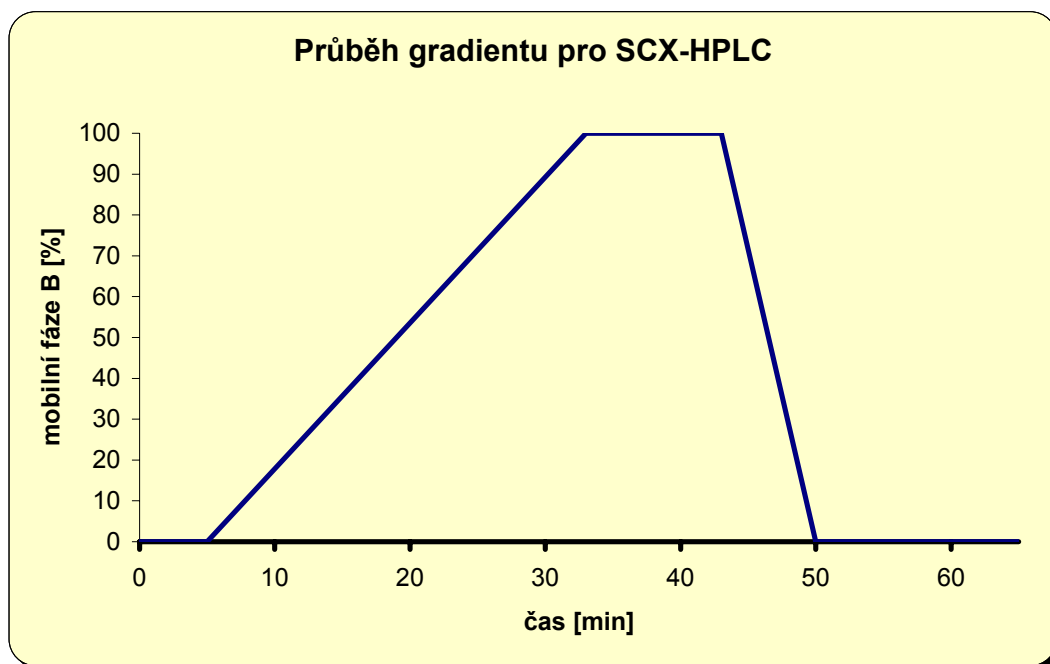
Po trypsinovém štěpení vzniká z jednoho proteinu v závislosti na jeho délce až několik desítek peptidů. Ve výsledné směsi vzniklé štěpením celobuněčného lyzátu pak mohou být přítomny až desítky tisíc proteolytických peptidů. V případě tak komplexního vzorku je velmi výhodné použít některou z MudPIT technologií. V našem

případě byla nejprve provedena prefrakcionace pomocí SCX chromatografie. Frakce odebírané v minutových intervalech byly následně separovány pomocí RP-HPLC a analyzovány na tandemovém hmotnostním spektrometru QTOF.

4.4.3.1 SCX chromatografie peptidů

Pro SCX-HPLC byla směs peptidů rozpuštěna ve 100 μ l mobilní fáze A a přímo nastříknuta na kolonu PolySulfoethyl A o vnitřním průměru 2,1 mm a délce 100 mm, se stacionární fází 5 μ m a póry 300 Å (The Nest Group, Southborough, MA, USA) HPLC systému Alliance (Waters, Milford, MA, USA). Peptidy byly z kolony vymývány elučním gradientem tvořeným mobilní fází A a mobilní fází B (50 mM dihydrogenfosforečnanu draselný, 250 mM chloridu draselného ve 25 % acetonitrilu pH 5,5). Peptidy zachycené na koloně byly 5 min promývány mobilní fází A a během následujících 20 min eluovány kontinuálně se zvyšujícím zastoupením mobilní fáze B v gradientu (Obr. 8).

Obrázek 8. Průběh zastoupení mobilní fáze B v gradientu pro SCX-HPLC peptidů vzniklých z komplexní proteinové směsi.



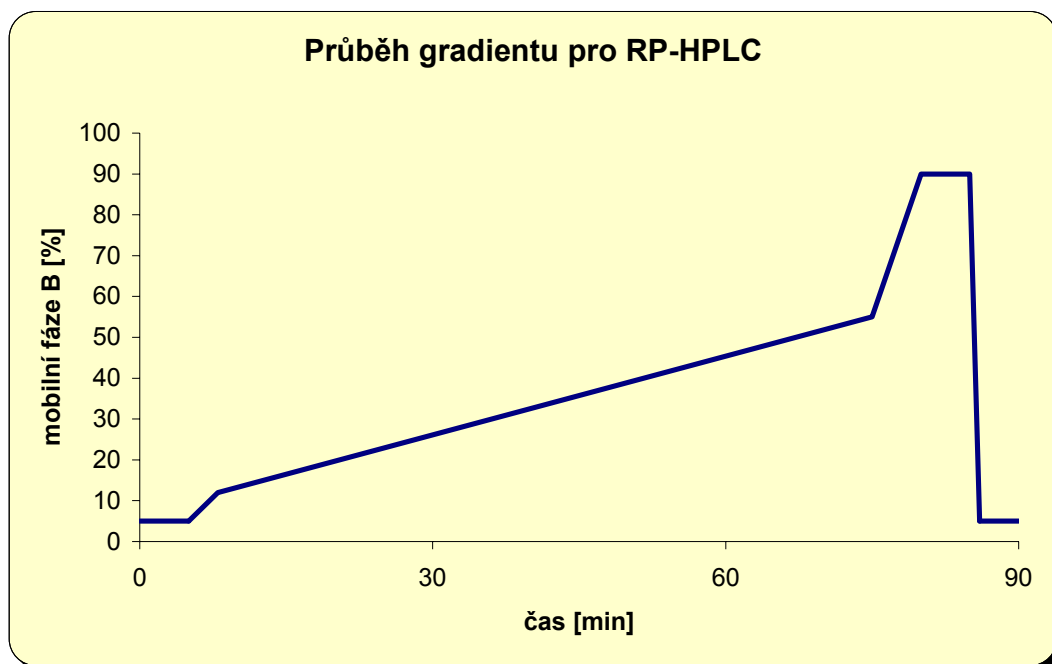
K monitorování průběhu SCX-HPLC byl použit UV detektor nastavený pro

měření absorbance při vlnové délce 215 nm. Od 7. min do konce 33. min byly do připravených mikrozkušavek odebírány minutové frakce. Celkem bylo nasbíráno 28 frakcí, které byly zakoncentrovány a jednotlivě separovány a analyzovány na RP-HPLC systému on-line propojeným s hmotnostním spektrometrem QTOF.

4.4.3.2 RP chromatografie peptidů

Minutové frakce odebírané v průběhu SCX-HPLC byly vysušeny ve vakuové centrifuze a získané peptidy rozpuštěny v 50 μ l mobilní fáze A pro RP-HPLC. Vlastní chromatografie pak probíhala s výjimkou délky a průběhu gradientu ve stejném uspořádání, jak je uvedeno v kapitole 4.3.4.4. Jelikož se i v minutových SCX frakcích vyskytovalo velké množství peptidů, byl použit dlouhý eluční gradient. Eluční gradient byl tvořen mobilní fází A a mobilní fází B při průtoku 300 nl/min. Od 5. min do 8. min došlo k nárůstu zastoupení mobilní fáze B v gradientu z původních 5 % na 12 % a dále se kontinuálně zvyšovalo až k 55 % v 75. min (Obr. 9).

Obrázek 9. Průběh zastoupení mobilní fáze B v gradientu pro RP-HPLC peptidů z minutových SCX-HPLC frakcí.



4.4.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Podobně jak bylo popsáno v kapitole 4.3.4.4, byl před vlastní měření hmotnostní spektrometr vyladěn a jeho nastavení ověřeno pomocí 100 fmol roztoku lidského [Glu¹]-fibrinopeptidu B v 50 % methanolu a 1 % kyseliny octové. Následně byly nastaveny a uloženy parametry hmotnostního spektrometru pro DDA analýzu iTRAQ modifikovaných peptidů, kdy je pro přesnost kvantifikace nutné obdržet reportérové ionty minimálně o intenzitě 20 dopadů/sken. Proto byly pro fragmentaci vybrány pouze peptidy, jejichž intenzita v MS spektrech překročila 75 dopadů/sken. Měření začalo 5 min po nástřiku vzorku a skončilo po 80 min. Tento časový interval koreloval s efektivní separací RP-HPLC. Každých 0,7 s s prodlevou 0,1 s bylo získáno MS spektrum peptidů, které byly eluovány z kolony a on-line vstupovaly ESI zdrojem do dalších oddílů hmotnostního spektrometru. Spektra byla měřena v rozmezí hodnot m/z 400-1600 a takto zaznamenávána v kanálu 1: MS TOF. Fragmentační spektra peptidů byla měřena v kanálech 2-4: MSMS TOF v rozsahu m/z 50-1600 vždy po dobu 0,7 s s prodlevou 0,1 s. Fragmentace peptidů byla ukončena, jestliže intenzita nejvyššího píku v MSMS spektru klesla pod 15 dopadů/sken nebo po uplynutí doby 3,5 s. Aby nebyl stejný peptid vybrán pro fragmentaci v MSMS módu vícekrát po dobu jeho eluce, byla jeho m/z po dobu 240 s vyloučena s MSMS analýzy. Intenzita kolizní energie použité při CID fragmentaci byla automaticky softwarem vybírána podle vzorce, který zohledňoval náboj peptidů (2⁺, 3⁺ nebo 4⁺) a m/z peptidů.

4.4.5 Zpracování a vyhodnocení DDA dat

V současné době je komerčně dostupných několik softwarů pro zpracování a vyhodnocení dat získaných v DDA analýzách. Jen některé z nich však zatím dokáží pracovat s iTRAQ modifikacemi peptidů a exportovat intenzity iTRAQ iontů pro další vyhodnocení. Proto musel být u kvantitativní „shotgun“ analýzy *F. tularensis* kombinovány softwary od dvou různých výrobců. Po změření každé frakce byla naměřená surová data nejprve upravena pomocí nástroje Protein Lynx softwaru Mass Lynx 4.0 (Waters, Milford, MA, USA). Byla přizpůsobena základní linie spekter, následně bylo provedeno vyhlazení spekter dle metody Savitzky-Golay na tři kanály a deizotopizace spekter pomocí čtyř kanálů při vrcholu píku v 80% jeho výšky. Z každé změřené SCX frakce byl tímto způsobem získán jeden soubor ve formátu .pkl, ve

kterém jsou shromážděny m/z a intenzity iontů ze všech naměřených fragmentačních spekter. Tyto hodnoty jsou řazeny postupně a vždy jsou nejprve uvedeny řádkem, charakterizujícím parentní iont (m/z , intenzita a náboj).

K vlastnímu vyhodnocení upravených spekter, tzn. porovnání s proteinovou databází a exportu intenzit reportérových iontů, byl použit program Phenyx 2.1. (GeneBio, Ženeva, Švýcarsko). Byla použita proteinová databáze NCBIInr a pro její omezení byla položka taxonomie nastaven na možnost „other Bacteria“. Pro porovnávání naměřených hodnot s teoreticky vypočítanými hodnotami fragmentačních iontů bylo použito pouze jedno kolo prohledávání s nastavením uvedeným v tabulce 6.

Tabulka 6. Parametry použité pro identifikaci proteinů v programu Phenyx.

Parametr	Zvolené nastavení
Databáze	NCBIInr (r. 20070111)
Taxonomie	„other Bacteria“
Model skórování	ESI-QTOF
Náboj parentních peptidů	2 ⁺ , 3 ⁺
Modifikace peptidů	iTRAQ modifikace N-koncových aminoskupin a aminoskupin lysinu
	Pevná modifikace všech cysteinů MMTS
	Fakultativní oxidace methioninu nejvýše u tří případů na peptid
Použitá proteáza	Trypsin
Možná nerozštěpená místa	1, standardní způsob štěpení
Maximální odchylka m/z parentního peptidu	0,08 Da
Prahové hodnoty pro peptid	Délka peptidu minimálně 6 aminokyselin
	z-skóre minimálně 5,0
	p-hodnota nižší než $1,0 \times 10^{-5}$
Minimální skóre proteinu	6,0
Řešení konfliktů	Povoleno

Program Phenyx ve výsledcích označil spektra, u kterých došlo k přiřazení sekvence, ale hranice pro přijetí identifikace za správnou nebyly naplněny. Dále označil

spektra, ke kterým byly přiřazeny dvě nebo více sekvencí. Takové výstupy byly manuálně hodnoceny na základě z-skóre, kvality fragmentačního spektra a předpovězené identifikace. Podle těchto kritérií bylo rozhodnuto o zařazení přiřazené sekvence do konečného seznamu správně identifikovaných proteinů.

Konečné výsledky byly exportovány do tabulky .xls, která obsahovala kromě údajů o identifikovaných proteinech a jejich peptidech také intenzity iTRAQ reportérových iontů extrahovaných z fragmentačních spekter s odchylkou 0,2 Da. Jelikož iTRAQ značky jsou produkovány vždy s určitým zastoupením nečistot, některá značka může přispívat k intenzitě reportérového iontu vzniklého z jiné iTRAQ značky. Ke každé dodané šarži je proto přiložen dokument o analýze čistoty, který uvádí procentuální příspěvky jednotlivých iTRAQ značek k jiným reportérovým iontům. Na základě těchto údajů je nutné hodnoty nejprve přepočítat.

4.5 Statistické vyhodnocení kvantitativních dat

Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.3.3 statistické vyhodnocení kvantitativních dat získaných z 2D-PAGE analýzy probíhalo přímo v programu PDQuest, v němž je zainkorporován Studentův *t*-test. Pro výběr skvrn, jejichž intenzita se měnila v závislosti na stresových podmínkách, musel být jejich kvantitativní rozdíl statisticky významný na hladině $p < 0.01$.

Vzhledem k velkému množství dat, které bylo vyprodukováno pomocí „shotgun“ přístupu, bylo nejprve přistoupeno k provedení explorativních statistických analýz. Teprve následně byly u vybraných proteinů provedeny konfirmatorní analýzy. Všechny statistické analýzy byly provedeny v programu STATISTICA cz verze 7.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA a StatSoft ČR, Praha, České republiky).

Po úpravě intenzit (*I*) korekčními faktory byly vypočítány jejich relativní změny vztažené na údaje pocházející z kontrolní bakteriální suspenze rostoucí při 37 °C a sklizené po 5 h kultivaci. Jestliže v histogramu četností nebylo maximum pozorovaných poměrů rovno 1,0, byly původní intenzity normalizovány (I_N). Tento krok sloužil k odstranění rozdílů, které mohly vzniknout v průběhu přípravy vzorků. Pro vlastní statistické analýzy byla data relativizována na součet intenzit iTRAQ iontů v jednom MSMS spektru. Relativní normalizované intenzity (I_{RN}) každého peptidu byly vypočítány dle vzorce $I_{RN114} = \frac{\sum (I_{114-117})}{I_{114}}$, a stejně pro ionty 115, 116 a 117.

Metoda iTRAQ je velmi přesná a reprodukovatelná v širokém rozsahu intenzit. Při nízkých intenzitách iTRAQ iontů je však často pozorována vyšší variabilita. Pro vyloučení odlehlých hodnot byla použita manuální kontrola pomocí dvou skupin bodových grafů. Pro jednu skupinu grafů byly použity normalizované hodnoty I_N , v druhé skupině byly použity relativní normalizované hodnoty (I_{RN}). Tyto grafy dokonale odhalily odlehlé hodnoty. Do statistické analýzy byly po vyloučení odlehlých hodnot vzaty pouze proteiny, které poskytly kvantitativní hodnoty z minimálně tří iTRAQ iontů.

Průměry relativních normalizovaných intenzit (I_{RN}) pro jednotlivé proteiny byly vstupními daty pro hierarchické shlukování. Pravidlo slučování bylo nastaveno na *úplné spojení* a míra vzdálenosti na *Euklidovské vzdálenosti*. Výsledkem hierarchického shlukování byl dendrogram, jenž odhalil podobnosti proteinů na základě jejich produkce v různých podmínkách. Další použitou explorativní analýzou bylo shlukování pomocí *k*-průměrů. Počet shluků byl nastaven na 5 a počet interakcí na 10. Tato analýza roztřídila proteiny na základě podobnosti jejich produkce do skupin, jejichž počet byl na základě dendrogramu stanoven na 5.

Pro kvantitativní analýzy byl k potvrzení rozdílů v produkci proteinů použit Studentův *t*-test na hladině významnosti 0,05.

5 VÝSLEDKY

5.1 Kultivační systém pro proteomické analýzy *F. tularensis*

Kvantitativní proteomická analýza vyžaduje, aby byl biologický materiál připravený za maximálně shodných podmínek. Tím lze zabezpečit, že při opakování experimentu bude dosaženo vždy stejného výsledného proteomu. Tato kritéria nesplňuje kultivace bakteriálního kmene na pevných půdách z důvodu špatné kontroly růstu bakteriální populace. Toto může vyústit ve sklizeň bakterií v odlišné fázi růstu, a tím výraznou variabilitu mezi vzorky. Z tohoto důvodu byla připravena a otestována tekutá půda, jejíž použití dovoluje monitorovat průběh kultivace turbidimetrickým měřením. V případě potřeby přesnějšího obrazu kultivace je možné použít výsev CFU.

V dostupné odborné literatuře byly vyhledány dva typy tekutých půd používané ke kultivaci kmenů *F. tularensis*. Půda připravená dle Mueller-Hintona je komplexní bakteriální půda, u které nelze zcela přesně charakterizovat její složení. Tento faktor by mohl být kritický při navození reakcí na chemické stresové faktory. Proto bylo přistoupeno k přípravě chemicky definovaného média dle Chamberlaina. Definované složení tohoto média je zárukou shodných podmínek kultivace a navíc umožňuje provádět jemné změny jednotlivých složek pro navození stresových odpovědí.

Kontrola růstu pomocí CFU byla provedena pouze u analýzy odpovědi bakterie *F. tularensis* na oxidativní stres. Při opakované snaze provést stanovení CFU byla totiž zjištěna vysoká variabilita počtu narostlých kolonií. Z tohoto důvodu a důvodu manuální i časové náročnosti se tato metoda neosvědčila a k prostému monitorování růstu bylo v dalších experimentech používáno výhradně turbidimetrického stanovení O.D._{600 nm}.

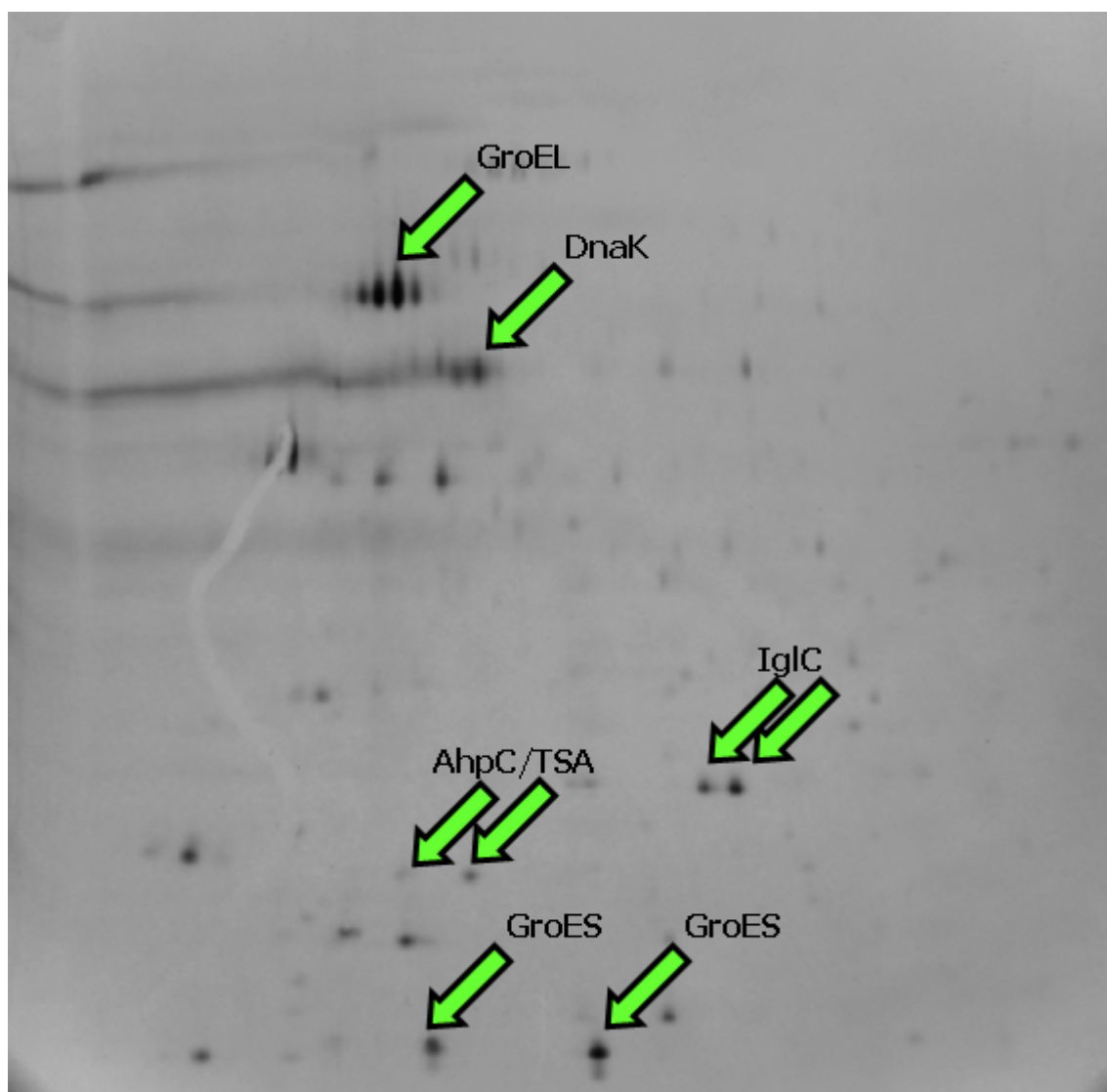
5.2 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS na prostředí hostitele

Pro proteomovou analýzu intracelulárně proliferujících bakterií *F. tularensis* byl použit *in vitro* model simulující interakci mikroorganismu s hostitelskými fagocytujícími buňkami. Tento model byl v minulosti zaveden a podrobně charakterizován na Ústavu molekulární patologie FVZ UO. Protože izolovat a purifikovat intracelulárně proliferující bakterie je velmi obtížné, byl využit přístup založený na selektivním zablokování eukaryotní proteosyntézy cykloheximidem. Inkorporací aminokyselin s izotopem síry ³⁵S pak lze radioaktivně značit bakteriální

proteiny, jejichž produkce není cykloheximidem ovlivněna. Tento protokol byl již dříve použit ve studii, která u *F. tularensis* vedla k objevu prvního faktoru virulence [45].

I přes opakovanou snahu se nepodařilo získat dostatečně kvalitní 2D-PAGE proteinovou mapu. Na autoradiografickém filmu, který se nejvíce blížil požadovanému obrazu lze pozorovat pouze několik skvrn (Obr. 10). 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.

Obrázek 10. 2D-PAGE bakteriálních proteinů selektivně značených při pobytu bakterie *F. tularensis* v intracelulárním prostředí buněk linie J774.2.

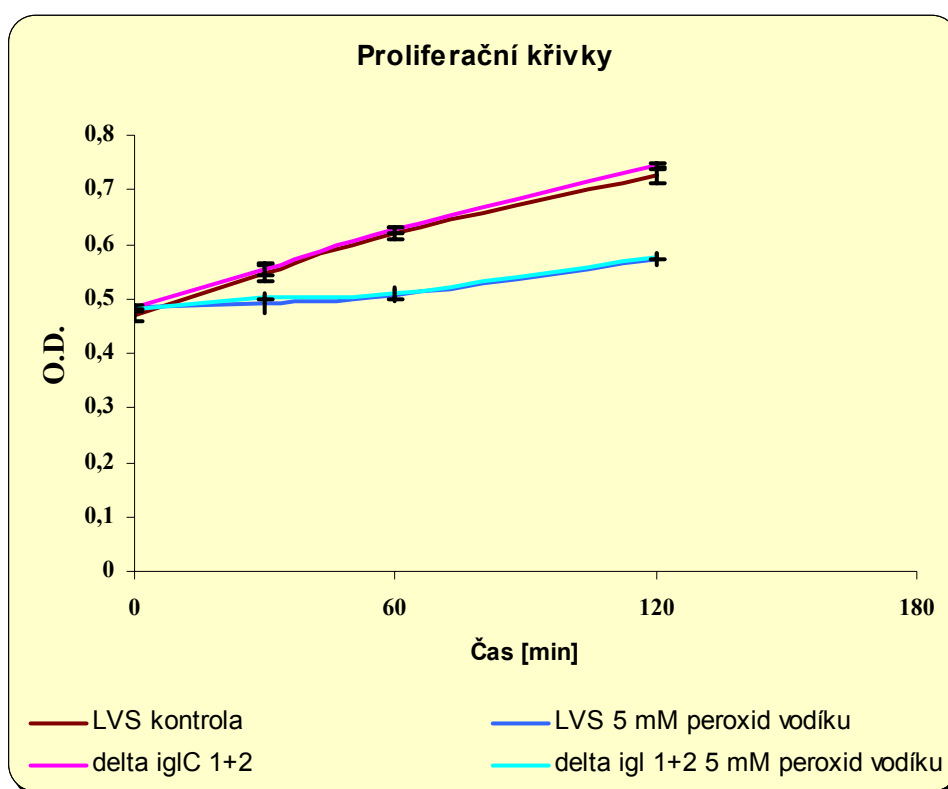


5.3 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS a *F. tularensis* LVS $\Delta iglC1+2$ na oxidativní stres

5.3.1 Růst bakterií

Pro studium odpovědi bakterie *F. tularensis* LVS a od ní alelickou záměnou odvozeného mutantního kmene $\Delta iglC1+2$ [18] na oxidativní stres byly kultury z počátku kultivovány v chemicky definovaném médiu dle Chamberlaina [2]. Po dosažení O.D._{600 nm} přibližně 0,50-0,55 byl pro navození oxidativního stresu do média přidán peroxid vodíku do konečné koncentrace 5 mM. Do kontrolních bakteriálních suspenzí byl přidán stejný objem sterilní destilované vody. Po přidání činidel došlo k poklesu O.D._{600 nm} o přibližně 0,05 jednotky. V časových intervalech 0, 30, 60 a 120 min byla měřena O.D._{600 nm} (Obr. 11).

Obrázek 11. Průběh proliferace divokého a mutantního kmene *F. tularensis* LVS po přidání peroxidu vodíku do kultivačního média.



Kontrolní kultury nadále proliferovaly. U stresovaných kultur došlo k zastavení růstu, který byl v průměru po 60 minutách zvolna obnoven. V časových intervalech 0, 60, 120 a 180 min bylo vyseto CFU. Z důvodu časové náročnosti ředění a inokulace ploten byly zvoleny intervaly s delší prodlevou, které se proto neshodují s intervaly pro měření O.D. Pomocí měření O.D._{600 nm} a stanovení CFU nebyl zaznamenán průkazný rozdíl mezi divokým a mutantním kmenem v citlivosti na působení peroxidu vodíku [199].

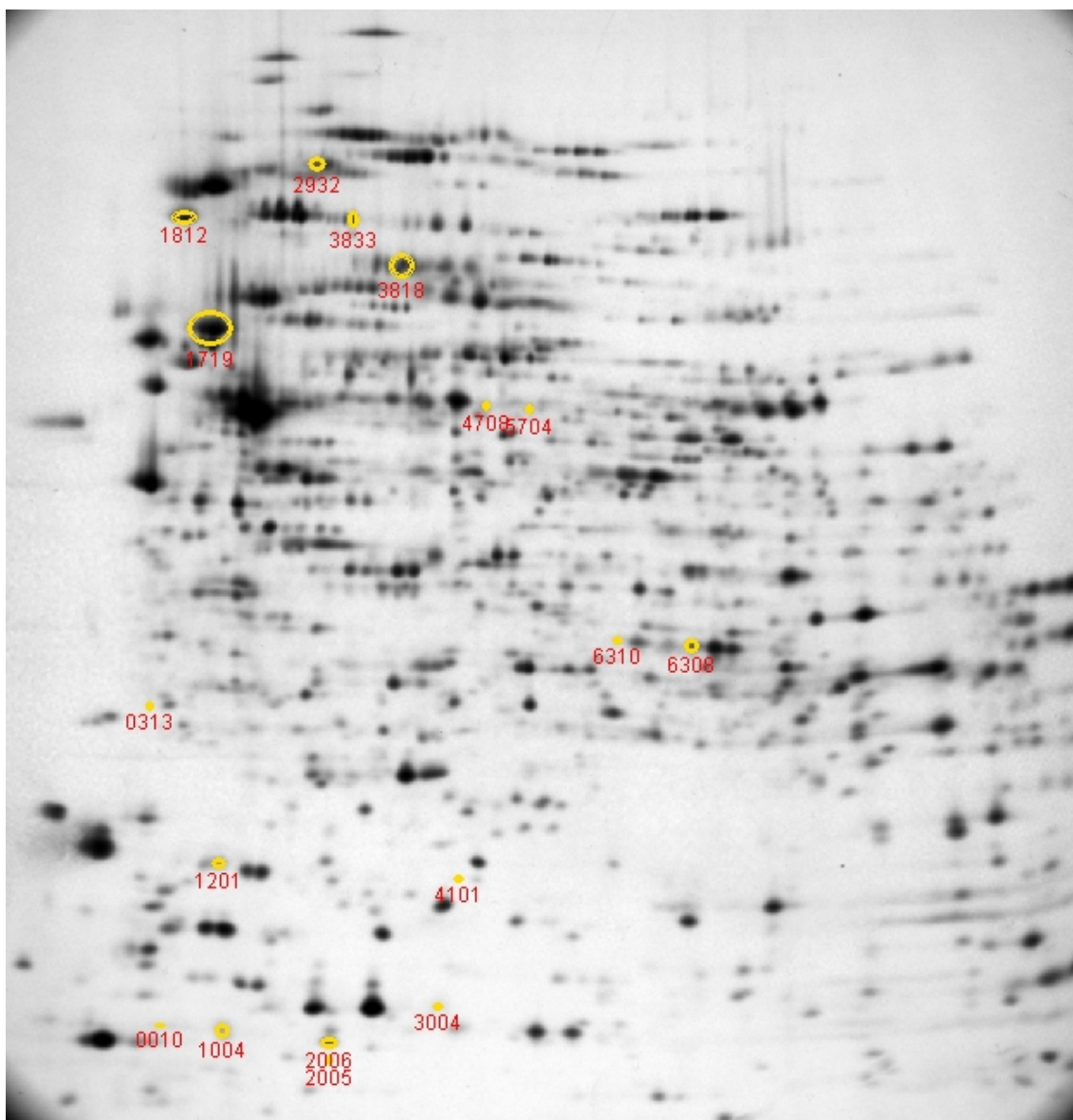
5.3.2 Metabolické značení a 2D-PAGE

V prvních pokusech bylo pro detekci změn vyvolaných oxidativním stresem použito konvenční barvení proteinů pomocí dusičnanu stříbrného. Po několika opakování však bylo zjištěno, že toto barvení není schopno zachytit změny, které se odehrávají 60 min před ukončením kultivace. Jako možné vysvětlení se nabízí, že změny v proteomu jsou zastíněny proteiny, které byly syntetizovány od začátku kultivace probíhající za shodných podmínek. Proto musel být použit systém, který umožní detekovat pouze proteiny syntetizované po přidání peroxidu vodíku do média.

Pro detekci proteinů, které byly syntetizovány až po přidání peroxidu vodíku do kultivačního média, bylo použito metabolické značení proteinů pomocí [³⁵S]-methioninu. Vzorky bakteriálních proteinů obsahující 5x10⁶ dpm byly separovány pomocí 2D-PAGE s použitím IPG proužků o pH gradientu 3-10 NL. Takto získané gely byly následně exponovány na autoradiografické filmy. Digitalizované filmy byly vyhodnoceny v programu PDQuest 7.2.0. Celkem u 19 proteinových skvrn pocházejících z LVS kmene byla pozorována více jak dvakrát vyšší produkce v prostředí 5 mM peroxidu vodíku (Obr. 12). Z tohoto počtu dvě skvrny nebyly nikdy před tím na 2D-PAGE gelech pozorovány [203, 204]. U mutantního kmene *ΔigI*C byla pozorování podobná. U 19 skvrn byla pozorována více jak dvakrát vyšší produkce v prostředí 5mM peroxidu vodíku. Dvě skvrny byly pozorovány pouze u vzorků připravených ze stresovaných bakteriálních kultur. Z porovnání proteinových profilů stresovaných kultur vyplynulo, že intenzity skvrny SSP 3004/4007 pro variantu 9.7/4.9 MW/pI proteinu tepelného šoku a skvrny SSP 6310/6304, která nabyla identifikována, byly specificky zvýšené u divokého kmene. Naproti tomu výhradně u stresovaného delečního mutantu *ΔigI*C byla pozorována zvýšená intenzita neidentifikované skvrny

SSP 7402/708 a skvrny SSP 1007/1004 identifikované jako směs bakterioferitinu a varianty 10,7/5,0 MW/pI proteinu tepelného šoku.

Obrázek 12. Reprezentativní 2D-PAGE proteinů *F. tularensis* LVS provedená pomocí IPG proužku pH 3-10 NL. Proteinové skvrny, jejichž intenzita byla po přidání peroxidu vodíku do kultivačního média zvýšená, jsou označeny svými SSP.



5.3.3 Identifikace proteinů se změnou produkcí v důsledku působení oxidativního stresu pomocí hmotnostní spektrometrie

Proteinové skvrny, jejichž intenzita se měnila v přítomnosti peroxidu vodíku,

byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. U některých případů byla identifikace potvrzena pomocí LC-MS/MS přístupem měřením fragmentačních spekter na tandemovém hmotnostním spektrometru ESI-QTOF. Kromě čtyř skvrn, které nebylo možné spolehlivě přiřadit na preparativních gelech barvených způsoby kompatibilními s následnou identifikací, byly všechny ostatní spolehlivě identifikovány. V případě skvrny SSP 1007 nebo SSP 1004 na příslušné sadě gelů byla nalezena směs dvou různých proteinů. V takovémto případě je těžké rozlišit, s kterým z nich se zvýšená produkce během působení oxidativního stresu pojí. Jelikož ale zvýšená produkce proteinu tepelného šoku byla pozorována ve více variantách stejného proteinu, lze předpokládat že i u skvrny SSP 1007/1004 je vyšší intenzita spojena s tímto proteinem. Hmotnostně spektrometrická analýza vyústila v identifikaci stejných proteinů, což svědčí o přítomnosti izoform. Identifikované proteiny byly rozděleny podle příslušnosti k ortologním funkčním kategoriím COG [205]. Všechny identifikované proteiny byly zařazeny do kategorie O: posttranslační modifikace, obrat proteinů, a chaperony. Proteinové skvrny, které byly jednoznačně identifikovány, jsou v tabulce 7 uspořádány podle příslušnosti k COG kategoriím spolu s vyjádřením změn v jejich produkci.

Tabulka 7. Seznam proteinových skvrn, jejichž intenzita byla po přidání peroxidu vodíku do kultivačního média zvýšená.

SSP	Třída skvrny ^{a)}	Přístupové číslo NCBI	Název proteinu	Teoretické MW / pI	Pozorované MW/pI	Poměr intenzit ^{b)}
3818	*	YP_169404	Heat shock protein 90	72,3 / 5,5	64,1 / 5,7	3,3
1719	*	YP_170601	Chaperone protein, groEL	57,4 / 5,0	60,6 / 5,0	3,7
1812	*	YP_170225	Chaperone protein dnaK (heat shock protein family 70 protein)	69,3 / 4,9	67,4 / 4,9	3,7
3833	*	YP_170660	ClpB protein	95,9 / 5,5	67,2 / 5,6	3,4
2006	*	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	9,4 / 5,4	5,8
2932	*	YP_170660	ClpB protein	95,9 / 5,5	71,1 / 5,5	2,7
1004	*	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	9,5 / 4,9	7,9
7823	*		Skvrna neidentifikována		63,6 / 7,1	NS
6308	*		Skvrna neidentifikována		32,1 / 6,6	2,3
0010	*	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	9,9 / 4,7	12,6
2005	*	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	8,8 / 5,4	7,1
1201	*	YP_169583	AhpC/TSA family protein	19,7 / 5,1	18,0 / 4,9	2,1

5704	*	YP_169703	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit	51,2 / 5,9	52,0 / 6,1	3,7
0313	*	YP_170226	Chaperone protein grpE (heat shock protein family 70 cofactor)	22,1 / 4,8	39,8 / 4,7	5,5
4708	*	YP_169703	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit	51,2 / 5,9	52,4 / 6,0	3,8
3004	+	YP_170678	Heat shock protein	16,7 / 5,6	9,7 / 4,9	2,7
6310	+		Skvrna neidentifikována		32,6 / 6,3	3,8
1009	*	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	9,3 / 4,9	NS
4101	*	YP_169704	ATP-dependent protease peptidase subunit	19,8 / 6,2	16,2 / 5,8	4,5
7402	o		Skvrna neidentifikována		34,9 / 6,6	3,1
1007	o	YP_170379 YP_170678	Hypothetical protein FTT1441 (homologue of bacterioferritin), Heat shock protein	16,8 / 5,3 16,7 / 5,6	10,7 / 5,0	4,5
1608	*	YP_169607	Outer membrane associated protein	41,4 / 5,6	45,1 / 4,9	0,49

a) Proteinové skvrny, které splnily všechna kritéria pro označení skvrn se zvýšenou či sníženou produkcí u obou kmenů, tzn. LVS a mutantního kmene $\Delta iglC1+2$, jsou označeny hvězdičkou (*). Skvrny, takto nalezené jen u kmene LVS, jsou označeny symbolem plus (+), a u kmene $\Delta iglC1+2$ kroužky (o).

b) Ve sloupci jsou uvedeny podíly průměrných normalizovaných intenzit proteinových skvrn získaných z bakteriální kultury exponované peroxidu vodíku a kontrolní kultury. Údaje byly vypočítány pro kmen LVS. U skvrn, které byly pozorovány pouze u stresované bakteriální kultury, je použito označení NS (nová skvrna).

5.3.4 Závěr

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. Pomocí delečního mutantního kmene $\Delta iglC1+2$ byla navíc vyloučena jeho potenciální regulační funkce v této reakci.

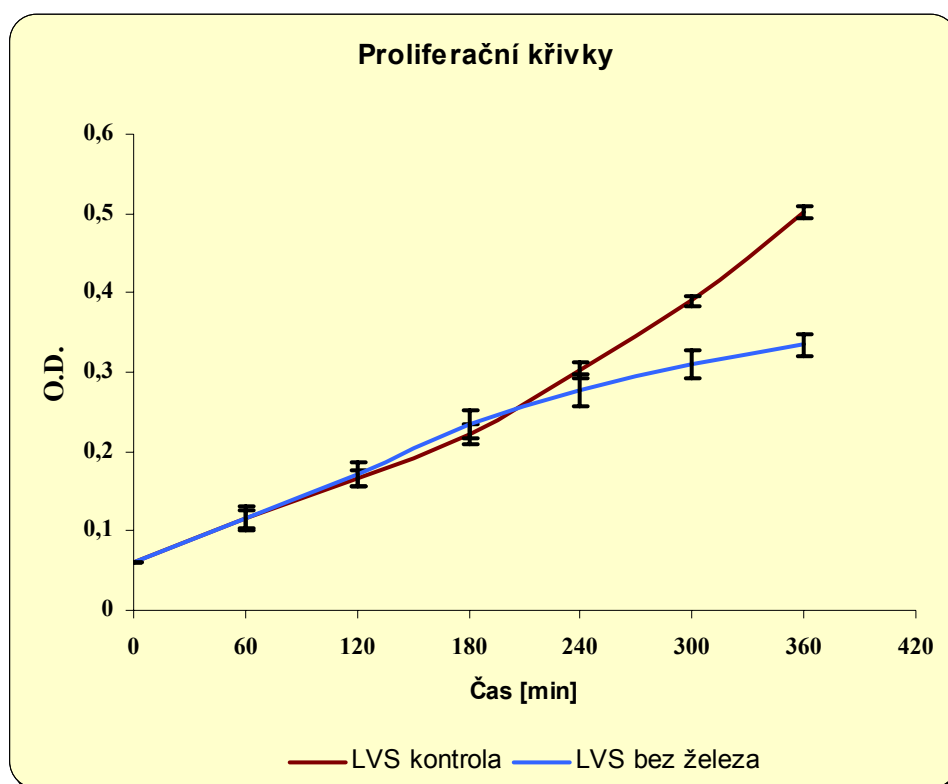
5.4 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* na nedostatek železa

5.4.1 Růst bakterií

Pro vyvolání změn v proteomu *F. tularensis* LVS následkem nedostatku železa

byly bakterie kultivována v chemicky definovaném médiu připraveného dle Chamberlaina [2] bez přidání anorganického zdroje železa a doplněného o deferoxamin mesylát v konečné koncentraci 100 μM . Deferoxamin je vysoce specifický chelátor železa. Jeho přidání zabezpečilo vyvázání sloučenin železa, které se do média dostaly jako nečistoty použitých chemikálií. Na rozdíl od nedávno publikované práce [112] nebylo pro dosažení omezeného růstu nutné bakterie předkultivovat v médiu bez zdroje železa. Rychlost růstu kontrolní a stresované kultury byla přibližně tři hodiny od začátku kultivace shodná. Po této době bakterie rostoucí v médiu bez zdroje železa začaly svůj růst zpomalovat (Obr. 13). Tento jev byl již dříve pozorován u *Helicobacter pylori* [206] a *Neisseria gonorrhoeae* [207] a odpovídá stavu, kdy v prostředí bez železa může bakteriální buňka po určitý čas proliferovat díky intracelulární zásobě železa [108]. Intracelulární zásoby železa by neměly být deferoxaminem ovlivněny díky jeho hydrofilní povaze, která omezuje volnou difúzi buněčnými membránami živých organismů.

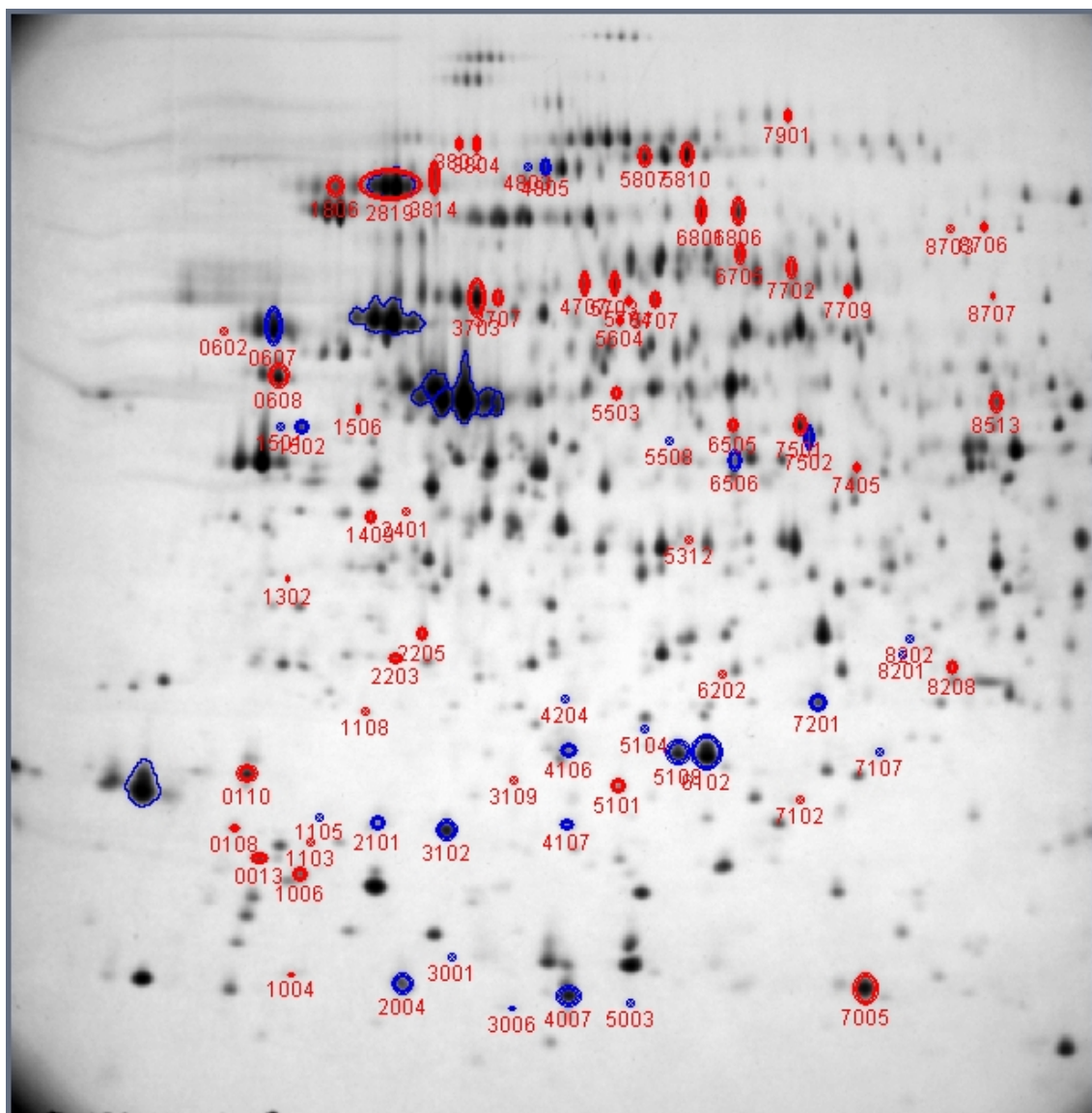
Obrázek 13. Průběh proliferace bakterie *F. tularensis* LVS v médiu bez zdroje železa a v kontrolním médiu.



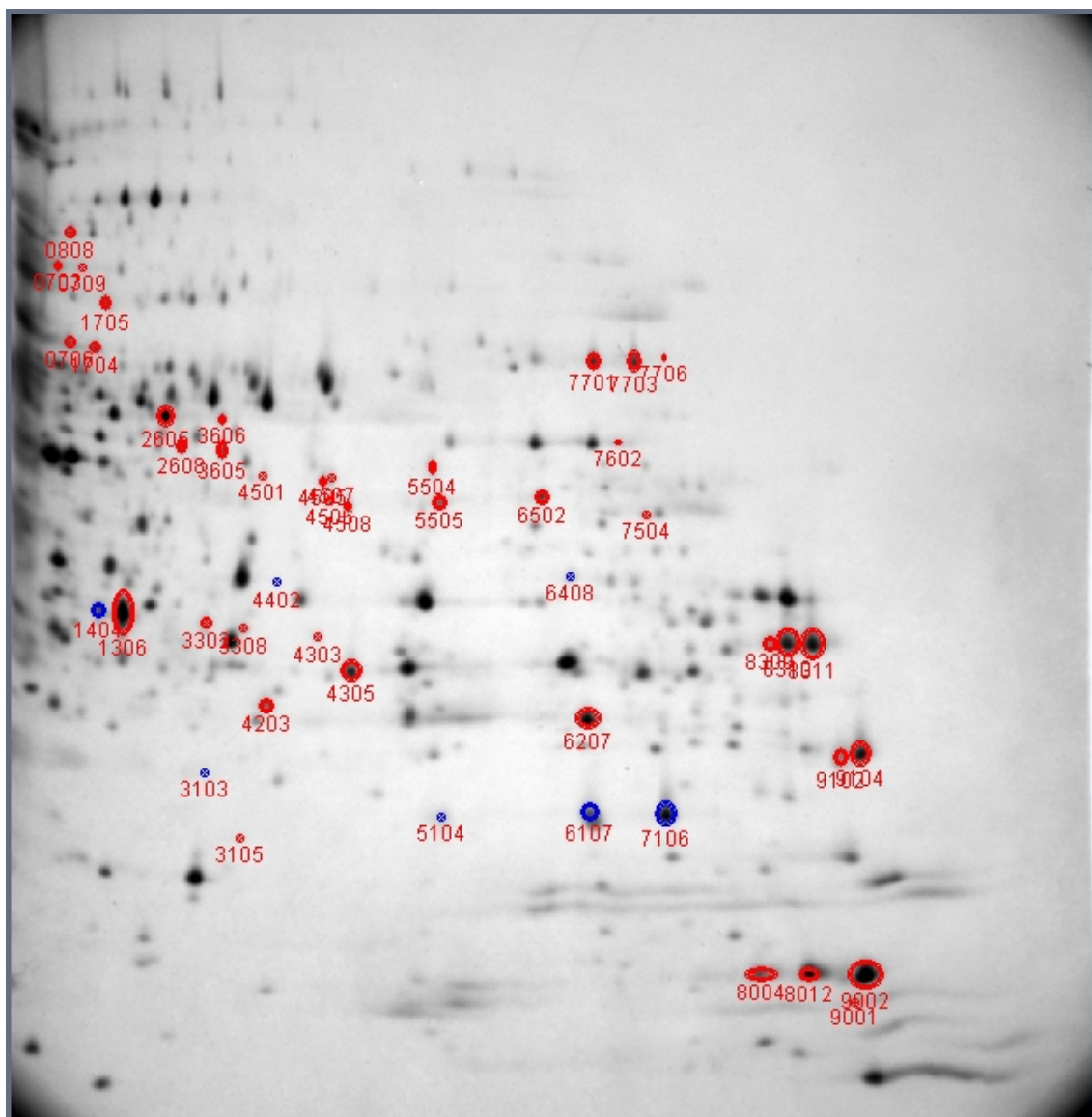
5.4.2 Metabolické značení a 2D-PAGE

Za účelem detekce proteinů, které jsou syntetizovány přesně v určitém časovém intervalu, bylo použito metabolické značení pomocí [³⁵S]-methioninu. Značení bylo provedeno v časovém intervalu 300-360 min. V tomto čase bakterie v médiu bez zdroje železa ještě vykazovaly růst, ale rychlost v porovnání s kontrolní kulturou byla podstatně snižena. Kombinace metabolického značení a použití dvou IPG proužků o úzkých pH gradientech 4-7 a 6-11 umožnilo analyzovat proteiny s hodnotu pI mezi 4-11 s výborným rozlišením a jedinečnou citlivostí. Software PDQuest 7.2.0 na gelech o pH 4-7 detekoval průměrně 600 různých skvrn, na gelech připravených s použitím IPG proužků o pH rozmezí 6-11 pak průměrně 300 skvrn. Kvantitativní a statistická kritéria zadaná pro vyhledání skvrn se změněnou intenzitou vedla k detekci 52 skvrn s vyšší produkcí a 89 skvrn s nižší produkcí během kultivace *F. tularensis* LVS v prostředí bez zdroje železa. (Obr. 14 a 15).

Obrázek 14. Reprezentativní 2D-PAGE proteinů *F. tularensis* LVS provedená pomocí IPG proužku 4-7. Proteinové skvrny, jejichž intenzity po kultivaci v médiu bez zdrojů železa byly vyšší, jsou označeny modře. Červeně jsou označeny skvrny, jejichž intenzita po kultivaci v médiu bez zdrojů železa byla nižší. Skvrny jsou dále označeny SSP.



Obrázek 15. Reprezentativní 2D-PAGE proteinů *F. tularensis* LVS provedená pomocí IPG proužku 6-11. Proteinové skvrny, jejichž intenzity po kultivaci v médiu bez zdrojů železa byly vyšší, jsou označeny modře. Červeně jsou označeny skvrny, jejichž intenzita po kultivaci v médiu bez zdrojů železa byla nižší. Skvrny jsou dále označeny SSP.

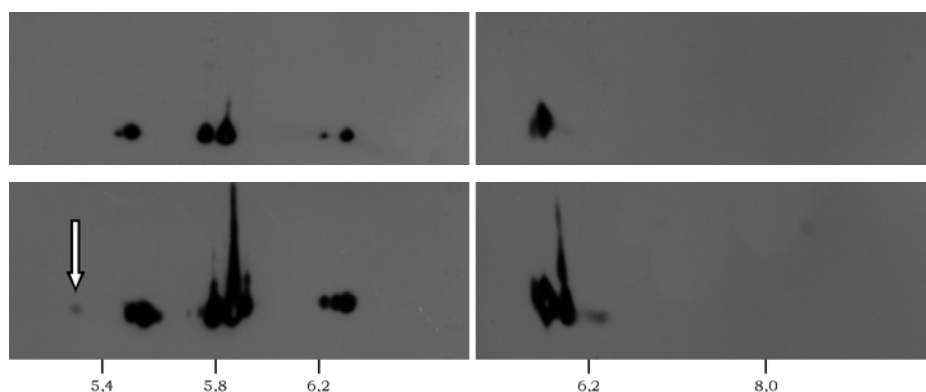


5.4.3 Identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

Skvrny se změněnou intenzitou byly primárně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. V případě nejisté nebo neúspěšné identifikace byly proteiny identifikovány pomocí LC-MS/MS metody měřením fragmentačních

spekter na tandemovém hmotnostním spektrometru ESI-QTOF. Pro eliminaci nebezpečí špatného přiřazení skvrn na analytických gelech se skvrnami na preparativních gelech byl každý protein vyřezán a identifikován nejméně dvakrát. Proteinové skvrny, které byly opakovaně jednoznačně identifikovány, jsou uspořádány spolu s jejich kvantitativními profily do tabulky 8. Několik skvrn zůstalo neidentifikovaných nebo identifikace nebyla opakovaně potvrzena. Nárůst produkce IglC proteinu byl potvrzen také pomocí Western blotové analýzy (Obr. 16).

Obrázek 16. 2D Western blotová analýza produkce IglC proteinu. Porovnání kontrolního vzorku (nahore) a vzorku připraveného z kultury rostoucí v médiu bez železa. Bílá šipka označuje novou variantu proteinu, která je produkována pouze v prostředí bez zdroje železa.



Tabulka 8. Seznam proteinových skvrn, jejichž intenzita byla výrazně změněna po kultivaci v médiu bez zdroje železa.

SSP	pH rozmezí gelu ^{a)}	Přístupové číslo NCBI	Název proteinu	Teoretické		Pozorované		Poměr intenzit ^{b)}
				MW	pI	MW	pI	
4203	6-11	YP_169522	Hypothetical protein FTT0484	25,7	8,5	25,4	6,9	0,15
4305	6-11	YP_169809	Cyanophycinase	29,3	7,1	26,9	7,3	0,46
4204	4-7	YP_169963	Hypothetical protein FTT0975	25,7	7,7	25,0	5,5	4,59
7201	4-7	YP_169963	Hypothetical protein FTT0975	25,7	7,7	25,0	6,2	2,57
5104	6-11	YP_170470	Outer membrane protein 26	19,8	9,1	20,1	7,7	2,59
6107	6-11	YP_170470	Outer membrane protein 26	19,8	9,1	20,3	8,3	2,90
1501	4-7	YP_170612	Hypothetical protein FTT1707	44,6	4,8	41,4	4,8	2,51
1502	4-7	YP_170612	Hypothetical protein FTT1707	44,6	4,8	41,4	4,9	2,61
3006	4-7	YP_170661	Hypothetical protein FTT1771	13,7	5,3	12,3	5,4	6,39
3111	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4	5,9	22,9	5,3	NS
4106	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4	5,9	22,4	5,5	5,28
5108	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4	5,9	22,4	5,8	3,16

6102	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4 / 5,9	22,4 / 5,9	2,20
7107	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4 / 5,9	22,5 / 6,3	5,03
7109	4-7	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4 / 5,9	22,8 / 6,2	NS
2101	6-11	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4 / 5,9	22,6 / 6,3	NS
3103	6-11	YP_170617	Intracellular growth locus, subunit C	22,4 / 5,9	22,4 / 6,6	25,48
0607	4-7	YP_170618	Intracellular growth locus, subunit B	58,7 / 4,7	55,6 / 4,8	2,06
5102	6-11	YP_170619	Intracellular growth locus, subunit A	22,4 / 8,8	20,5 / 7,6	NS
6107	6-11	YP_170619	Intracellular growth locus, subunit A	22,4 / 8,8	20,3 / 8,3	2,90
7106	6-11	YP_170619	Intracellular growth locus, subunit A	22,4 / 8,8	20,4 / 8,7	2,93
0110	4-7	YP_170013	Inorganic pyrophosphatase	19,6 / 4,9	19,6 / 4,7	0,38
3802	4-7	YP_170419	Pyruvate dehydrogenase, E2 component	67,2 / 4,8	81,1 / 5,3	0,34
3804	4-7	YP_170419	Pyruvate dehydrogenase, E2 component	67,2 / 4,8	81,0 / 5,3	0,39
5807	4-7	YP_170420	Pyruvate dehydrogenase, E1 component	100,1 / 5,8	81,6 / 5,7	0,50
5810	4-7	YP_170420	Pyruvate dehydrogenase, E1 component	100,1 / 5,8	81,2 / 5,8	0,44
8513	4-7	YP_169425	NAD(P)-specific glutamate dehydrogenase	49,1 / 6,5	44,0 / 6,6	0,31
2605	6-11	YP_169425	NAD(P)-specific glutamate dehydrogenase	49,1 / 6,5	45,9 / 6,4	0,42
3605	6-11	YP_169588	Polyamine transporter, ABC transporter	42,3 / 6,7	42,3 / 6,7	0,17
5505	6-11	YP_169953	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	40,9 / 8,1	38,7 / 7,7	0,19
6502	6-11	YP_169953	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	40,9 / 8,1	38,4 / 8,2	0,20
4508	6-11	YP_170144	Gamma-glutamyltranspeptidase	65,1 / 8,5	38,3 / 7,3	0,15
5003	4-7	YP_170170	Lactoylglutathione lyase	14,3 / 5,5	12,5 / 5,7	2,90
2203	4-7	YP_169155	Triosephosphate isomerase	27,7 / 5,0	27,0 / 5,1	0,41
1506	4-7	YP_169183	Phosphopentomutase	45,7 / 5,1	44,6 / 5,0	0,33
0608	4-7	YP_169724	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)	49,5 / 4,7	48,5 / 4,8	0,42
1806	4-7	YP_169730	Chitinase family 18 protein	83,1 / 5,0	76,6 / 5,0	0,26
7701	6-11	YP_170315	Pyruvate kinase	51,7 / 8,6	51,3 / 8,4	0,30
7703	6-11	YP_170315	Pyruvate kinase	51,7 / 8,6	51,7 / 8,6	0,32
1404	6-11	YP_169789	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	27,8 / 6,0	30,7 / 6,0	3,72
3302	6-11	YP_169789	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	27,8 / 6,0	29,8 / 6,6	0,15
4402	6-11	YP_170433	Acetyl-coenzyme A carboxylase, carboxyl transferase subunit alpha	35,4 / 7,7	32,5 / 7,0	7,03
5508	4-7	YP_170461	3-ketoacyl-CoA thiolase	41,7 / 5,7	40,5 / 5,8	6,80
6506	4-7	YP_170461	3-ketoacyl-CoA thiolase	41,7 / 5,7	40,5 / 5,9	3,04
7502	4-7	YP_170461	3-ketoacyl-CoA thiolase	41,7 / 5,7	40,6 / 6,1	2,85
4707	4-7	YP_169088	Aspartyl-tRNA synthetase	67,0 / 5,5	62,8 / 5,6	0,29
5703	4-7	YP_169088	Aspartyl-tRNA synthetase	67,0 / 5,5	62,9 / 5,6	0,24
5704	4-7	YP_169253	Lysyl-tRNA synthetase	66,2 / 5,5	60,8 / 5,7	0,34
5707	4-7	YP_169253	Lysyl-tRNA synthetase	66,2 / 5,5	60,6 / 5,8	0,26
6705	4-7	YP_169824	Threonyl-tRNA synthetase	72,3 / 5,9	65,7 / 6,0	0,46
5503	4-7	YP_170531	Cysteinyl-tRNA synthetase	53,1 / 5,3	47,0 / 5,7	0,35
9002	6-11	YP_169206	50S ribosomal protein L11	15,2 / 9,5	15,3 / 9,5	0,23
8309	6-11	YP_169207	50S ribosomal protein L1	24,5 / 9,5	28,5 / 9,1	0,23

8310	6-11	YP_169207	50S ribosomal protein L1	24,5 / 9,5	28,6 / 9,2	0,20
8311	6-11	YP_169207	50S ribosomal protein L1	24,5 / 9,5	28,7 / 9,3	0,26
9102	6-11	YP_169374	50S ribosomal protein L3	22,5 / 9,6	22,4 / 9,4	0,11
9104	6-11	YP_169374	50S ribosomal protein L3	22,5 / 9,6	22,5 / 9,5	0,13
3703	4-7	YP_169244	30S ribosomal protein S1	61,6 / 5,2	61,5 / 5,3	0,45
3707	4-7	YP_169244	30S ribosomal protein S1	61,6 / 5,2	61,6 / 5,4	0,37
8004	6-11	YP_169388	30S ribosomal protein S8	14,4 / 9,4	15,3 / 9,1	0,22
8012	6-11	YP_169388	30S ribosomal protein S8	14,4 / 9,4	15,3 / 9,3	0,27
7005	4-7	YP_170043	30S ribosomal protein S6	13,1 / 6,0	13,0 / 6,3	0,31
3109	4-7	YP_169365	Ribosome recycling factor	20,5 / 5,5	20,2 / 5,4	0,50
5101	4-7	YP_169365	Ribosome recycling factor	20,5 / 5,4	19,9 / 5,7	0,47
2819	4-7	YP_169372	Elongation factor G (EF-G)	77,7 / 5,0	77,0 / 5,1	0,30
6801	4-7	YP_169715	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75,4 / 5,6	71,5 / 5,9	0,26
6806	4-7	YP_169715	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75,4 / 5,6	71,4 / 6,0	0,19
2205	4-7	YP_169860	Ribonuclease PH	25,5 / 5,0	28,9 / 5,2	0,20
1004	4-7	YP_170290	Translation initiation inhibitor	13,7 / 5,5	15,9 / 4,9	ND
0013	4-7	YP_170266	Transcriptional elongation factor	17,7 / 4,8	16,5 / 4,8	0,33
7501	4-7	YP_170384	Transcription termination factor Rho	47,0 / 6,0	42,6 / 6,1	0,24
4107	4-7	YP_170646	Single-strand binding protein	17,5 / 5,6	18,1 / 5,5	2,02
4505	6-11	YP_169628	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase	43,9 / 8,0	40,0 / 7,2	0,26
4303	6-11	YP_169632	Beta-lactamase	32,0 / 7,7	28,9 / 7,2	0,43
5605	6-11	YP_170014	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Penicillin binding protein) family protein	48,1 / 8,6	43,4 / 7,7	NS
7102	4-7	YP_170549	Lipoprotein releasing system, subunit A, outer membrane lipoproteins carrier	23,5 / 7,7	19,4 / 6,1	NS
1105	4-7	YP_169583	AhpC/TSA family protein	19,7 / 5,1	18,2 / 4,9	7,51
2101	4-7	YP_169583	AhpC/TSA family protein	19,7 / 5,1	18,0 / 5,1	5,87
3102	4-7	YP_169583	AhpC/TSA family protein	19,7 / 5,1	17,9 / 5,2	2,67
0015	4-7	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	13,0 / 4,6	NS
1009	4-7	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	12,9 / 4,8	NS
2004	4-7	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	13,0 / 5,1	3,44
4007	4-7	YP_170600	Chaperonin protein, groES	10,2 / 5,5	12,7 / 5,6	2,50
4803	4-7	YP_170660	ClpB protein	95,3 / 5,5	80,1 / 5,4	3,70
4805	4-7	YP_170660	ClpB protein	95,3 / 5,5	80,0 / 5,5	2,36
5008	4-7	YP_170678	Heat shock protein	16,7 / 5,6	13,6 / 5,7	NS
8202	4-7	YP_170100	Rhodanese-like family protein	28,2 / 6,5	28,3 / 6,4	2,91
3001	4-7	YP_170379	Hypothetical protein FTT1441	18,5 / 5,5	13,6 / 5,3	2,22
4015	4-7	YP_170379	Hypothetical protein FTT1441	18,5 / 5,5	13,5 / 5,4	NS
5104	4-7	YP_170091	Isochorismatase hydrolase family protein	21,3 / 5,4	23,6 / 5,7	3,19
6207	6-11	YP_170324	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	26,3 / 8,5	24,1 / 8,4	0,31

a) Ve sloupci je uvedeno pH rozmezí 2D-PAGE gelu, na kterém byla proteinová skvrna pozorována.

b) Ve sloupci jsou uvedeny podíly průměrných normalizovaných intenzit proteinových skvrn získaných z bakteriální kultury připravené v médiu bez zdroje železa a kontrolní

kultury. U skvrn, které byly pozorovány pouze u stresované bakteriální kultury, je přítomno označení NS (nová skvrna), u skvrn, které byly pozorovány pouze u kontrolní bakteriální kultury označení ND (nedetekována).

5.4.4 Závěr

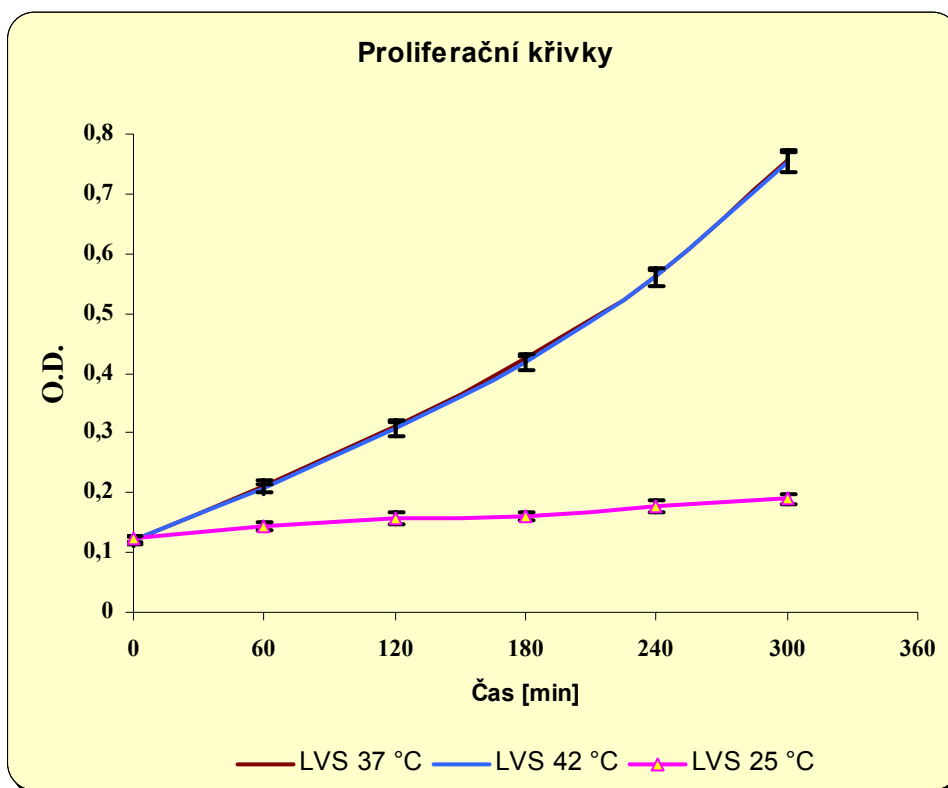
Tato studie prokázala vliv koncentrace železa v prostředí na expresi *igl* operonu. Dva geny z tohoto operonu byly dříve shledány jako nezbytné pro virulenci *F. tularensis*. Tyto nálezy podporují hypotézu, že nedostatek železa, tedy faktor, s kterým se patogenní bakterie v průběhu patogeneze setkávají velmi často, funguje jako signál pro spuštění produkce faktorů virulence, které mají umožnit přežít nehostinné prostředí hostitele.

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

5.5.1 Růst bakterií

Pro „shotgun“ analýzu byly připraveny tři kultury *F. tularensis* LVS kultivované 5 h při rozdílných teplotách a jedna kultura rostoucí při 37 °C po dobu 24 h. Bakterie kultivované při 37 °C a 42 °C vykazovaly totožnou rychlost růstu (Obr. 17). Proliferace bakterií kultivovaných při 25 °C byla velmi omezená, a proto pro získání O.D._{600 nm} 0,70 -0,75 bylo nutné bakterie kultivovat přibližně 18 h. Měření O.D. u 24 hodinové kultury probíhalo jen po dobu 5 h, aby bylo ověřeno, že proliferace bude totožná jako u bakterií rostoucích při 37 °C po dobu 5 h. Při ukončení kultivace byl zákal mimo dynamický rozsah použitého turbidimetru. Po naředění a přepočítání byla O.D._{600 nm} odhadnuta na 3,7.

Obrázek 17. Průběh proliferace bakterie *F. tularensis* LVS při různých teplotách kultivace.



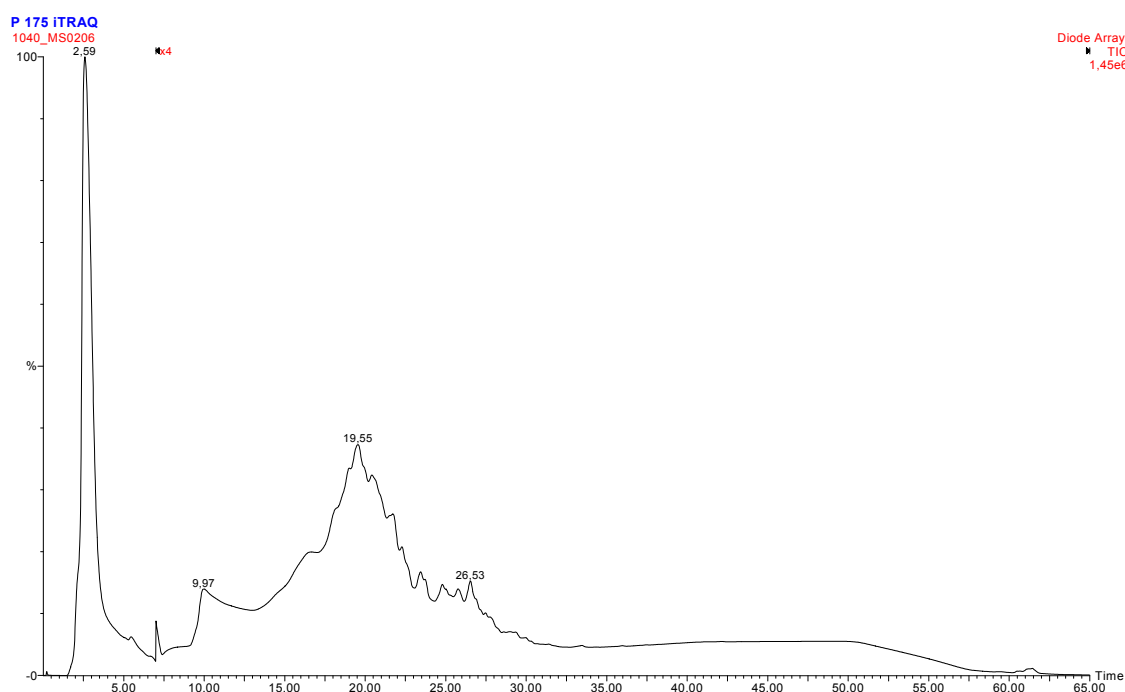
5.5.2 „Shotgun“ kvantitativní analýza

Před provedením kvantitativní analýzy experimentálního vzorku byla iTRAQ technika testována na standardní směsi proteinů. Všechna fragmentační spektra změřená z peptidů daných proteinů obsahovala reportérové ionty 114 a 117 iTRAQ značek, které byly k testování metody použity. Píky iTRAQ iontů dosahovaly velmi dobrého rozlišení, což je u kvantifikace prováděné z intenzit velmi důležitý faktor. Po vyhodnocení vlastních dat bylo zjištěno, že relativní směrodatná odchylka poměrů iTRAQ iontů pro bovinní sérový albumin byla přibližně 7 %. Tato hodnota se poněkud zvýšila u proteinů, které byly identifikovány na peptidy, jenž v MS spektru vykazovaly nízké intenzity. Výsledky testování pomocí standardní směsi proteinů prokázaly, že zvolená řešení jednotlivých úrovní v kvantitativní „shotgun“ proteomické analýze byla zvolena správně.

Po enzymatickém štěpení proteinů z celobuněčných lyzátů bakterií *F. tularensis* LVS připravených za čtyř různých podmínek kultivace byly peptidy derivatizovány

iTRAQ značkami. Modifikované peptidy byly smíseny a tento vzorek byl frakcionován na SCX koloně HPLC systému. Efektivní separace byla pozorována mezi 7. a 30. min (Obr. 18). Toto uspořádání vedlo ke sběru celkem 26 minutových frakcí a první 7 minutové frakce. Tyto frakce byly po následném zpracování analyzovány HPLC-QTOF systémem.

Obrázek 18. UV záznam separace komplexní směsi peptidů SCX chromatografií.

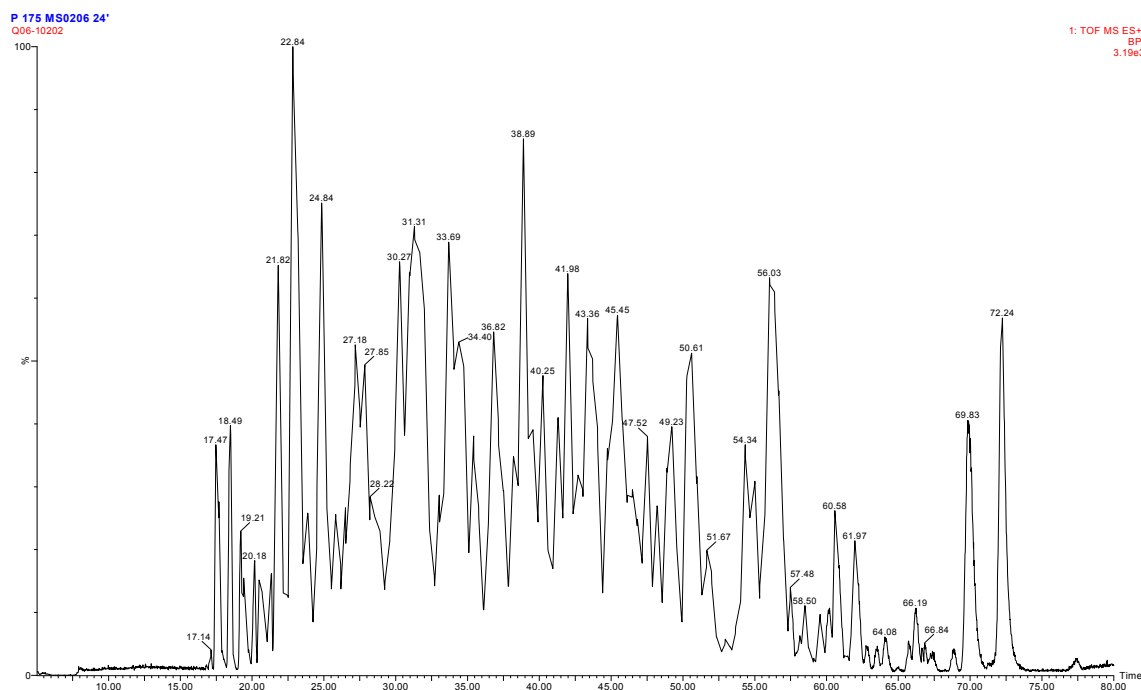


Nastavení HPLC systému pro RP chromatografií vedlo k účinné separaci značených peptidů přibližně v rozmezí 18. až 75. min (Obr. 19). Kombinace takto nastavené separace s parametry hmotnostního spektrometru QTOF zvolené v nastavení metody vedly celkem k fragmentaci přibližně 9000 peptidů. Z těchto spekter 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. Na více jak 2 peptidy bylo identifikováno 421 proteinů.

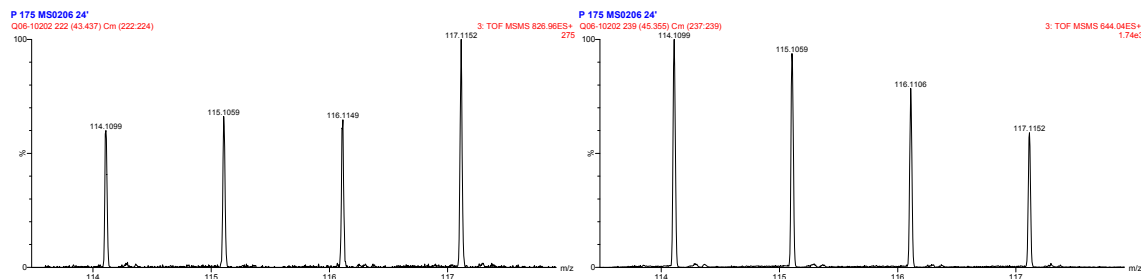
Při kontrole byly v každém náhodně vybraném MSMS spektru viditelné iTRAQ ionty (Obr. 20). Píky těchto iontů dosahovaly velmi dobrého rozlišení, což je pro kvantifikaci z intenzit iontů velmi důležité. Přítomnosti iTRAQ iontů v každém spektru

dále svědčila o velmi dobré výtěžnosti vlastní modifikační reakce. Ve zbývajících částech spekter, které jsou důležité pro vlastní identifikaci proteinů, byly přibližně u 80 % náhodně vybraných spekter pozorovány fragmentační ionty s velmi vysokým poměrem k šumu (Obr.21). Pravděpodobnost správné identifikace proteinů z takto kvalitních spekter je velmi vysoká.

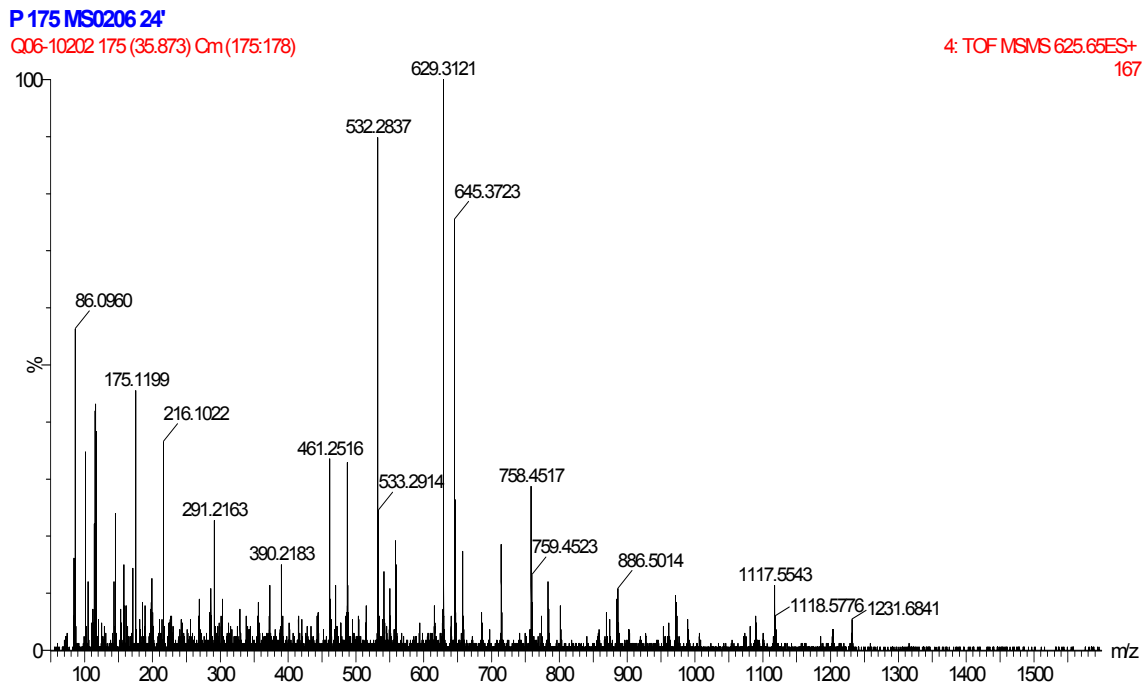
Obrázek 19. Záznam z DDA analýzy RP-HPLC/ESI-QTOF minutové SCX frakce peptidů.



Obrázek 20. Ukázka oblasti s iTRAQ ionty u 2 náhodně vybraných MSMS fragmentačních spekter.



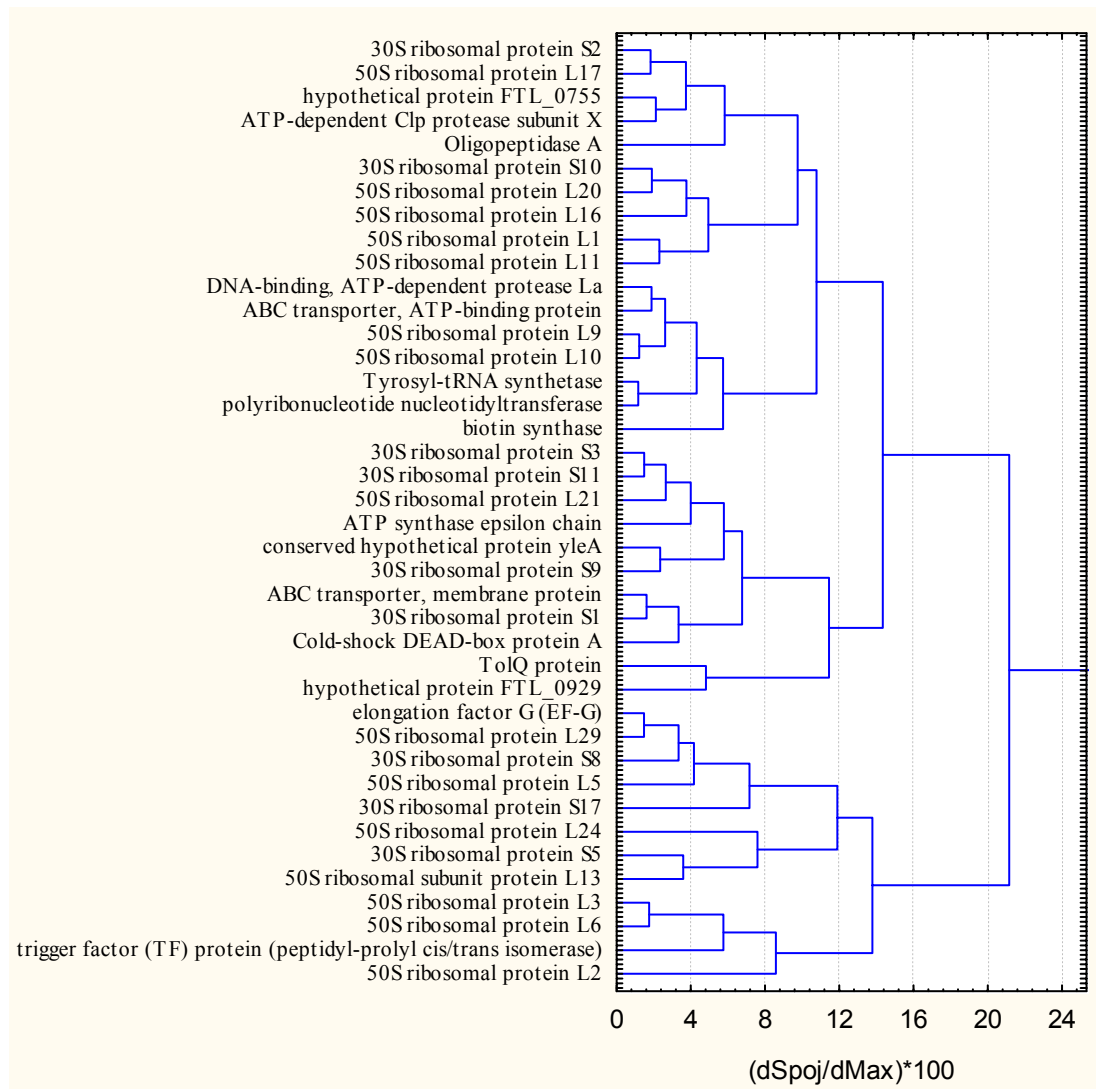
Obrázek 21. Ukázka fragmentačního spektra v celém rozsahu měřených m/z .



5.5.3 Statistická explorativní analýza

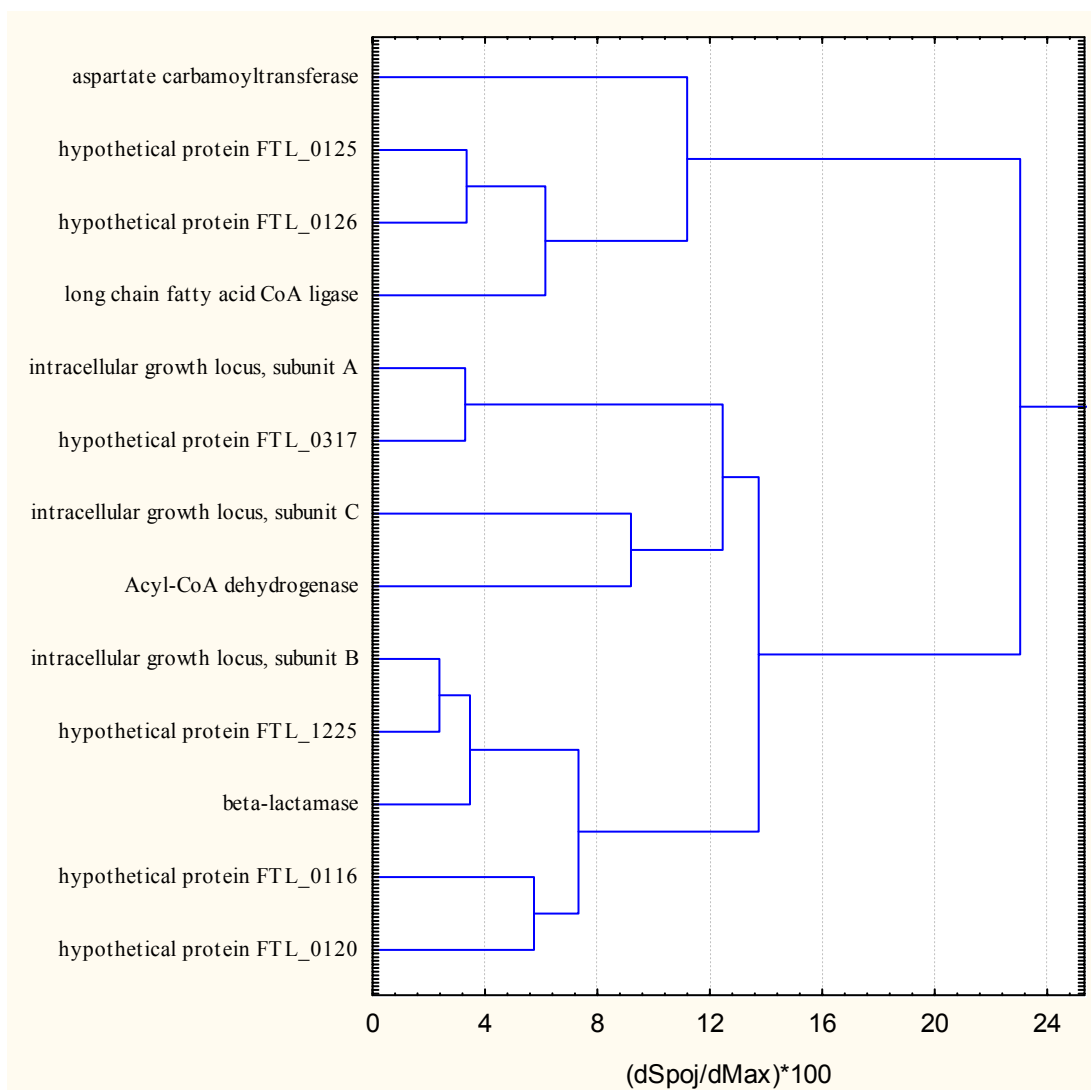
Data z iTRAQ analýzy byla podrobena explorativním analýzám, které je umožnily porovnávat z globálního pohledu. Hierarchické shlukování proteinů na základě jejich kvantitativních profilů vedlo k vytvoření vertikálního dendrogramu. Proteiny, které si svými profily byly nejvíce podobné, byly sloučeny do své blízkosti. V dendrogramu byly pak dobře patrné oblasti sdružující proteiny o podobné známé funkci (Obr. 22).

Obrázek 22. Výřez dendrogramu pro 292 proteinů ukazující skupinu proteinů s převahou ribozomálních proteinů.



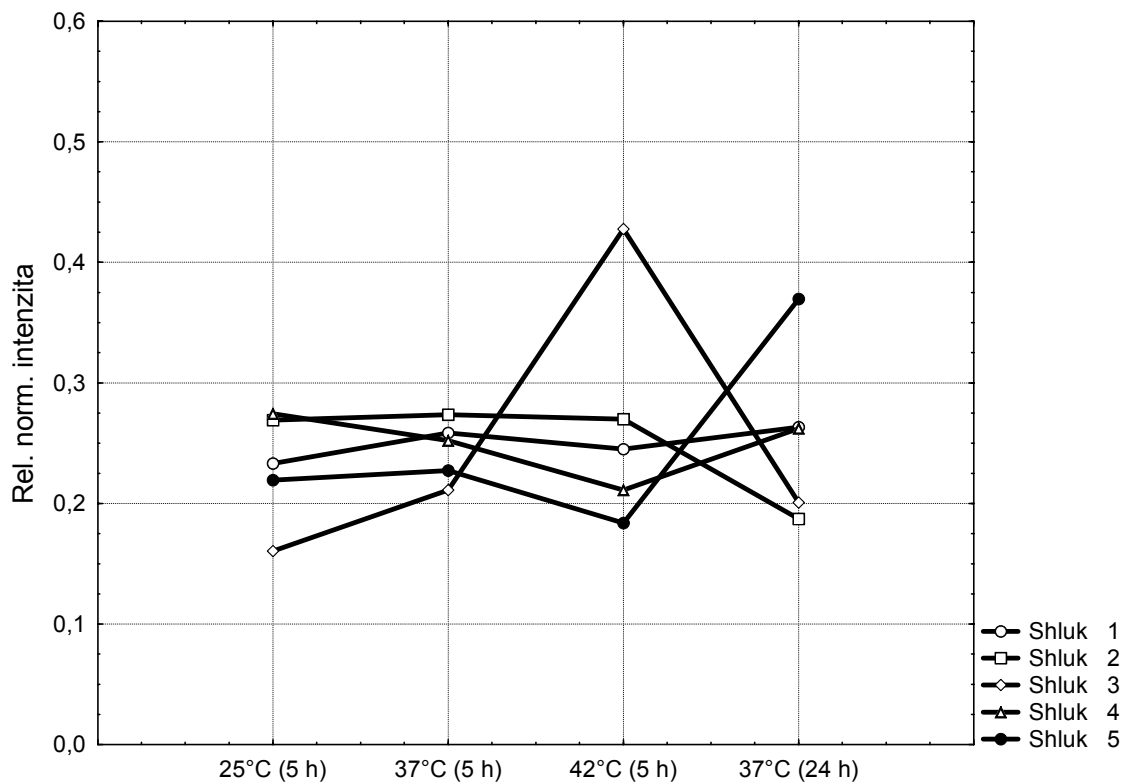
V případě známých faktorů virulence z FPI došlo k přiřazení Igl proteinů A, B a C do společného klastru. K tomuto klastru byly přiřazeny 4 hypotetické proteiny, které leží v blízkosti *igl* lokusu (Obr. 23). Na základě porovnání podobnosti sekvencí v programu BLASTn byly proteiny identifikovány: hypotetický protein FTL_0125 jako PdpB protein (gi|56708401), hypotetický protein FTL_0126 jako PdpA protein (gi|56708400), hypotetický protein FTL_0116 jako protein PdpC (gi|56708410) a hypotetický protein FTL_0120 jako hypotetický protein FTT1350 (gi|56707187).

Obrázek 23. Výřez dendrogramu pro 292 proteinů ukazující skupinu proteinů z FPI.



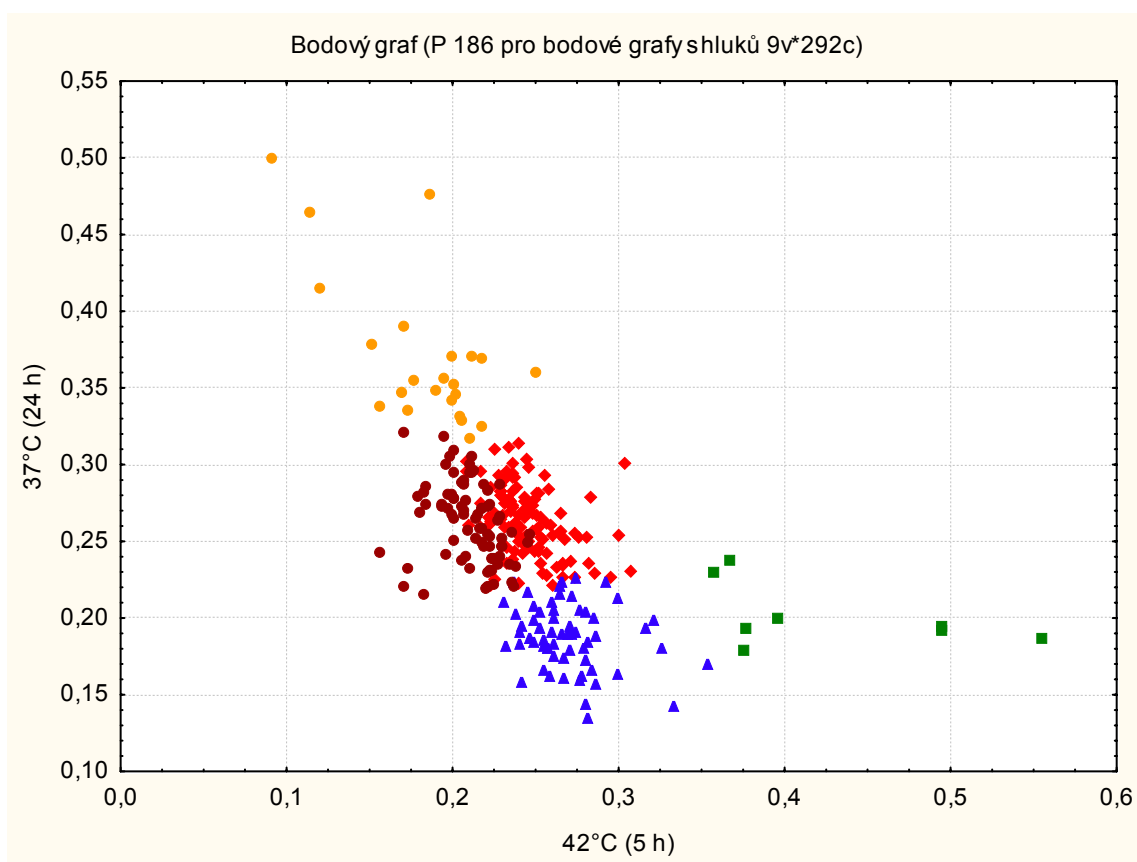
K podobnému přiřazení proteinů bylo dosaženo použitím metody shlukování pomocí k -průměrů, kdy byl počet shluků nastaven na 5. Jednotlivé shluky lze velmi dobře charakterizovat podle průměrů svých členů (Obr. 24). Shluk 1 obsahoval proteiny, jejichž produkce se v zásadě neměnila v závislosti na teplotě nebo době kultivace. Shluk 2 sdružuje proteiny, u kterých došlo k poklesu produkce ve stacionární fázi růstu. Proteiny výrazně reagující na teplotu, 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 nadprodukované během stacionární fáze růstu bakterie.

Obrázek 24. Graf průměrů všech shluků



Vyneseme-li do bodového grafu závislost $I_{(RN)}$ pro 42 °C a stacionární fázi růstu, lze pozorovat neohrazené, ale patrné rozdělení podle příslušnosti ke shlukům (Obr. 25). Při zvětšení tohoto grafu lze pozorovat blízkost proteinů tepelného šoku nebo skupiny proteinů, jejichž geny jsou soustředěny v FPI.

Obrázek 25. Bodový graf $I_{(RN)}$ zobrazující rozdělení proteinů dle příslušnosti ke shlukům.



Identifikované proteiny, které byly vyhodnoceny explorativními statistickými metodami jsou seřazeny v tabulce 9. Spolu s nimi je také zobrazeno číslo shluku podle metody shlukování k -průměrů.

Tabulka 9. Seznam identifikovaných proteinů a jejich příslušnost ke shlukům dle metody k -průměrů.

Přístupové číslo NCBI nr	Název proteinu
	Shluk 1
gi 89255893	1,4-alpha-glucan branching enzyme
gi 89256233	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase
gi 89256779	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
gi 89257047	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
gi 89256400	ABC transporter, ATP-binding protein

gi 89256618	Acetyl-CoA carboxylase beta subunit
gi 89256869	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxyl carrier protein subunit
gi 89256868	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
gi 89255726	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha
gi 89256454	Acetyltransferase
gi 89255614	Acyltransferase
gi 89257045	Adenine phosphoribosyltransferase
gi 89256165	Adenylate kinase
gi 89257110	Adenylosuccinate lyase
gi 89256354	AhpC/TSA family protein
gi 89256431	Alanyl-tRNA synthetase
gi 89257025	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase
gi 89256726	Arabinose phosphate isomerase
gi 89256875	Arginyl-tRNA synthetase
gi 89256711	Asparaginase
gi 89255998	Asparagine synthase
gi 89256162	Aspartate aminotransferase
gi 89257101	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B
gi 89255468	Aspartyl-tRNA synthetase
gi 89257060	ATP synthase alpha chain
gi 89257058	ATP synthase beta chain
gi 89257059	ATP synthase gamma chain
gi 89256753	ATP-dependent metalloprotease
gi 89256175	Bifunctional proline dehydrogenase,pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
gi 89256583	Biotin synthesis protein BioC
gi 89256709	Capsule biosynthesis protein capB
gi 89255476	Carbamoyl-phosphate synthase large chain
gi 89256713	Carbohydrate/purine kinase pfkB family protein
gi 89256035	Carbon-nitrogen hydrolase
gi 89256974	Cell division protein
gi 89257156	Cell division protein FtsA
gi 89257052	Citrate synthase
gi 89255921	Conserved hypotheticial protein
gi 89255623	Cytochrome d terminal oxidase, polypeptide subunit I
gi 89256395	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Penicillin binding protein) family protein
gi 89257046	Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate Dehydrogenase complex
gi 89256735	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)
gi 89256473	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
gi 89256689	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
gi 89256970	GlpX protein
gi 89255864	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase
gi 89256126	Glucose inhibited division protein A
gi 89255895	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase

gi 89256003	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase
gi 89256765	Glucose-6-phosphate isomerase
gi 89256613	Glutamate--cysteine ligase
gi 89257147	Glutamine synthetase
gi 89255652	Glutamyl-tRNA synthetase
gi 89257102	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A
gi 89256274	Glutaredoxin 2
gi 89256470	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
gi 89256798	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein
gi 89256651	Glycyl-tRNA synthetase beta subunit
gi 89257070	Histidyl-tRNA synthetase
gi 89255516	Hypothetical membrane protein
gi 89255987	Hypothetical membrane protein
gi 89256836	Hypothetical membrane protein
gi 89256867	Hypothetical membrane protein
gi 89256931	Hypothetical membrane protein
gi 89255698	Hypothetical protein FTL_0265
gi 89255903	Hypothetical protein FTL_0493
gi 89255970	Hypothetical protein FTL_0572
gi 89255971	Hypothetical protein FTL_0573
gi 89256192	Hypothetical protein FTL_0832
gi 89256435	Hypothetical protein FTL_1110
gi 89256550	Hypothetical protein FTL_1231
gi 89256663	Hypothetical protein FTL_1364
gi 89256707	Hypothetical protein FTL_1414
gi 89256826	Hypothetical protein FTL_1542
gi 89255846	Isoleucyl-tRNA synthetase
gi 89256333	Lactate dehydrogenase
gi 89256941	Lipid A transport protein, ABC transporter,ATP-binding and membrane protein
gi 89256278	Lipoic acid synthetase
gi 89256241	Metal ion transporter protein
gi 89255995	NAD dependent epimerase
gi 89255702	NAD(P)-specific glutamate dehydrogenase
gi 89256619	Nucleoside diphosphate kinase
gi 89256130	Oxidoreductase, short-chain dehydrogenase family protein
gi 89256063	Pantoate-beta-alanine ligase
gi 89256882	Peptidase family S49 protein
gi 89256990	Peptide chain release factor 1
gi 89255762	Peptidoglycan-associated lipoprotein
gi 89257177	Periplasmic solute binding family protein
gi 89256611	Phenol hydroxylase
gi 89256519	Phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit
gi 89257044	Phosphoglucosamine mutase
gi 89256471	Phosphoglycerate kinase
gi 89256937	Phosphopentomutase

gi 89255806	Phosphoribosylaminoimidazol (AIR) synthetase
gi 89255810	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, ATPase subunit
gi 89255809	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit
gi 89255532	Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2
gi 89256208	Preprotein translocase, subunit D, membrane protein
gi 89256105	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase
gi 89255659	Protein chain elongation factor EF-Ts
gi 89257121	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
gi 89255740	Pyruvate dehydrogenase, E1 component
gi 89255741	Pyruvate dehydrogenase, E2 component
gi 89256472	Pyruvate kinase
gi 89255661	Ribosome recycling factor
gi 89256637	Selenocysteine lyase
gi 89256780	Seryl-tRNA synthetase
gi 89256500	Sigma-54 modulation protein
gi 89256224	SIS domain protein
gi 89256309	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase
gi 89256837	Succinyl-CoA synthetase beta chain
gi 89255760	TolB protein precursor
gi 89256434	Transaldolase
gi 89257043	Triosephosphate isomerase
gi 89255737	Tryptophanyl-tRNA synthetase
gi 89256188	Type IV pili nucleotide binding protein, ABC transporter, ATP-binding protein
gi 89256170	Type IV pilin multimeric outer membrane protein
gi 89256805	Uracil phosphoribosyltransferase
	Shluk 2
gi 89257160	30S ribosomal protein S1
gi 89255669	30S ribosomal protein S10
gi 89255693	30S ribosomal protein S11
gi 89255679	30S ribosomal protein S17
gi 89255658	30S ribosomal protein S2
gi 89255676	30S ribosomal protein S3
gi 89255687	30S ribosomal protein S5
gi 89255684	30S ribosomal protein S8
gi 89256507	30S ribosomal protein S9
gi 89257016	50S ribosomal protein L1
gi 89257015	50S ribosomal protein L10
gi 89257017	50S ribosomal protein L11
gi 89255689	50S ribosomal protein L15
gi 89255677	50S ribosomal protein L16
gi 89255696	50S ribosomal protein L17
gi 89255673	50S ribosomal protein L2
gi 89256697	50S ribosomal protein L20
gi 89256746	50S ribosomal protein L21
gi 89255672	50S ribosomal protein L23

gi 89255681	50S ribosomal protein L24
gi 89255678	50S ribosomal protein L29
gi 89255670	50S ribosomal protein L3
gi 89255682	50S ribosomal protein L5
gi 89255685	50S ribosomal protein L6
gi 89256365	50S ribosomal protein L9
gi 89256508	50S ribosomal subunit protein L13
gi 89256548	ABC transporter, ATP-binding protein
gi 89256549	ABC transporter, membrane protein
gi 89257057	ATP synthase epsilon chain
gi 89256250	ATP-dependent Clp protease subunit X
gi 89256314	ATP-dependent protease, proteasome-related peptidase subunit
gi 89256581	Biotin synthase
gi 89256685	Cold-shock DEAD-box protein A
gi 89256244	Conserved hypothetical protein yleA
gi 89256831	DNA gyrase subunit B
gi 89256251	DNA-binding, ATP-dependent protease La
gi 89257013	DNA-directed RNA polymerase beta chain
gi 89256817	DNA-directed RNA polymerase omega subunit
gi 89256013	DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit
gi 89257012	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit
gi 89255668	Elongation factor G (EF-G)
gi 89255899	Glycyl-tRNA synthetase alpha chain
gi 89255514	GTP-binding protein LepA
gi 89255713	Heat shock protein, hsp40
gi 89256141	Hypothetical protein FTL_0755
gi 89256280	Hypothetical protein FTL_0929
gi 89255854	Methionyl-tRNA synthetase
gi 89255830	Oligopeptidase A
gi 89256821	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase
gi 89256041	Prolyl-tRNA synthetase
gi 89256979	ProP osmoprotectant transporter, fragment
gi 89256388	RNA polymerase sigma-70 factor
gi 89256171	Shikimate kinase I
gi 89256557	Signal recognition particle protein, Ffh
gi 89256009	Thioredoxin
gi 89256700	Threonyl-tRNA synthetase
gi 89255757	TolQ protein
gi 89257018	Transcription antitermination protein nusG
gi 89256248	Trigger factor (TF) protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase)
gi 89256317	Tyrosyl-tRNA synthetase
gi 89255644	Valyl-tRNA synthetase
	Shluk 3
gi 89257193	Heat shock protein
gi 89256014	Hypothetical protein FTL_0617
gi 89255700	Chaperone Hsp90, heat shock protein HtpG

gi 89256513	Chaperone protein dnaJ (heat shock protein 70 family cofactor)
gi 89256512	Chaperone protein dnaK (heat shock protein family 70 protein)
gi 89256983	Chaperone protein, groEL
gi 89256984	Chaperonin protein, groES
	Shluk 4
gi 89256807	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase
gi 89256461	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II
gi 89257186	ABC transporter, ATP-binding protein
gi 89257037	Aconitate hydratase
gi 89257173	Adenylosuccinate synthetase
gi 89257116	Amidophosphoribosyltransferase
gi 89257192	Aminopeptidase N
gi 89257200	Anthranilate synthase component I
gi 89255798	Aspartate transaminase
gi 89257172	Bifunctional purine biosynthesis protein
gi 89256216	Carbonic anhydrase
gi 89256084	Cell entry (mce) related family protein
gi 89255832	Conserved hypothetical lipoprotein
gi 89256620	CTP synthase
gi 89256191	Cyanophycin synthetase
gi 89256953	Cysteinyl-tRNA synthetase
gi 89255626	Cytochrome O ubiquinol oxidase subunit I
gi 89257158	D-alanine-D-alanine ligase B
gi 89255742	Dihydrolipoamide dehydrogenase
gi 89255940	DNA gyrase, subunit A
gi 89255664	dUTP pyrophosphatase (Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase)
gi 89257020	Elongation factor Tu (EF-Tu)
gi 89256812	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)
gi 89256380	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein
gi 89255932	fumarate hydratase
gi 89255807	Fusion protein PurC/PurD
gi 89256687	Galactose-proton symporter, major facilitator superfamily (MFS) transport protein
gi 89256592	Glutamate-1-semialdehyde-2,1-aminomutase
gi 89255887	Glycine cleavage complex protein T (aminomethyltransferase)
gi 89255889	Glycine cleavage system P protein, subunit 1
gi 89255890	Glycine cleavage system P protein, subunit 2
gi 89256151	GTP binding translational elongation factor Tu and G family protein
gi 89255825	GTP-binding protein
gi 89255930	Hypothetical lipoprotein
gi 89255543	Hypothetical membrane protein
gi 89255822	Hypothetical protein FTL_0411
gi 89255969	Hypothetical protein FTL_0571
gi 89256051	Hypothetical protein FTL_0661
gi 89256355	Hypothetical protein FTL_1016

gi 89256856	Hypothetical protein FTL_1579
gi 89256992	Hypothetical protein FTL_1723
gi 89256806	Chitinase family 18 protein
gi 89255791	Chorismate synthase
gi 89256396	Inorganic pyrophosphatase
gi 89256767	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase
gi 89255986	Isocitrate dehydrogenase
gi 89256267	Ketol-acid reductoisomerase
gi 89256533	Leucyl-tRNA synthetase
gi 89255816	Menaquinone biosynthesis methyltransferase
gi 89257073	N utilization substance protein A
gi 89255848	NAD-dependent malic enzyme
gi 89257088	NADH dehydrogenase I
gi 89257087	NADH dehydrogenase I, D subunit
gi 89257085	NADH dehydrogenase I, F subunit
gi 89257084	NADH dehydrogenase I, G subunit
gi 89255492	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase
gi 89256632	Outer membrane associated protein
gi 89255458	Outer membrane protein
gi 89257002	Oxidoreductase iron/ascorbate family protein
gi 89256235	Peptidase, M24 family protein
gi 89256792	Peroxidase/catalase
gi 89256558	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase
gi 89255894	Phosphoglucomutase
gi 89256747	Preprotein translocase, subunit A, ATPase secretion protein
gi 89255892	Pullulanase
gi 89256750	Purine nucleoside phosphorylase
gi 89255641	Pyrrolidone-carboxylate peptidase
gi 89256194	Rhodanese-like family protein
gi 89256106	Ribonuclease E
gi 89255778	Ribonuclease PH
gi 89256298	Ribose-phosphate pyrophosphokinase
gi 89256092	Serine hydroxymethyltransferase
gi 89256260	SPFH domain, band 7 family protein
gi 89256261	SPFH domain, band 7 family protein
gi 89257048	Succinate dehydrogenase iron-sulfur protein
gi 89257049	Succinate dehydrogenase, catalytic and NAD/flavoprotein subunit
gi 89256838	Succinyl-CoA synthetase, alpha subunit
gi 89256545	Thioredoxin 1
gi 89256469	Transketolase
gi 89257072	Translation initiation factor IF-2
gi 89255956	Two-component response regulator
gi 89255994	UDP-glucose/GDP-mannose dehydrogenase
	Shluk 5
gi 89255983	Acyl-CoA dehydrogenase
gi 89255475	Aspartate carbamoyltransferase

gi 89256237	Beta-lactamase
gi 89256521	Cobalamin (vitamin B12) synthesis protein/P47K family protein
gi 89255982	Fusion product of 3-hydroxacyl-CoA dehydrogenase and acyl-CoA-binding protein
gi 89255485	HlyD family secretion protein
gi 89255486	Hypothetical membrane protein
gi 89255553	Hypothetical protein FTL_0116
gi 89255557	Hypothetical protein FTL_0120
gi 89255562	Hypothetical protein FTL_0125
gi 89255563	Hypothetical protein FTL_0126
gi 89255747	Hypothetical protein FTL_0317
gi 89256185	Hypothetical protein FTL_0822
gi 89256546	Hypothetical protein FTL_1225
gi 89256783	Hypothetical protein FTL_1494
gi 89255548	Intracellular growth locus, subunit A
gi 89255549	Intracellular growth locus, subunit B
gi 89255550	Intracellular growth locus, subunit C
gi 89255984	Long chain fatty acid CoA ligase
gi 89255751	OmpA family protein
gi 89255943	Outer membrane protein OmpH
gi 89256207	Preprotein translocase family protein
gi 89255600	Universal stress protein

5.5.4 Kvantitativní a konfirmatorní statistická analýza

Proteiny ze „shotgun“ proteomické analýzy byly dále hodnoceny podle poměrů intenzit ke kontrolnímu vzorku 37 °C (5 h). Proteiny se změnou produkcí musely vykazovat nárůst nebo pokles mimo rozmezí hodnot 0,75-1,33 při hladině významnosti Studentova *t*-testu $p < 0,05$.

5.5.4.1 Proteiny se změnou produkcí v důsledku kultivace při 25 °C

Přístupové číslo NCBIInr	Jméno proteinu	Shluk	Poměr	p
gi 89256726	Arabinose phosphate isomerase	1	0,56	0,01
gi 89256974	Cell division protein	1	0,68	0,01
gi 89256208	Preprotein translocase, subunit D, membrane protein	1	0,7	0,01
gi 89256651	Glycyl-tRNA synthetase beta subunit	1	0,7	0,04
gi 89256931	Hypothetical membrane protein	1	0,74	0,01
gi 89256817	DNA-directed RNA polymerase omega subunit	2	0,73	0,01

gi 89257193	Heat shock protein	3	0,49	0,00
gi 89256983	Chaperone protein, groEL	3	0,64	0,00
gi 89256984	Chaperonin protein, groES	3	0,69	0,00
gi 89256014	Hypothetical protein FTL_0617	3	0,75	0,01
gi 89256185	Hypothetical protein FTL_0822	5	0,53	0,01
gi 89255475	Aspartate carbamoyltransferase	5	0,72	0,01
gi 89255557	Hypothetical protein FTL_0120	5	0,75	0,03
gi 89256806	Chitinase family 18 protein	4	1,46	0,02
gi 89256767	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase	4	1,43	0,01
gi 89255458	Outer membrane protein	4	1,39	0,00
gi 89256783	Hypothetical protein FTL_1494	5	1,49	0,04

5.5.4.2 Proteiny se změnou produkci v důsledku kultivace při 42 °C

Přístupové číslo NCBI nr	Jméno proteinu	Shluk	Poměr	p
gi 89257200	Anthranilate synthase component I	4	0,72	0,00
gi 89255890	Glycine cleavage system P protein, subunit 2	4	0,73	0,00
gi 89255550	Intracellular growth locus, subunit C	5	0,59	0,00
gi 89255894	Phosphoglucomutase	4	0,69	0,01
gi 89255747	Hypothetical protein FTL_0317	5	0,71	0,01
gi 89256806	Chitinase family 18 protein	4	0,69	0,01
gi 89256545	Thioredoxin 1	4	0,73	0,02
gi 89255892	Pullulanase	4	0,55	0,02
gi 89256267	Ketol-acid reductoisomerase	4	0,70	0,03
gi 89256105	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase	1	0,74	0,03
gi 89255553	Hypothetical protein FTL_0116	5	0,69	0,04
gi 89255889	Glycine cleavage system P protein, subunit 1	4	0,71	0,04
gi 89257045	Adenine phosphoribosyltransferase	1	0,70	0,05
gi 89256512	Chaperone protein dnaK (heat shock protein family 70 protein)	3	1,70	0,00
gi 89255534	ClpB protein	3	1,58	0,00
gi 89255700	Chaperone Hsp90, heat shock protein HtpG	3	1,78	0,00
gi 89256984	Chaperonin protein, groES	3	2,68	0,00
gi 89256014	Hypothetical protein FTL_0617	3	1,63	0,01
gi 89255713	Heat shock protein, hsp40	2	1,45	0,02
gi 89257193	Heat shock protein	3	3,20	0,03
gi 89256983	Chaperone protein, groEL	3	2,58	0,05

5.5.4.3 Proteiny se změnou produkci v důsledku růstu do stacionární fáze

Přístupové číslo NCBI nr	Jméno proteinu	Shluk	Poměr	p
gi 89255830	Oligopeptidase A	2	0,60	0,00
gi 89256685	Cold-shock DEAD-box protein A	2	0,63	0,00
gi 89257016	50S ribosomal protein L1	2	0,63	0,01
gi 89256507	30S ribosomal protein S9	2	0,63	0,02
gi 89256746	50S ribosomal protein L21	2	0,64	0,01
gi 89255684	30S ribosomal protein S8	2	0,65	0,01
gi 89257160	30S ribosomal protein S1	2	0,66	0,00
gi 89256250	ATP-dependent Clp protease subunit X	2	0,66	0,04
gi 89256141	Hypothetical protein FTL_0755	2	0,66	0,04
gi 89255696	50S ribosomal protein L17	2	0,67	0,00
gi 89255687	30S ribosomal protein S5	2	0,67	0,01
gi 89255682	50S ribosomal protein L5	2	0,68	0,00
gi 89255658	30S ribosomal protein S2	2	0,69	0,00
gi 89255713	Heat shock protein, hsp40	2	0,69	0,01
gi 89256365	50S ribosomal protein L9	2	0,69	0,02
gi 89256557	Signal recognition particle protein, Ffh	2	0,70	0,00
gi 89256431	Alanyl-tRNA synthetase	1	0,71	0,01
gi 89257057	ATP synthase epsilon chain	2	0,71	0,01
gi 89256251	DNA-binding, ATP-dependent protease La	2	0,72	0,01
gi 89255668	Elongation factor G (EF-G)	2	0,73	0,00
gi 89257015	50S ribosomal protein L10	2	0,73	0,01
gi 89256105	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase	1	0,74	0,02
gi 89257012	DNA-directed RNA polymerase, beta subunit	2	0,74	0,00
gi 89257018	Transcription antitermination protein nusG	2	0,74	0,00
gi 89255892	Pullulanase	4	0,74	0,05
gi 89256084	Cell entry (mce) related family protein	4	1,33	0,02
gi 89257052	Citrate synthase	1	1,36	0,00
gi 89255747	Hypothetical protein FTL_0317	5	1,38	0,00
gi 89255553	Hypothetical protein FTL_0116	5	1,39	0,03
gi 89256354	AhpC/TSA family protein	1	1,42	0,01
gi 89255943	Outer membrane protein OmpH	5	1,42	0,04
gi 89255549	Intracellular growth locus, subunit B	5	1,46	0,00
gi 89256792	Peroxidase/catalase	4	1,47	0,00
gi 89255832	Conserved hypothetical lipoprotein	4	1,47	0,00
gi 89255550	Intracellular growth locus, subunit C	5	1,47	0,00
gi 89255751	OmpA family protein	5	1,49	0,01
gi 89256546	Hypothetical protein FTL_1225	5	1,56	0,04

gi 89255982	Fusion product of 3-hydroxacyl-CoA dehydrogenase and acyl-CoA-binding protein	5	1,61	0,01
gi 89255562	Hypothetical protein FTL_0125	5	1,61	0,02
gi 89255983	Acyl-CoA dehydrogenase	5	1,84	0,00

6 DISKUZE

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

Na rozdíl od práce Golovliova [45] nebyla při naší studii prokázána výrazná produkce IglC proteinu během oxidativního stresu. Jestliže byl ale Studentův *t*-test proveden na hladině významnosti $p=0,05$ software PDQuest označil dalších 12 skvrn, mezi kterými byla nalezena rovněž jedna izoforma proteinu IglC. Ostatní identifikované proteiny se obecně účastní stabilizace proteinové konformace, nápravy pozměněné konformace nebo degradace proteinů. Proteiny AhpC/TSA rodiny zahrnují alkyhydroperoxidreduktázy a thiol-specifické antioxidanty. Alkyhydroperoxidreduktázy redukují peroxidy lipidů, které vznikají během působení oxidačních činidel. V souladu s naší studií byla indukce genu *ahpC* dříve pozorována u *E. coli* po působení peroxidu vodíku [208]. 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 [209]. Vedle chaperonu DnaK byla pozorována zvýšená syntéza dalšího člena tohoto chaperonového systému, proteinu GrpE [210]. S tímto systémem dále spolupracuje ClpB, který se podílí na resolubilizaci proteinových agregátů [211]. Zvýšená syntéza ClpB proteinu byla pozorována při chladovém šoku u cyanobakterie *Synechococcus* [212] a exprese jeho genu byla zvýšena během reakce na stejný stresor u *Listerie monocytogenes* [213]. Pomocí transpozonové mutagenese bylo zjištěno, že ClpB protein je nezbytný pro intracelulární proliferaci *F. tularensis* subtyp *novicida* [46]. Podobné výsledky byly získány u *Listerie monocytogenes* [214]. HtpG protein představuje prokaryotní homolog eukaryotního Hsp90. Indukce syntézy proteinu je dobře dokumentována u řady bakterií např. cyanobakterie *Synechococcus* při oxidativním stresu navozeným intenzivním zářením nebo působení methylové violeti [215], u *E. coli* v přítomnosti kyselého prostředí [216] a u *Pseudomonas putida* vlivem působení fenolu [217]. Proteiny identifikované jako podjednotky ATP dependentní proteázy jsou příbuzné k HslU a HslV podjednotkám dvoukomponentové proteázy HslUV označované také ClpYQ [218]. Sekvence proteinu HslV vykazuje podobnost β -podjednotce proteazomu. Některé z námi identifikovaných proteinů *F. tularensis* LVS jsou schopné indukovat v hostitelském organismu protilátkovou odpověď. Zahrnují DnaK, GrpE, GroEL, GroES a ClpB, které jsou imunoreaktivní s myšími a lidskými

séry. HtpG protein je pak imunoreaktivní pouze se séry myšimi [36, 37].

Odpověď na oxidativní stres byla dosud nejlépe charakterizovaná u *E. coli* [99, 208]. Přítomnost peroxidu vodíku u ní aktivuje transkripční regulátor OxyR. Pro nalezení homologů OxyR a proteinů, jejichž produkce je jím regulována, byla pomocí BLAST programu prohledána přeložená genomová databáze *F. tularensis* LVS. Byl nalezen homolog OxyR (E-value 6×10^{-49}) kódovaný genem *oxyR*, hydroperoxidázy I (E-value 0,0) kódované genem *katG*, alkyhydroperoxidreduktázy podjednotky C (E-value 3×10^{-29}) a podjednotky F (E-value 7×10^{-37}) kódovaných geny *ahpC* a *ahpF*, glutathionreduktázy (E-value 1×10^{-114}) kódované genem *gorA* a glutaredoxinu I (E-value $1 * 10^{-10}$) kódované genem *grxA*. Přítomnost homologu pro DNA vázající protein kódovaný genem *dps* byla téměř jistě vyloučena (E-value 0,23). Endogenní superoxidové radikály stejně jako exogenní superoxid-generující látky jako paraquat aktivují u *E. coli* SoxRS systém. Je zřejmé, že tento systém může být aktivován také v prostředí peroxidu vodíku [219]. Přítomnost genů pro SoxS (E-value 6×10^{-4}) a SoxR (E-value 0,59) je nejistá. Na druhou stranu byly rozpoznány některé proteiny, které jsou tímto systémem regulovány: manganová superoxid-dismutáza (E-value 1×10^{-41}) kódována *sodA*, fumaráza C (E-value 1×10^{-126}) kódována *fumC*, ferredoxin reduktáza (E-value 2×10^{-9}) kódována genem *fpr*. Přítomnost enzymu glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (E-value 1,6) kódované *zwf*, endonukleázy IV (E-value 0,29) kódované *nfo* a flavodoxinu (E-value 0,43) kódovaného *fldA* nebyla potvrzena. Existuje několik důvodů, které nevedly k pozorování zvýšené produkce proteinů regulovaných systémem OxyR/SoxRS: (i) Jak je patrné z analýzy homologie, některé proteiny nejsou pravděpodobně v genomu *F. tularensis* LVS kódovány; (ii) některé proteiny nelze pomocí 2D-PAGE pozorovat kvůli omezení této metody; (iii) změna v produkci proteinu byla nedostatečná pro splnění kvantitativních a statistických kritérií zadaných v programu PDQuest.

Cílem této proteomické studie bylo také ověřit, zda-li delece genů pro IglC protein ovlivní genovou expresi *F. tularensis* LVS během oxidativního stresu. Pomocí normalizovaných intenzit proteinových skvrn byly nejprve pro každý identifikovaný protein vypočítány podíly *stres/kontrola*. Jelikož všechny gely byly připraveny v triplikátech, pro LVS kmen a Δ *iglC* kmen byly získány tři podíly, které pak tvořily vstupní hodnoty pro nepárový Studentův *t*-test. Mezi kmeny se signifikantně lišila

pouze syntéza proteinu AhpC/TSA. Průměrné podíly *stres/kontrola* byly 2,1 u divokého kmene a 3,4 u $\Delta iglC$ kmene. U obou kmenů byly tedy pozorovány velmi podobné proteinové profily vzniklé v důsledku působení peroxidu vodíku.

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.

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

6.2.1 Proteiny se zvýšenou produkcí v důsledku nedostatku železa

Vůbec největší nárůst v syntéze mezi všemi pozorovanými proteiny vykazovaly varianty proteinu IglC. IglC protein je nejdéle známý a studovaný faktor virulence u *F. tularensis*. Golovliov pozoroval nadprodukcii IglC proteinu, dříve označovaného jako hypotetický 23 kDa protein, během intracelulárního růstu *F. tularensis* LVS v myších makrofázích [45]. Jeho pozorování bylo zopakováno u subtypu *tularensis* na *in vivo* myším modelu [94]. Již několik prací potvrdilo nezbytnost *iglC* genu pro schopnost *F. tularensis* přežít v makrofázích [63], schopnost úniku z fagozomu [64] a schopnost indukovat apoptózu v hostitelských buňkách [74]. Nedávno byla objevena také jeho úloha v útlumu prozánětlivé odpovědi hostitele následující po fagocytóze bakterie [75]. Gen *iglC* je lokalizován v předpokládaném *igl* operonu, který sestává celkem ze čtyř genů. Operon se nachází ve zdvojeném ostrovu patogenity FPI [49]. V naší studii jsme rovněž pozorovali zvýšenou produkci IglA a IglB proteinů. Také protein IglA a jeho regulační faktory MglA, MglB patří mezi proteiny pozitivně ovlivňující virulenci [46, 47, 65]. Protein IglD nebyl doposud na 2D-PAGE gelech detekován. Nicméně geny v *igl* operonu se zdají být přepisovány do polycistronické mRNA, jelikož exprese všech genů je narušena u *mglAB* mutantního kmene [48]. Lze tedy očekávat také zvýšenou produkci proteinu IglD v důsledku strádání železem. Náš předpoklad byl potvrzen pomocí „cDNA microarrays“ na úrovni mRNA [112]. Indukce syntézy IglC byla pozorována u *F. tularensis* LVS při oxidativním stresu [45]. Nedávno bylo potvrzeno, že podobně reaguje také subtyp *tularensis* [94]. Autoři nicméně našli zvýšenou produkci pouze u jedné z variant proteinu. Při naší první studii jsme nebyli

schopti odpověď proteinu na oxidativní stres plně potvrdit [199], proto byl experiment znovu zopakován při použití proužků s užším pH gradientem 4-7. Na gelech připravených z bakterií ovlivněných peroxidem vodíku žádná z variant proteinu IglC nebyla pozorována s vyšší intenzitou v porovnání s kontrolními kulturami. Kromě proteinů z *igl* operonu byla zvýšená produkce vlivem strádání železem rovněž pozorována u dalšího proteinu kódovaného v FPI. Funkce hypotetického proteinu 1707 není doposud známá a vykazuje jen mírnou homologii s jiným hypotetickým proteinem PFB0765w *Plasmodium falciparum* (E-value 7×10^{-5}).

Z množiny doposud známých faktorů virulence byl pozitivní vliv nedostatku železa na produkci pozorován dále u ClpB proteinu. U *F. tularensis* subtyp *novicida* bylo pomocí transpozonové mutagenese zjištěno, že ClpB protein je pro intracelulární proliferaci nezbytný [46]. Úloha ClpB proteinu ve virulenci byla prokázána také u *Listerie monocytogenes*. Jeho funkce ve virulenci však nesouvisí s poruchou v obecné stresové odpovědi [214].

Mezi skvrnami se zvýšenou intenzitou byly identifikovány dva proteiny, které jsou potenciálně zapojeny v procesech získávání a ukládání železa. Indukce syntézy hypotetického proteinu 1441, který vykazuje homologii s bakterioferitinem (E-value 1×10^{-42}), však nebyla prokázána zcela zřetelně. Změna se vztahovala pouze na dvě méně intenzivní skvrny, zatímco ostatní, přibližně pětikrát intenzivnější varianty, zůstaly nezměněny. Změna exprese nebyla pozorována ani u podobné studie na úrovni mRNA [112]. Primární funkcí bakterioferitinu je intracelulární skladování železa, které může být později využíváno v prostředí s jeho nedostatkem. Proto byla očekávána spíše snížená produkce. Lee at al. pozorovali sníženou syntézu bakterioferitinu u bakterie *Helicobacter pylori*, která byla kultivována v prostředí bez železa. Po přidání chloridu železitého do média pak došlo ke zvýšení jeho produkce [206]. Podobně *Pseudomonas aeruginosa* vykazovala zvýšenou expresi genu pro feritin po přidání chloridu železitého do média [220]. Přibližně 3,2 násobné zvýšení syntézy bylo pozorováno u proteinu z rodiny izochorizmatázahydroláza. Úloha tohoto enzymu je lokalizována na začátku biosyntetické cesty vedoucí k produkci sideroforů. Produkce sideroforů byla u *F. tularensis* nedávno potvrzena dvěma nezávisle na sobě pracujícími skupinami [111, 112]. V přeložené genomové sekvenci však zatím nebyl nalezen homolog TonB, který tvoří nezbytnou součást transportního systému pro komplex železo-siderofor [221].

Dále byla pozorována nadprodukce proteinů zapojených do detoxifikace reaktivních kyslíkatých radikálů. Velmi významné zvýšení produkce se týkalo několika variant AhpC/TSA proteinu, jehož funkcí je redukce substrátů vznikajících při oxidativním stresu. Tento protein byl nadprodukován rovněž u *F. tularensis* po přidání peroxidu vodíku do kultivačního média [199]. Pomocí cDNA čipů však bylo pozorováno jen slabé zvýšení exprese jeho genu [112]. Při snížení kvantitativního kritéria na 1,7 byla detekována indukce syntézy dvou variant peroxidázy/katalázy. Tento nález je také podporován transkriptomovou analýzou [112]. Na druhou stranu podobné studie provedené u *Helicobacter pylori* a *Pseudomonas aeruginosa* odhalily snížení produkce proteinů zapojených do detoxifikace radikálů [206, 222]. Jiným enzymem produkovaným ve vyšší míře byla laktoylglutathionyláza, která katalyzuje přeměnu cytotoxického methylglyoxalu na S- laktoylglutathion.

Nedostatkem železa v prostředí byla pozitivně ovlivňována produkce několika proteinů s funkcí molekulárních chaperonů a proteinů zapojených do jejich obratu, včetně výše zmiňovaného ClpB proteinu. Indukce syntézy proteinu GroES byla dokumentována na několika jeho variantách. Na získaných filmech byla dále jasně patrná indukce syntézy jeho partnera GroEL, která však zůstala programem PDQuest nedetekována pravděpodobně kvůli výrazné saturaci této skvrny. Po snížení kvantitativního kritéria na 1,7 byly detekovány změny dvou variant proteinu Hsp90. Dále byl detekován nárůst syntézy proteinu vázající se na jednovláknový řetězec DNA, který může být zapojen do opravy DNA. Tento protein je většinou indukován vlivem vyšší teploty a oxidativního stresu. Tato data vedou k domněnce, že u *F. tularensis* LVS kultivované v prostředí bez zdroje železa dochází k poruše konformace proteinů nebo jejich poškození. Ztráta fyziologické konformace nebo poškození proteinů může být ovšem spojeno pouze s růstem ve stacionární fázi a není charakteristické pro stresovou odpověď vyvolanou nedostatkem železa. Na úrovni mRNA byla, na rozdíl od našich výsledků, pozorována snížená exprese genů kódujících GroEL, GroES a DnaK vlivem nedostatku železa [112]. Pro tuto diskrepanci není snadné nalézt vysvětlení. Podíl na ní však zajisté mohou nést rozdíly v experimentech. Dobře popsaná je také nízká korelace mezi transkriptomovou a proteomovou analýzou, i když se jednalo o studie prováděné za identických podmínek [146, 147].

V poslední řadě byla pozorována nadprodukce enzymů zapojených do

metabolizmu lipidů a protein podobný rhodenáze, který je zapojený do transferu síry.

6.2.2 Proteiny se sníženou produkcí v důsledku strádání železem

Poněvadž 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. Podobné výsledky byly pozorovány na úrovni mRNA [112]. V prezentované studii byla pozorována nižší úroveň produkce tRNA syntetáz pro cystein, asparagin, lysin a threonin. Naopak u *Helicobacter pylori* kultivace v prostředí s nedostatkem železa ústí ve zvýšenou produkci tyrosyl-tRNA syntetázy [206]. 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. Chitináza přiřazená do kategorie G: transport a metabolismus sacharidů byla také pozorována s nižší produkcí. Nedávno bylo u subtypu *novicida* prokázáno, že tento protein je sekretován přes sekreční systém založený na pilinu IV [53] do okolního prostředí. Dále byla ovlivněna syntéza čtyř proteinů zapojených do biogeneze povrchové struktury, COG kategorie M. Tři z nich byly produkovány v menším množství a jeden ve vyšším. Tato pozorování naznačují, že bakterie prodělává v prostředí bez zdroje železa přeměnu povrchových struktur. Tato změna může být však prvotně spojena pouze se stacionární fází růstu.

6.3 Proteomická analýza odpovědi bakterie *F. tularensis* na různé teploty kultivace

Proteiny ze „shotgun“ proteomické analýzy byly hodnoceny dvěma rozdílnými přístupy. Pro globální pohled na změny v genové expresi byl použit explorativní statistický přístup, konkrétně hierarchické shlukování a shlukování pomocí *k*-průměrů. Výhoda tohoto přístupu je, že *a priori* nevylučuje žádný výsledek, tzn. ve výsledcích nalezneme všechny proteiny, které do analýzy vstoupily. Nevýhodou je, že analýzy pracují s hodnotami průměrů nebo mediánů, tzn. není brán ohled na distribuci a variabilitu původních hodnot. Tento fakt může vyústit v chybné zařazení některého

členu analyzované množiny do klastru nebo shluku. Na druhou stranu konfirmatorní analýzy pracují se vstupními naměřenými hodnotami, na základě kterých pak dokáží určit statistickou významnost rozdílů mezi skupinami. Filtrováním jsou však odstraněny sice statisticky nepotvrzené, ale potenciálně velmi cenné informace. Proto byly v rámci vyhodnocení výsledků kombinovány oba přístupy.

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

Proteiny, jejichž syntéza byla během kultivace při 25 °C snižena patří dle explorativních statistických metod do shluku 3, který je charakterizován přítomností HSP proteinů. Toto pozorování plně odpovídá významu těchto proteinů v nápravě poškozené konformace, která je na teplotu velmi citlivá [118, 119]. Proto při nižší teplotě kultivace není potřeba velkého množství tohoto typu proteinů a jejich produkce je snižena. Ne všechny HSP proteiny byly však přiřazeny výhradně ke shluku 3. Vedle některých HSP ze shluku 3 odhalila konfirmatorní analýza statistické snížení produkce u několika dalších proteinů. Protein pro rozdělení buňky (gi|89256974) je homolog FtsK proteinu *E. coli* (E-value 0,0), který se účastní dělení bakteriálních buněk [223]. Jeho nízká proteosyntéza nejspíše souvisí s pomalou proliferací bakterií *F. tularensis* při 25 °C. Příčina snížené produkce omega podjednotky DNA-řizené RNA polymerázy je (gi|89256817) pravděpodobně shodná. Tento protein byl spolu s ostatními identifikovanými podjednotkami DNA-řizené RNA polymerázy zařazen do shluku 2, který je charakteristický především snížením průměru $I_{(RN)}$ měřených po kultivaci ve stacionární fázi. U podjednotek této polymerázy dochází ke snížení rovněž během kultivace při 25 °C. Podjednotka D preproteínové 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 [224, 225]. 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. Jistá je zatím jeho regulace

pomocí MglA proteinu, který řídí expresi přibližně 100 genů, včetně všech genů v FPI [50]. 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 indukci v prostředí bez železa, které může být při dlouhotrvající kultivaci v médiu vyčerpáno [226]. 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 zařazeny 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 [53] 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.

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

Statisticky sníženou produkci vykázalo celkem 13 proteinů. Nejčastěji se jednalo o proteiny ze shluku 4. U proteinů tohoto shluku lze obecně vypořadovat negativní korelaci produkce se zvyšující se teplotou kultivace. K této skupině patří 2 podjednotky proteinu P glycin štěpícího systému (gi|89255889, gi|89255890). Úlohou tohoto systému je produkce jednouhlíkatých stavebních jednotek [227], 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 umístěny 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 vypožorovat 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 [209].

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

Proteiny se statisticky sníženou produkcí až na výjimky spadaly do shluku 2, mezi nimi bylo 11 ribozomálních proteinů a několik dalších, které se účastní transkripce nebo translace. Tento nález souvisí se zpomalením proliferace ve stacionární fázi. Snížení produkce proteinů se stejnou funkcí bylo pozorováno také během kultivace v médiu s nedostatkem zdroje železa, které rovněž vedlo k výraznému snížení proliferace [228]. 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, během kterého je potřeba stabilizovat konformaci mRNA [129, 130]. Protein tepelného šoku hsp 40 (gi|89255713) vykazoval výrazné snížení produkce ve stacionární fázi. Pravděpodobně proto byl shlukováním pomocí *k*-průměrů zařazen do shluku 2, a nikoli mezi ostatní HSP do shluku 3. U hypotetického proteinu FTL 0755 (gi|89256141) nebyl doposud nalezen homolog. Kvantitativním profilem své produkce spadá mezi shluk 2.

Svým významem se jako nejzajímavější jeví 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 [50]. Proto mají identifikované proteiny kódované v této oblasti genomu podobné kvantifikační profily. V souladu s tím byly shlukováním 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 [50]. 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 je v souladu se známými fakty o regulaci genové exprese během stacionární fáze růstu jako odpovědi na přítomnost oxidačního poškození [140, 141]. Hypotetický protein FTL 0317 není homologní s žádným proteinem s výjimkou jiného hypotetického proteinu u subtypu *tularensis* (lokus FTT 0825). Protein byl zařazen do shluku 5. Jeho regulace regulačním faktorem MglA je však nepravděpodobná [50]. 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 [229].

7 SOUHRNNÝ ZÁVĚR

Řešení zadání dizertační práce úspěšně vedlo ke splnění většiny vytyčených cílů. Jako ideální kultivační systém pro *F. tularensis* umožňující snadné monitorování růstu, dovolující selektivně měnit chemické složení a zaručující reprodukovatelný proteom kultur se ukázalo být chemicky definované tekuté médium připravené dle Chamberlaina. Tato půda proto byla využita při všech popsanych experimentech.

Jako optimální konfigurace proteomických experimentů pro sledování změn exprese, které nastávají již v krátkém čase, se ukázala být kombinace metabolického značení proteinů a 2D-PAGE s následnou autoradiografií. Tento postup úspěšně vedl k odhalení změn v proteomu bakterie *F. tularensis* indukovaných oxidativním stresem a nedostatkem železa v prostředí.

Pro analýzu proteomu bakterie *F. tularensis* v závislosti na teplotě a době kultivace bylo možné použít konfiguraci, která na rozdíl od metabolického značení s autoradiografií detekuje všechny proteiny přítomné v buňkách. Proto bylo v rámci této analýzy přistoupeno k zavedení nové „shotgun“ proteomické techniky iTRAQ. Tato kvantitativní technika patří mezi tzv. „gel-free“ proteomické metody. Je charakterizována zejména možností současné identifikace a kvantifikace proteinů pocházejících až ze čtyř různých vzorků. Použití iTRAQ metody spolu s explorativními statistickými analýzami dat vedlo k nalezení proteinů, jejichž produkce je za různých podmínek velmi podobně regulována. Při akceptaci hypotézy, která předpokládá, že geny se stejnou regulací jsou pro organismus potřebné při určitém biologickém ději, vedla iTRAQ analýza bakterie *F. tularensis* k nalezení skupiny proteinů s potenciální úlohou ve virulenci, na které může být v budoucnu soustředěna pozornost.

Pomocí výše popsanych metod a postupů byly u bakterie *F. tularensis* úspěšně provedeny proteomické analýzy odpovědi na oxidativní stres, nedostatek železa, teplotu kultivace 25 °C a 42 °C a prodlouženou dobu kultivace. Bohužel se nepodařilo úspěšně dokončit analýzu proteomu intracelulárně proliferující bakterie. Z důvodu časové a materiální náročnosti se analýza proteomu intracelulárně lokalizované bakterie stala tématem dizertační práce nového studenta, kterému byly předány všechny doposud získané informace a zkušenosti.

8 PŘÍLOHY

IDENTIFIKACE PROTEINŮ KOMBINACÍ PEPTIDOVÉHO MAPOVÁNÍ A FRAGMENTACE SULFONOVANÝCH PEPTIDŮ

JURAJ LENČO^{a,b} a JIŘÍ STULÍK^a

^aProteomové centrum pro studium intracelulárního parazitizmu bakterií, Vojenská lékařská akademie Jana Evangelisty Purkyně, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, ^bÚstav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové
jurasch@seznam.cz

Došlo 17.6.03, přepracováno 18.12.03, přijato 21.1.04.

Klíčová slova: identifikace proteinů, MALDI-TOF MS, rozpad za iontovým zdrojem

Úvod

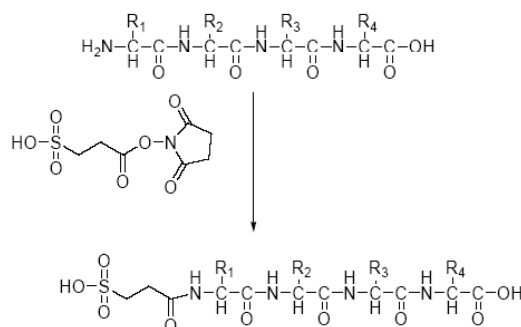
Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) je rutinně používaná technika pro identifikaci proteinů. Spolu s vysokorozlišovací dvojrozměrnou polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (2D-PAGE) patří ke klasickým metodám proteomiky.

Na přístrojích MALDI-TOF se identifikace proteinů provádí především metodou peptidového mapování (PMF – peptide mass fingerprinting, cit.¹). Metoda PMF je založena na enzymovém štěpení proteinu sekvenčně specifickou proteasou. Při enzymatickém štěpení trypsinem vznikají peptidy s argininem nebo lysinem na C-konci. Hmotnostní spektrum získané ze směsi proteolytických štěpů představuje specifickou charakteristiku proteinu. Měřenou veličinou je poměr hmotnost/náboj (m/z). Hodnoty m/z odečtené ze spektra lze v databázových programech porovnat s teoreticky vypočtenými hodnotami m/z proteolytických štěpů. Na základě shody experimentálních a teoretických hodnot lze ke spektru s určitou jistotou přiřadit protein.

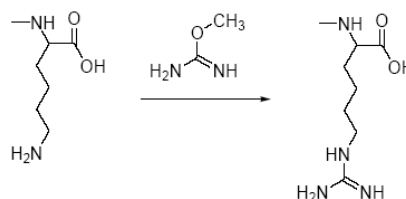
Jednoduchost a rychlost přípravy vzorků pro analýzu MALDI-TOF, rychlost samotné analýzy a snadné vyhodnocení spekter činí tuto metodu ideální pro rutinní identifikaci proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE. V některých situacích však není možné protein jednoznačně identifikovat pouze ze spektra proteolytických štěpů. V těchto případech je potřebné určit sekvenci aminokyselin v proteinu. Moderní hmotnostní spektrometry MALDI-TOF jsou schopny poskytnout informace o sekvenci aminokyselin v analýze PSD (post-source decay – rozpad za iontovým zdrojem)²⁻⁴. Analýzou PSD lze lokalizovat i některé posttranslační modifikace⁴. Pro usnadnění analýzy PSD jsou hmotnostní spektrometry některých výrobců vybaveny speciálními typy reflektoru, např. reflektorem se zakřiveným polem (curved-field

reflectron, cit.⁵).

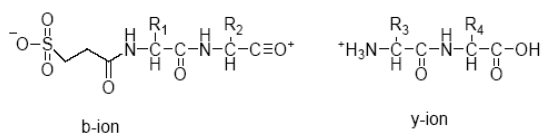
Fragmentace peptidu na aminokyseliny nebývá úplná a výsledná spektra PSD jsou často velmi komplikovaná. V posledních letech byly vypracovány techniky, které problémy spojené s analýzou PSD překonávají. Keough zavedením silně kyselých sulfoskupiny na N-koncovou aminoskupinu peptidu dosáhl dramatického zvýšení fragmentace. Při analýze PSD derivatizovaných peptidů byly generovány především γ - a β -ionty⁶, tedy ionty vznikající fragmentací peptidu v místě peptidové vazby. Výrazný pokrok přineslo zavedení ve vodě stabilního sukcinimidylesteru 3-sulfopropanové kyseliny, který je schopen připojit sulfoskupinu k N-koncové aminoskupině peptidu i ve vodním prostředí (obr. 1, cit.⁷). Aby u peptidů zakončených lysinem zůstala nederivatizována ϵ -aminoskupina lysinu, je nutné ji blokovat. Reakce s hydrogensulfátem *O*-methylisomočoviny je při zásaditém pH velmi selektivní (obr. 2, cit.⁸). Negativně nabitá sulfoskupina na N-konci dodává β -iontu celkový neutrální náboj (obr. 3), což znemožňuje jeho detekci. Výsledné spektrum PSD s chemicky asistovanou fragmentací (CAF) je tedy složeno výhradně z γ -iontů, což usnadňuje interpretaci spektra. Velmi výhodné je proteolytické štěpy adsorbovat na reverzní fázi C₁₈ např. v ZipTip špičkách. Při reakcích s takto imobilizovanými peptidy se lze vyhnout komplikacím s čištěním a izolací a celý postup je výrazně urychlen⁹.



Obr. 1. Příklad reakce N-koncové aminoskupiny tetrapeptidu se sukcinimidylesterem 3-sulfopropanové kyseliny; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 136,0 Da



Obr. 2. Schéma blokování ϵ -aminoskupiny lysinu přeměnou na homoarginin; při reakci se molekulová hmotnost peptidu zvyšuje o 42,0 Da



Obr. 3. Příklad fragmentace derivatizovaného tetrapeptidu; při fragmentaci vznikají výhradně b- a y-ionty; díky celkovému neutrálnímu náboji není b-ion detegovatelný

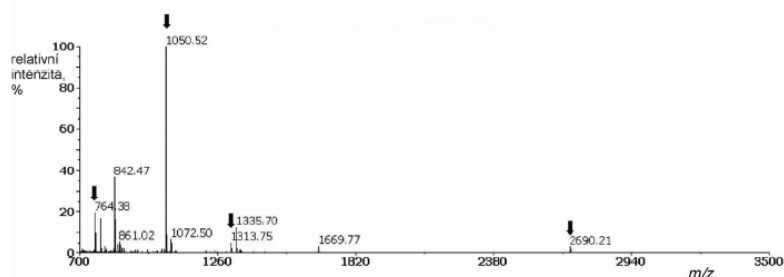
Pro analýzu proteinového profilu bakterie *Francisella tularensis* byl zvolen přístup využívající separační techniku 2D-PAGE a identifikaci MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií. Pro identifikaci byl použit program ProteinProspector verze 3.4.1 (University of California, San Francisco Mass Spectrometry Facility, USA) a volně dostupná databáze NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Experimentální část

Chemikálie a přístroje

Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda připravená na aparatuře Milli-Q PF plus od firmy Millipore (Bedford, USA) a acetonitril (AcN) stupně čistoty LiChrosolv® od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Kyselina trifluoroctová (TFA) spektrofotometrické čistoty byla vyrobena firmou Aldrich (Milwaukee, USA). Chemikálie a pufrы potřebné pro derivatizaci (modifikátor lysinu, činidlo pro CAF, ukončovací činidlo, pufr pro modifikátor lysinu, pufr pro CAF činidlo) byly součástí soupravy pro CAF-MALDI sekvenování Ettan™ (CAF-MALDI sequencing kit firmy Amersham Bioscience, Uppsala, Švédsko).

Jako matrice byly použity 4-hydroxy- α -kyan-skořicová kyselina (CHCA) a 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB). Obě matrice byly dodány v rekrystalizované formě firmou LaserBio Labs (Sophia-Antipolis Cedex, Francie). Analýza byla prováděna na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF Voyager-DE™ STR firmy Applied Biosystems (Framingham, USA).



Obr. 4. Spektrum PMF neznámého proteinu po trypsinovém štěpení; spektrum bylo změřeno v pozitivním reflektorném módu s matricí CHCA; šipky označují peptidy, kterými byl protein předběžně identifikován

Příprava vzorků pro analýzu

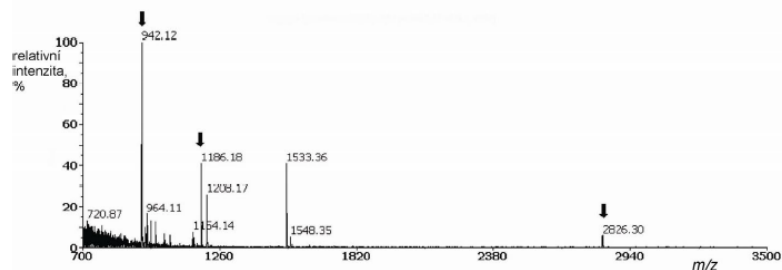
Proteiny určené pro identifikaci byly vyříznuty z gelu 2D-PAGE obarveném Coomassie modří G250. Po trypsinovém štěpení byly vzniklé peptidy z gelu extrahovány roztokem 50% AcN / 0,5% TFA. Extrakty byly ve vakuové centrifúze koncentrovány na přibližný objem 10 μ l. Měření PMF bylo prováděno s oběma matricemi. Použití DHB matrice obvykle vedlo k vyššímu počtu piků ve spektru. Jestliže byla identifikace nejednoznačná, vzorek byl derivatizován a podroben analýze PSD.

Derivatizace byla prováděna dle instrukcí výrobce s některými výjimkami. Přidáním 10% roztoku NaHCO₃ bylo pH extraktu posunuto na alkalickou stranu. K extrahovaným peptidům byl přidán pufr s modifikátorem lysinu. Reakce probíhala dvě hodiny při 37 °C. Poté byl přidán roztok 5% TFA, aby pH roztoku bylo kyselé. Peptidy s modifikovanými lysinovými zbytky byly navázány na reverzní fázi C₁₈ v ZipTip špičkách (Millipore Corp, Bedford, USA) a promyty roztokem 0,1% TFA. K imobilizovaným peptidům byl přidán roztok činidla pro CAF v pufru. Reakce byla zastavena pipetováním ukončovacího roztoku. Peptidy byly promyty roztokem 0,1% TFA a eluovány roztokem 50% AcN / 0,1% TFA. Pro analýzu PSD byla použita směs derivatizovaných peptidů s CHCA nebo DHB matricí. Protože derivatizace měnila molekulové hmotnosti peptidů, bylo nejdříve změněno spektrum v pozitivním reflektorném módu a z něj byl vybrán matečný ion určený k analýze PSD. Jestliže experimentálně zjištěná sekvence souhlasila s teoretickou sekvencí předběžně určenou při PMF, program Data Explorer verze 4.0 (PerSeptive Biosystems, Framingham, USA) piky fragmentů s tolerancí $\pm 0,5$ Da označil příslušnými y-ionty s indexem, který udával počet aminokyselin v daném fragmentu. Výhodou je, že při fragmentaci se odštěpuje i 3-sulfopropanová kyselina. Tím se nemění molekulové hmotnosti fragmentů, nemá-li však peptid na C-konci lysin. V tom případě narůstají molekulové hmotnosti všech fragmentů o 42,0 Da a v předběžné sekvenci je nutno nahradit lysin homoargininem.

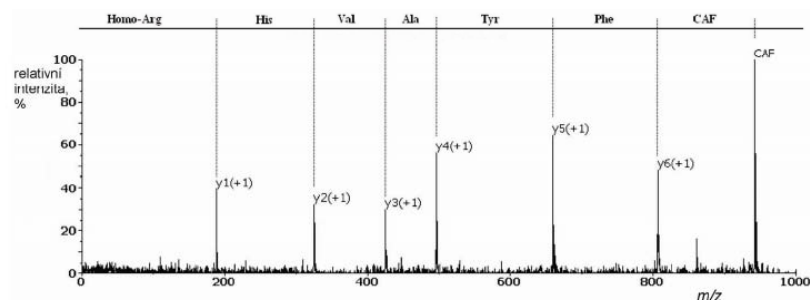
Výsledky a diskuse

Úspěšnost identifikace proteinů separovaných pomocí 2D-PAGE na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří např. množství a vlastnosti proteinu, typ barvení gelu 2D-PAGE, protokol pro enzymatické štěpení proteinu, příprava matrice a vzorku pro analýzu, kontaminace vzorku a jeho purifikace. Až na výjimky byly proteiny identifikovány metodou PMF. Jestliže byl protein identifikován menším počtem peptidů než pět, nebo aminokyseliny peptidů pokryly méně než 20%

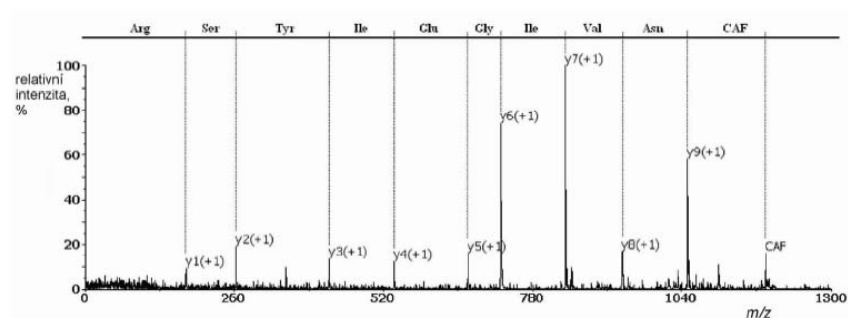
aminokyselinové sekvence proteinu a nebo hodnota isoelektrického bodu a molekulová hmotnost proteinu vykazovaly výrazné rozdíly proti hodnotám zjištěným z 2D-PAGE, byla identifikace potvrzena analýzou PSD s CAF, jak je ukázáno na příkladu. Spektrum PMF (obr. 4) bylo porovnáno se spektrem derivatizovaných peptidů (obr. 5). Rozdíly od původních hodnot byly 136 Da u piku 1186,18 a 2826,30 a 178 Da u piku 942,12. Rozdíl 178 Da svědčí o modifikaci původního lysinu na C-konci na homoarginin. Kompletní série y-iontů potvrdila předpokládanou sekvenci aminokyselin Phe-Tyr-Ala-Val-His-Lys v peptidu o původní hodnotě



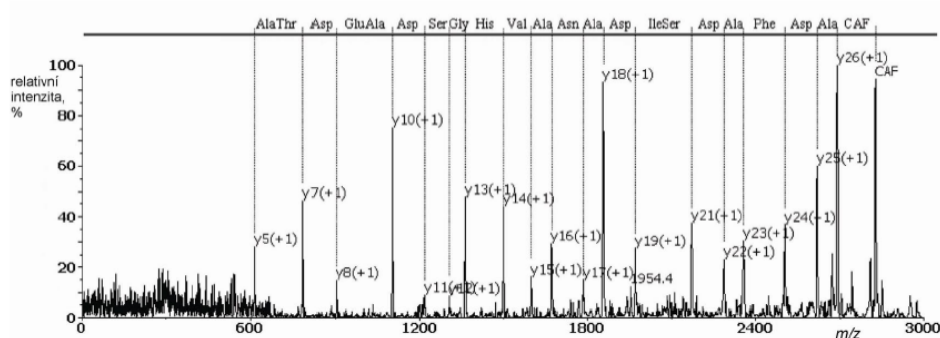
Obr. 5. Spektrum měřen po derivatizaci peptidů v pozitivním reflexionovém módu s matricí DHB; šipky značí peptidy, u kterých byla provedena analýza PSD



Obr. 6. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 942,1, matrice CHCA



Obr. 7. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 1186,2, matrice CHCA

Obr. 8. Spektrum PSD derivatizovaného peptidu o m/z 2826,3, matrice CHCA

m/z 764,38 (obr. 6) a Asn-Val-Ile-Gly-Glu-Ile-Tyr-Ser-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 1050,52 (obr. 7). Téměř kompletní série iontů y_{26} - y_5 potvrdila část předpokládané sekvence Ala-Asp-Phe-Ala-Asp-Ser-Ile-Asp-Ala-Asn-Ala-Val-His-Gly-Ser-Asp-Ala-Glu-Asp-Thr-Ala-Ala-Gln-Glu-Ile-Arg v peptidu o původní hodnotě m/z 2690,21 (obr. 8). Při běžném potvrzení identifikace je postačující určit část sekvence u jednoho peptidu a porovnat ji se sekvencí předběžně určenou při PMF. Zobrazený příklad tyto požadavky tedy výrazně přesahuje.

Slabé místo protokolu pro derivatizaci peptidů je manipulace se ZipTip špičkami. Zvládnutí této techniky vede k úspěšné derivatizaci vzorků. Derivatizované peptidy jsou velmi snadno fragmentovány, a proto pro výběr matečných iontů je někdy nutné použít tzv. „chladnou“ matici DHB. Matrice DHB se v některých případech osvědčila i pro vlastní analýzu PSD.

Závěr

PSD s CAF je technika určená pro sekvenování peptidů o neznámé primární struktuře (tzv. *de-novo* sekvenování) na hmotnostním spektrometru MALDI-TOF. V naší laboratoři našla uplatnění jako prvek, který výrazně zjednodušuje a ulehčuje získání a vyhodnocení spekter PSD pro potvrzení identifikace proteinů.

EttanTM souprava pro CAF-MALDI sekvenování byla laskavým darem od prof. C. R. Noe z Ústavu farmaceutické chemie Univerzity Vídeň. Tato práce je součástí projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt č. LN00A033).

LITERATURA

1. Henzel W. J., Watanabe C., Stults J. T.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 14, 931 (2003).
2. Spengler B., Kirsch D., Kaufmann R., Jaeger E.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6, 105 (1992).

3. Šedo O., Havel J.: *Chem. Listy* 97, 109 (2003).
4. Chaurand P., Leutenkirchen F., Spengler B.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 91 (1999).
5. Cornish T. J., Cotter R. J.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 8, 781 (1994)
6. Keough T., Youngquist R. S., Lacey M. P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7131 (1999).
7. Liminga M., Carlsson U., Larsson C., Maloisel J. L., Palmgren R., Keough T., Youngquist R. S.: *Proceedings of 49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, IL, May 27-31 2001*. Chicago 2001.
8. Keough T., Lacey M. P., Youngquist R. S.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 2348 (2000).
9. Hellman U., Bhikhabhai R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 1851 (2002).

J. Lenčo^{a,b} and J. Stulík^a (^a*Proteome Center for the Study of Intracellular Parasitism of Bacteria, Purkyně Military Medical Academy, Hradec Králové,* ^b*Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine, Charles University, Hradec Králové*): **Identification of Proteins by Combination of MALDI-TOF Peptide Mass Fingerprinting and Fragmentation of Sulfonated Peptides**

The MALDI-TOF MS is an ideal method for routine identification of proteins separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). However, in some cases the outputs from peptide mass fingerprinting (PMF) do not enable unambiguous identification of proteins. In such situation, determination of a partial amino acid sequence of the target protein would be extremely helpful in the PMF identification. Sequencing using MALDI-TOF post-source decay (PSD) usually generates complex spectra and the fragmentation is not complete. PSD sequencing with chemically assisted fragmentation allows to avoid these problems. Application of both methods in identification of proteins of *Francisella tularensis* is presented.

Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant Δ iglC1 + 2 by proteomics analysis

Juraj Lenco^{a,b,*}, Ivona Pavkova^b, Martin Hubalek^b, Jiri Stulik^b

^a Department of Medical Biology and Genetics, Charles University in Prague, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Simkova 870, 500 38 Hradec Kralove, Czech Republic

^b Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Trebesska 1575, 500 01 Hradec Kralove, Czech Republic

Received 19 January 2005; received in revised form 14 March 2005; accepted 21 March 2005

First published online 1 April 2005

Edited by R.A. Burne

Abstract

Francisella tularensis is a facultative intracellular pathogen. Its capacity to induce disease depends on the ability to invade and multiply within a wide range of eukaryotic cells, such as professional phagocytes. The comparative disinterest in tularemia in the past relative to other human bacterial pathogens is reflected in the paucity of information concerning the mechanisms of pathogenesis. Only a few genes and gene products associated with *Francisella* virulence are known to date. The aim of this study was to find and identify proteins of *F. tularensis* live vaccine strain induced in the presence of hydrogen peroxide, and to investigate the role of the IglC protein in the regulation of genes expressed upon peroxide stress. The [³⁵S]-radiolabelled protein patterns were examined for both the wild live vaccine strain and its Δ iglC1 + 2 mutant defective in synthesis of the IglC protein that was found to be strongly up-regulated during intracellular growth in murine macrophages in vitro and upon exposure to hydrogen peroxide. Globally, we found 21 protein spots whose levels were significantly altered in the presence of hydrogen peroxide in both the wild-type and mutant strains.

© 2005 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Francisella tularensis*; Oxidative stress; Quantitative proteomics; Two-dimensional electrophoresis

1. Introduction

Francisella tularensis, the causative agent of the zoonotic disease tularemia, is a small, Gram-negative coccobacillus. It is highly virulent for humans and other vertebrates. The usual initiation of human infection is transmission via bites by ticks or other vectors [1,2]. Based on its high infectivity and the possibility of aerosol dissemination, *F. tularensis* is designated as a Category A biological agent as published by the CDC,

Atlanta [3]. *F. tularensis* has been isolated from more than 250 animal species [2]. In addition to well-documented hosts such as mammals or arthropods, it was recently found to survive in protozoa [4]. Bacteria with such potential must harbor powerful molecular tools that enable adaptation to the environmental conditions encountered. The intracellular environment possibly presents the most adverse conditions to be overcome. To date, several proteins essential for intracellular proliferation have been discovered. Golovliov et al. reported over-expression of a 23 kDa protein, denoted IglC, during intracellular growth in murine macrophages. Synthesis of the IglC protein was also induced after exposure of *F. tularensis* to hydrogen peroxide,

* Corresponding author. Tel.: +420 973 253 223; fax: +420 495 512 451.

E-mail address: lenco@pmfhk.cz (J. Lenco).

but not after temperature shift to 42 °C [5]. The protein shows no homology to any known protein and the molecular mechanism of its function remains unclear. Experiments with the mutant strain defective in expression of IglC, denoted $\Delta\text{iglC1} + 2$, proved that IglC is necessary for growth inside macrophages [6]. Disruptions in the *mglAB* operon encoding MglA and MglB proteins, which display sequence similarity to the SspA and SspB proteins of *E. coli*, are also associated with poor growth in macrophages [7]. Interestingly, a recent study revealed that IglC might be one of the MglA-regulated proteins [8]. The genes encoding glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotranspeptidase, alanine racemase, ClpB protein and IglC protein were found to be interrupted in five transposon mutants of *F. tularensis* subs. *novicida* that were compromised in the ability to grow in murine macrophages in vitro [9]. Furthermore, comparative genomic and proteomic analyses of *F. tularensis* subspecies that differ in virulence to humans revealed additional set of genes and proteins unique to the highly virulent type A subspecies. These molecules might be considered as putative virulence factors [10,11]. The exploration of virulence mechanisms in *F. tularensis* can be accelerated now that the genome sequence of the Schu4 strain has been published [12].

In order to survive within professional phagocytes, intracellular pathogens must overcome the effect of stress conditions encountered in the hostile environment of the phagosome maturing to phagolysosome. Production of reactive oxygen intermediates represents one of the microbicidal strategies occurring during *F. tularensis* infection [13]. In the present work, we searched for proteins of *F. tularensis* LVS (live vaccine strain) and its mutant $\Delta\text{iglC1} + 2$ induced in the presence of hydrogen peroxide.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus, materials and bacterial strains

IEF was performed using a Multiphor II, Multitemp II thermostatic circulator, a Dry-Strip kit, pH 3–10 NL Immobiline DryStrips 18 cm long, and Pharmalytes pH 3–10 from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). The apparatus for casting (Protean II xi Multi-gel Casting Chamber), running (Protean II xi 2-D Multi-cell), and drying the gels (Model 583 Gel Dryer with Hydrotech Vacuum pump) were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). *F. tularensis* LVS (ATCC 29684) was purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The mutant strain of *F. tularensis* $\Delta\text{iglC1} + 2$ was kindly provided by I. Golovliov and A. Sjöstedt from the University of Umeå in Sweden.

2.2. Bacteria cultivation, radioactive labelling and sample preparation

F. tularensis LVS and mutant strain *F. tularensis* LVS $\Delta\text{iglC1} + 2$ were precultivated on McLeod agar plates supplemented with bovine haemoglobine and IsoVitaleX (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) at 37 °C and stored at 4 °C. Bacteria were inoculated into chemically defined medium prepared according to Chamberlain [14] and cultivated overnight by mild shaking at 37 °C. One ml of suspension with $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 0.10–0.12 was prepared by diluting the overnight culture. Bacterial cultures in exponential phase of growth ($\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 0.50–0.55) were washed, the medium was changed to medium lacking DL-methionine and hydrogen peroxide was added to final concentration 5 mM. After 5 min, the medium was supplemented with 200 μCi of [^{35}S]-methionine using Tran ^{35}S -Label (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) containing 70% of [^{35}S]-methionine. After 60 min, the labelling was stopped by adding 1 ml of ice-cold complete medium. The control experiments were performed with the same culture adding deionized water instead of hydrogen peroxide. The bacteria were pelleted and washed five times with ice-cold PBS. The pellets were resuspended fully in 20 μl of lysis buffer composed of 28 mM Tris-HCl, 22 mM Tris-Base, 0.3% SDS and protease-inhibitor cocktail. The tubes with suspension were doused in boiling water for 3 min and immediately cooled on ice. After treatment of lysates with benzonase, the radioactivity was determined using the Beckman LS 6000LL Liquid Scintillation System (Fullerton, CA, USA). The lysates were diluted in sample buffer comprising 6 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-Base, 1% v/v Pharmalytes pH 3–10 and 0.5% v/v Pharmalytes pH 8–10.5.

2.3. 2D-PAGE electrophoresis and autoradiography

Protein sample containing 5×10^6 dpm was diluted to a total volume of 350 μl with rehydration buffer prepared by adding 2 mM tributylphosphine and 0.003% w/v bromophenol blue to sample buffer. The mixture was loaded on 18 cm IPG strip with pH gradient 3–10 NL and then in-gel rehydration was performed overnight. For the second dimension, a 9–16% gradient SDS-PAGE was cast, the resolved IPG strip was placed on top and electrophoresis was performed. The final dimension of the resolved 2D-gel was 18 \times 20 cm. The gels were fixed with 10% methanol in 7% acetic acid, intensified with 2,5-diphenyloxazole in dimethyl sulfoxide, dried and exposed to RayMax Beta films (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA) for 5 days at –80 °C. In addition, gels using IPG strips with pH gradient 4–7 were prepared for better evaluation of regions with a high number of spots.

2.4. Image acquisition and software analysis

To confirm reproducibility, four experiments were performed with both strains. Three films of high quality with well focused spots for both stress and control experiments were digitalized using a CCD camera Image station 2000R (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). The gels were subjected to 2D image analysis by PDQuest 7.2.0. software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For both strains a matchset consisting of six images, three for stress and three for control experiments, were created. Only spots observed on all three gels of a replicated group were analyzed. With respect to the dynamic range of autoradiographic films, the optical density of spots were quantified. The values were normalized based on the total quantity in valid protein spots presented on the gel, and expressed as ppm. In order to detect up-regulated protein spots, qualitative criterion (protein spots observed on films originated from stressed samples only) and quantitative criterion with statistical test (at least twofold value over the control spot, Student's *t*-test with confidence level <0.01), were selected.

2.5. In-gel digestion

To cover the maximal number of spots to be identified, micropreparative gels using IPG strips with pH gradient 3–10 NL and 4–7 and stained with CBB or silver were prepared. For the micropreparative 2DE-gels, 500 µg of protein were loaded on 18 cm IPG strip 3–10 NL and pH 4–7. Protein concentration was determined by a modified bicinchoninic acid assay [15]. Spots of interest stained with the Colloidal Blue Stain Kit from Invitrogen (San Diego, CA, USA) were excised and destained with 200 µl of 100 mM Tris-HCl, pH 8.5 in 50% ACN for 20 min at 30 °C. The liquid was removed and the gel pieces were covered with 200 µl of equilibration buffer (50 mM NH₄HCO₃, 0.1% *n*-octyl-D-glucopyranoside, pH 7.8 in 5% ACN) for 30 min at 30 °C [16]. The gel pieces were vacuum dried, then swollen at 4 °C in a mixture consisting of 0.1 µg of sequencing grade trypsin in 0.5 µl of 50 mM acetic acid (Promega, Madison, WI, USA) and 4.5 µl of equilibration buffer. After 20 min, an additional 15 µl of equilibration buffer were added. The tubes with their gels pieces were placed in a thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) and shaken overnight at 37 °C. For CBB undetected spots, more sensitive silver stained micropreparative gels were further prepared. The gels were stained according to Shevchenko [17], except that the concentration of formalin in the developer was reduced to 0.02%, since formaldehyde was found to be the major compound in the silver staining protocol that negatively affects MALDI-TOF analysis [18]. Excised protein spots were destained with a mixture of 15 mM

potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulfate for 30 min at 20 °C. The gel pieces were then washed 4 times in 50% methanol/ 40% water/10% acetic acid for 10 min and the protocol for Coomassie Blue stained gels described above was followed.

2.6. Proteins identification

The mass spectra were recorded in reflector mode on a MALDI-TOF mass spectrometer Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) equipped with delayed extraction. For each protein, 0.5 µl of the peptide mixture was spotted onto the target plate, air-dried and covered with 0.5 µl of matrix solution consisting of 5 mg of 2,5-dihydroxybenzoic acid in 100 µl of 33% ACN in 0.3% TFA. The instrument was calibrated externally with a five-point calibration using Peptide Calibration Mix1. Additionally, spectra containing autolytic tryptic peptide masses were also calibrated internally. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting using MS-FIT tool of ProteinProspector 4.0.5. program (University of California, San Francisco Mass Spectrometry Facility). The obtained peptide masses were used to search against the *F. tularensis* Schu4 database [12]. The following parameters were used for protein identification: 100 ppm error, fixed carbamidomethylation of cystein residues, optional oxidation of methionine, optional formation of pyroglutamate at N-terminal Gln, optional protein N-terminus acetylation, and 1 possible missed cleavage site. Results were evaluated according to the MOWSE score, MALDI coverage, number of matched masses, and error range of matched masses. For hits with the MALDI coverage lower than 25%, protein identification was confirmed by LC-MS/MS analysis.

For nanoESI-MS/MS, the extracts were concentrated in a vacuum centrifuge and suitably diluted in buffer A (2% ACN, 98% water and 0.1% formic acid). The samples were injected into CapLC system (Waters, Manchester, UK) and first preconcentrated on µ-Precol-umn™ 300 µm × 5 mm filled with PepMap™ C18, 5 µm, 100 Å (LC-Packings, Sunnyvale, CA, USA). The peptides were eluted from the analytical column Nano-Ease™ 75 µm × 150 mm filled with Atlantis™ dC18, 3 µm (Waters) by gradient formed by buffer A and buffer B (98% ACN, 2% water and 0.1% formic acid) over 20 min at flow rate 200 nl/min. LC system was connected to Q-TOF Ultima™ API (Waters) by nanospray assembled by PicoTip needles (New Objective, Woburn, MA, USA). Data dependent acquisition was recorded for each protein. PLGS 2.0. software was used for data processing and searching against the *F. tularensis* Schu4 database [12].

The identified sequences were also subjected to the COGNITOR program, which assigned the proteins to the functional categories [19].

3. Results and discussion

In order to examine the response to oxidative stress, *F. tularensis* LVS and a mutant strain defective in the expression of the IglC protein were cultivated under standard conditions and in the presence of 5 mM hydrogen peroxide. Initially, we investigated whether differences in the protein patterns of hydrogen peroxide-treated bacteria could be detected by silver staining. No differences were found on gels stained by this conventional method (data not shown). Metabolic labelling of proteins synthesized in an exact time interval was found to be a more suitable method. The samples of radiolabelled whole-cell lysate proteins with activity 5×10^6 dpm were loaded onto IPG strips pH 3–10 NL, resolved on 2DE-gels and exposed to autoradiographic films (Fig. 1). To improve the resolution of overlapping protein spots we applied the narrow pH gradient 4–7 strips. The gels with narrow pH gradient enabled valid evaluation of regions with high numbers of spots and spots in clusters. The resulting images were analyzed by PDQuest 7.2.0. software. The protein spots whose levels were increased upon oxidative stress are listed in Table 1. In the LVS, 19 spots were found to be expressed more than twofold in bacterial cultures exposed to oxidative stress. Of them, 17 spots were previously found on gels during construction of *F. tularensis* 2D-PAGE database [20,21], and two spots were observed in stressed bacteria only. Similarly, 19 spots exhibiting twofold increase in their abundance were found in the

cultures of mutant strain exposed to hydrogen peroxide. Similarly, two spots were observed only in stressed bacteria. Based on chosen criteria for quantitative analysis and statistical significance, two proteins induced by oxidative stress (SSP 3004/4007 heat shock protein, 9.7/4.9 MW/pI variant and SSP 6310/6304 unknown) were found to be specific for the LVS and two spots (SSP 7402/7308 unknown and SSP 1007/1004, mixture of bacterioferritin and heat shock protein, 10.7/5.0 MW/pI variant) were found to be specific for the mutant strain. However, the counterparts of these strain-specific spots exhibited very similar quantitative profiles.

All but four spots were cut out from CBB-stained or silver-stained gels. In four cases, it was not possible to match precisely spots of interest on autoradiogram with spots on micropreparative gels. These spots were not cut out and in Table 1 are denoted as “not identified”. Proteins were identified using a peptide mass fingerprinting approach, or by LC-MS/MS in cases where the MALDI coverage was below 25%. The spot with SSP 1007 and 1004 in particular matchset contained a mixture of two proteins, bacterioferritin and heat shock protein. In this case, it is difficult to distinguish which protein was induced by oxidative stress. Nevertheless, in contrast to bacterioferritin, the additional charge variant of heat shock protein was identified among proteins whose levels were influenced by oxidative stress. It can be anticipated that the heat shock protein biosynthesis is regulated during the bacterial oxidative-stress response. Identification of several spots yielded the same protein

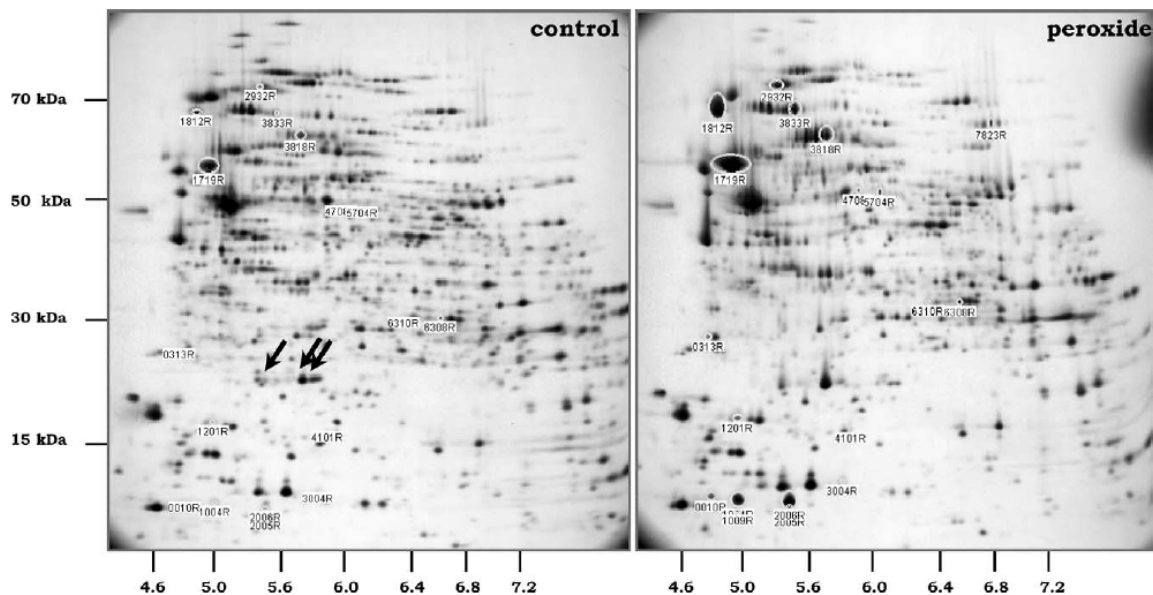


Fig. 1. Representative analytical 2DE-protein patterns of *F. tularensis* LVS control and hydrogen peroxide-treated cultures (raw images of autoradiograms of 5×10^6 dpm of [35 S]-methionine labelled proteins separated on 3–10 NL pH gradient). Spots induced in the presence of hydrogen peroxide are marked by SSP. The arrows denote spots for IglC protein.

Table 1

Protein spots induced in the presence of 5 mM hydrogen peroxide in the *F. tularensis* LVS and its mutant Δ iglC1 + 2, sorted by decreased quantity

^a	SSP ^b	MW (kDa)/ pI measured	MW (kDa)/ pI theoretical	Sequence coverage	Protein name; Accession No. ^c	Fold change LVS ^d
*	3818	64.1/5.7	72.3/5.5	33%	Chaperone Hsp90, heat shock protein HtpG, YP_169404	3.3
*	1719	60.6/5.0	57.4/5.0	60%	GroEL, CAA67358	3.7
*	1812	67.4/4.9	69.3/4.9	39%	Chaperone protein dnaK, YP_170225	3.7
*	3833	67.2/5.6	95.9/5.5	40%	ClpB protein, YP_170660	3.4
*	2006	9.4/5.4	10.2/5.5	43%	Chaperonin protein, groES, YP_170600	5.8
*	2932	71.1/5.5	95.9/5.5	34%	ClpB protein, YP_170660	2.7
*	1004	9.5/4.9	10.2/5.5	57%	Chaperonin protein, groES, YP_170600	7.9
*	7823	63.6/7.1			Not identified	ON
*	6308	32.1/6.6			Not identified	2.3
*	0010	9.9/4.7	10.2/5.5	57%	Chaperonin protein, groES, YP_170600	12.6
*	2005	8.8/5.4	10.2/5.5	33%	Chaperonin protein, groES, YP_170600	7.1
*	1201	18.0/4.9	19.7/5.1	62%	AhpC/TSA family protein, YP_169583	2.1
*	5704	52.0/6.1	51.2/5.9	23% ^e	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit, YP_169703	3.7
*	0313	39.8/4.7	22.1/4.8	41%	Chaperone protein grpE, YP_170226	5.5
*	4708	52.4/6.0	51.2/5.9	17% ^e	ATP-dependent protease, ATP-binding subunit, YP_169703	3.8
+	3004	9.7/4.9	16.7/5.6	40%	Heat shock protein, YP_170678	2.7
+	6310	32.6/6.3			Not identified	3.8
*	1009	9.3/4.9	10.2/5.5	57%	Chaperonin protein, groES, YP_170600	ON
*	4101	16.2/5.8	19.8/6.2	55%	ATP-dependent protease, proteasome- related peptidase subunit, YP_169704	4.5
o	7402	34.9/6.6			Not identified	3.1
o	1007	10.7/5.0	16.8/5.3 16.7/5.6	53% 31%	Bacterioferritin, AAT77116 Heat shock protein, YP_170678	4.5
*	1608	45.1/4.9	41.4/5.6	29%	Outer membrane associated protein, YP_169607	0.49 ^f

^a Spots that meet all the selected criteria for detection of up-regulated, respectively down-regulated protein spots in both, LVS and the Δ iglC1 + 2 mutant strain are marked with asterisks. Spots detected as specific for LVS strain (plus symbols) and Δ iglC1 + 2 mutant strain (circles) are further listed.

^b SSP from gels obtained from the LVS are listed.

^c Accession numbers according to NCBI nr database.

^d Ratio values are listed of normalized protein spot intensities obtained from bacteria exposed to hydrogen peroxide *versus* unstressed bacteria. Spots observed on gels prepared from stressed bacteria only are denoted "ON". Data for the LVS are shown.

^e Identification was confirmed by LC-MS/MS analysis, for both proteins 11 peptides were successfully fragmented.

^f An example of a down-regulated spot is presented.

species pointing to the presence of isoforms of the proteins. Identified proteins were sorted into COG functional categories. All proteins were classified in category O: post-translational modification, protein turnover and chaperones of proteins.

In contrast to Golovliov et al. [5], we were not able to demonstrate the prominent up-regulation of IgIC protein in the LVS during exposure to hydrogen peroxide with criteria first selected in PDQuest software. On the other hand, if the Student's *t*-test with confidence level 0.05 was performed, 12 other spots appeared as up-regulated. Among them, the acidic variant of IgIC protein was found (data not shown). The identified proteins are generally involved either in the stabilization of protein conformation and promotion of refolding or in the process of protein degradation. AhpC/TSA protein family contains proteins related to alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant. AhpC reduces

lipid peroxides originated during oxidative stress. The induction of the *ahpC* gene has been documented in *E. coli* upon treatment with hydrogen peroxide [22] and upon treatment with a superoxide-generating agent, methyl viologen [23]. As would be expected, chaperone DnaK and chaperonins GroEL and GroES, already identified by Ericsson et al. [24], were found at increased levels. In addition to DnaK, we also detected up-regulation of another member of the DnaK molecular chaperone system of *F. tularensis*, GrpE [25]. ClpB protein cooperates with members of the DnaK chaperone system in order to resolubilize protein aggregates [26]. The ClpB protein was previously found to be induced during cold shock in cyanobacterium *Synechococcus* sp. [27] and its gene was up-regulated during cold shock in *Listeria monocytogenes* [28]. The ClpB protein seems to play an important role in the intracellular growth of *F. tularensis* subs. *novicida* in murine macrophages [9].

The same effect was demonstrated in the mutant of *Listeria monocytogenes* [29]. HtpG protein constitutes a prokaryotic homologue of the eukaryotic Hsp90 protein. Induction of the protein or its gene under various stress conditions is well documented in a range of bacteria, for example in cyanobacterium *Synechococcus* sp. upon oxidative stress caused by high irradiance or action of methyl viologen [30], in *E. coli* upon acid shock [31] and in *Pseudomonas putida* during phenol-induced stress [32]. Proteins identified as subunits of ATP-dependent protease are related to HslU and HslV, subunits of two-component protease HslUV (also called ClpYQ) originally isolated from *E. coli* [33]. The sequence of the smaller subunit HslV is related to that of the proteasome β -subunit. Some of the up-regulated protein spots were previously identified as strong inducers of host antibody response. They encompass DnaK, GrpE, GroEL, GroES and ClpB that are immunoreactive with both murine and human sera, and heat shock protein HtpG that is immunoreactive only with murine sera [34,35].

The regulation of oxidative stress response is best characterized in *E. coli* [36,37]. The presence of hydrogen peroxide activates the OxyR system. Using protein–protein BLAST searching we looked for homologues of proteins encoded by *oxyR* and some genes of the OxyR regulon in the translated genome of the *F. tularensis* LVS (bbp.llnl.gov/bbrp/html/microbe.html). We found homologues of OxyR (*E*-value, 6e-49), hydroperoxidase I (*E*-value, 0.0) encoded by *katG*, alkyl hydroperoxide reductase subunit C (*E*-value, 3e-29) and subunit F (*E*-value, 7e-37) encoded by *ahpC* and *ahpF*, glutathione reductase (*E*-value, 1e-114) encoded by *gorA* and glutaredoxin I (*E*-value, 1e-10) encoded by *grxA*. There is no clear evidence of a DNA-binding protein homologue (*E*-value, 0.23) encoded by *dps*. Endogenous superoxide radicals or exogenous superoxide-generating compounds such as paraquat, activate in *E. coli* SoxRS system. It seems that the SoxRS system can also be activated under hydrogen peroxide stress [38]. The presence of SoxS (*E*-value, 6e-4) and of SoxR (*E*-value, 0.59) in the *F. tularensis* LVS genome is unclear. On the other hand, we found homologues of some proteins encoded by SoxRS-regulated genes in *E. coli*, for example the manganese superoxide dismutase (*E*-value, 1e-41) encoded by *sodA*, fumarase C (*E*-value, 1e-126) encoded by *fumC* and ferredoxin reductase (*E*-value, 2e-9) encoded by *fpr*. The presence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (*E*-value, 1.6) encoded by *zwf*, and of endonuclease IV (*E*-value, 0.29) encoded by *nfo* and flavodoxin (*E*-value, 0.43) encoded by *fldA* was not confirmed. There can be several reasons why we did not detect up-regulation of OxyR/SoxRS-regulated genes at the protein level under hydrogen peroxide stress: (i) It seems that some OxyR/SoxRS-regulated genes are missing from the *F. tularensis* LVS

genome. (ii) Some protein species remain undetectable during 2D-PAGE analysis because of well-known limitations. (iii) The increase in protein synthesis could be insufficient to satisfy criteria selected for detection of up-regulated spots.

We attempted to test whether the deletion of genes for the IglC protein had a statistically significant effect upon the up-regulation of proteins in response to oxidative stress. Using a normalized quantity of protein spots we determined the *peroxidelcontrol* ratios for each pair of gels. For 19 induced spots, three ratios for the wild strain and three ratios for the mutant strain were used as the input values for a non-pair Student's *t*-test. Ratios with a *p*-value below 0.05 were accepted as significantly different. Only AhpC/TSA family protein (SSP 1201 and 1101) was found as protein whose induction in the presence of hydrogen peroxide was significantly different in the wild and mutant strains. The average *peroxidelcontrol* ratio was 2.1 in the LVS and 3.4 in the mutant strain. Furthermore, we performed three independent experiments to compare the sensitivity of both strains to 5 mM hydrogen peroxide. After adding hydrogen peroxide, we measured the OD_{600 nm} and determined CFU at 0, 60, 120 and 180 min after treatment. We did not observe any significant difference in proliferation of the LVS and Δ iglC1 + 2 strains (data not shown).

Detection and identification of down-regulated protein spots was not a goal of this work. However, the results showed that some proteins were produced at decreasing levels in response to oxidative stress. For example, the spot for outer membrane associated protein meets the quantitative and statistical criteria (at least twofold value under control spot, Student's *t*-test with confidence level 0.01) for detection of down-regulated spots in both strains (see Table 1). For better evaluation of these changes, it is necessary to prepare all analytical gels using IPG strips with pH gradient 4–7, because many down-regulated protein spots occurred in regions with a high number of less-well resolved spots on 3–10 NL 2DE-gels.

4. Concluding remarks

We detected 21 protein spots and successfully identified 10 protein species that are synthesized at increased level by *F. tularensis* LVS in response to hydrogen peroxide. Furthermore, using a mutant strain we tested whether the IglC protein plays an important regulatory role in this reaction. By comparing the profiles of induced spots in LVS and mutant strains, we did not find any prominent differences. Using statistical analysis, only AhpC/TSA family protein was found to be induced significantly differently upon oxidative stress when comparing LVS and Δ iglC1 + 2 strains.

Acknowledgments

We would like to thank Igor Golovliov and Anders Sjöstedt from the University of Umeå in Sweden for kindly providing us with the *F. tularensis* LVS mutant strain Δ iglC1 + 2. We also thank Lenka Lukšiková, Lenka Kriesfalusyová, Jana Michaličková and Alena Firychová for their excellent technical assistance. This study was supported by grant No. LN00A033 from the Ministry of Education, Youth and Sport, Czech Republic.

References

- [1] Ellis, J., Oyston, P.C., Green, M. and Titball, R.W. (2002) Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 631–646.
- [2] Sjöstedt, A. (2004) Francisellaceae, genus I. *Francisella* In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner, D.J., Ed.), pp. 111–135. Springer Verlag, New York, NY.
- [3] 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. (2002) Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285, 2763–2773.
- [4] Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G. and Forsman, M. (2003) Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 600–606.
- [5] Golovliov, I., Ericsson, M., Sandstrom, G., Tarnvik, A. and Sjöstedt, 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.
- [6] Golovliov, I., Sjöstedt, A., Mokrievich, A. and Pavlov, V. (2003) A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 222, 73–80.
- [7] Baron, G.S. and Nano, F.E. (1998) MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol. Microbiol.* 29, 247–259.
- [8] Lauriano, C.M., Barker, J.R., Yoon, S.S., Nano, F.E., Arulandam, B.P., Hassett, D.J. and Klose, K.E. (2004) MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4246–4249.
- [9] Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K.K. and Nano, F.E. (2002) The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 215, 53–56.
- [10] Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Bystrom, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W. and Forsman, M. (2003) Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2924–2931.
- [11] Hubalek, M., Herychova, L., Brychta, M., Lenco, J., Zechovska, J. and Stulik, J. (2004) 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* 4, 3048–3060.
- [12] Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Halltorp, G., Johansson, D., Isherwood, R., Karp, P.D., Larsson, E., Liu, Y., Michell, S., Prior, J., Prior, R., Malfatti, S., Sjöstedt, A., Svensson, K., Thompson, N., Vergez, L., Wagg, J.K., Wren, B.W., Lindler, L.E., Andersson, S.G., Forsman, M. and Titball, R.W. (2005) The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat. Genet.* 37, 153–159.
- [13] Kovarova, H., Macela, A. and Stulik, J. (1990) The production of oxygen metabolites and their possible regulatory role in the course of tularemia infection. *Folia Microbiol.* 35, 413–422.
- [14] Chamberlain, R.E. (1965) Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 13, 232–235.
- [15] Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. (1989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180, 136–139.
- [16] Katayama, H., Nagasu, T. and Oda, Y. (2001) Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15, 1416–1421.
- [17] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- [18] Richert, S., Luche, S., Chevallet, M., Van Dorsselaer, A., Leize-Wagner, E. and Rabilloud, T. (2004) About the mechanism of interference of silver staining with peptide mass spectrometry. *Proteomics* 4, 909–916.
- [19] Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. and Koonin, E.V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucl. Acids Res.* 29, 22–28.
- [20] Herychova, L., Stulik, J., Halada, P., Macela, A., Kroca, M., Johansson, T. and Malina, M. (2001) Construction of a *Francisella tularensis* two-dimensional electrophoresis protein database. *Proteomics* 1, 508–515.
- [21] Hubalek, M., Herychova, L., Havlasova, J., Kasalova, I., Neubauerova, V., Stulik, J., Macela, A., Lundqvist, M. and Larsson, P. (2003) Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J. Chromatogr. B* 787, 149–177.
- [22] Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. and Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570.
- [23] Pomposiello, P.J., Bennik, M.H. and Dimple, B. (2001) Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J. Bacteriol.* 183, 3890–3902.
- [24] Ericsson, M., Tarnvik, A., Kuoppa, K., Sandstrom, G. and Sjöstedt, 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.
- [25] Zuber, M., Hoover, T.A., Dertzbaugh, M.T. and Court, D.L. (1995) Analysis of the DnaK molecular chaperone system of *Francisella tularensis*. *Gene* 164, 149–152.
- [26] Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732–13737.
- [27] Porankiewicz, J. and Clarke, A.K. (1997) Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 16, 5111–5117.
- [28] Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse II, P.D. and Wilkinson, B.J. (2002) Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 179, 1697–1705.
- [29] Chastanet, A., Derre, I., Nair, S. and Msadek, T. (2004) clpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is

- involved in virulence but not in general stress tolerance. *J. Bacteriol.* 186, 1165–1174.
- [30] Hossain, M.M. and Nakamoto, H. (2003) Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 46, 70–76.
- [31] Heyde, M. and Portalier, R. (1990) Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 57, 19–26.
- [32] Santos, P.M., Benndorf, D. and Sa-Correia, I. (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* 4, 2640–2652.
- [33] Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5808–5813.
- [34] Havlasova, J., Hernychova, L., Halada, P., Pellantova, V., Krejsek, J., Stulik, J., Macela, A., Jungblut, P.R., Larsson, P. and Forsman, M. (2002) Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics* 2, 857–867.
- [35] Havlasova, J., Hernychova, L., Brychta, M., Hubalek, M., Lenco, J., Larsson, P., Lundqvist, M., Forsman, M., Krocova, Z., Stulik, J. and Macela, A. (2005) Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics*, in press.
- [36] Storz, G. and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 188–194.
- [37] Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. and Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183, 4562–4570.
- [38] Manchado, M., Michan, C. and Pueyo, C. (2000) Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo. *J. Bacteriol.* 182, 6842–6844.



Proteomics analysis of the *Francisella tularensis* LVS response to iron restriction: induction of the *F. tularensis* pathogenicity island proteins IglABC

Juraj Lenčo^{1,2}, Martin Hubálek², Pär Larsson³, Alena Fučíková², Martin Brychta^{1,2}, Aleš Macela² & Jiří Stulík²

¹Department of Medical Biology and Genetics, Faculty of Medicine in Hradec Králové, Charles University in Prague, Šimkova, Hradec Králové, Czech Republic; ²Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Třebešská, Hradec Králové, Czech Republic; and ³Swedish Defence Research Agency, Cementvägen, Umeå, Sweden

Correspondence: Juraj Lenčo, Institute of Molecular Pathology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defense, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové, Czech Republic. Tel.: +420 973 253 223; fax: +420 495 512 451; e-mail: lenco@pmfhk.cz

Received 26 May 2006; revised 22 November 2006; accepted 30 November 2006.
First published online 15 January 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00595.x

Editor: Jorge Crosa

Keywords

Francisella tularensis; iron deficiency; 2D-PAGE; MS.

Abstract

Francisella tularensis is a highly virulent, facultative intracellular pathogen that causes tularemia in humans and animals. Although it is one of the most infectious bacterial pathogens, little is known about its virulence mechanisms. In this study, the response of *F. tularensis* live vaccine strain to iron depletion, which simulates the environment within the host, was investigated. In order to detect alterations in protein synthesis, metabolic labeling, followed by 2D-PAGE analysis was used. Globally, 141 protein spots were detected whose levels were significantly altered in the iron-restricted medium. About 65% of the spots were successfully identified using mass spectrometric approaches. Importantly, among the proteins produced at an increased level during iron-limited growth, three proteins were found encoded by the *igl* operon, located in the *F. tularensis* pathogenicity island I (FPI). Of these, the IglC and IglA proteins were previously reported to be necessary for full virulence of *F. tularensis*. These results, obtained at the proteome level, support and confirm recently published data showing that the *igl* operon genes are transcribed in response to iron limitation.

Introduction

Iron is an essential growth factor for both prokaryotic and eukaryotic cells. It acts as a cofactor or as a prosthetic component of proteins with various biological functions. Within prokaryotic organisms, there are only a few known examples of bacteria that do not seem to require iron for their growth, e.g. *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000) and *Lactobacillus* sp. (Imbert & Blondeau, 1998). It is well known that ferrous iron is oxidized to its highly insoluble ferric state under aerobic conditions and neutral pH. Moreover, free iron catalyzes the production of reactive oxygen species (ROS) and hence it can be extremely toxic for living cells. To overcome these issues, sophisticated systems for iron acquisition and its storage have been developed (Andrews *et al.*, 2003; Hentze *et al.*, 2004). Importantly, iron also plays a very specific role in the host–pathogen relationship (Schaible & Kaufmann, 2004). Using high affinity iron-binding proteins, the host reduces the concentration of free extracellular iron to 10^{-18} M and thereby makes the environment extremely hostile for pathogens. In addition, the

mammalian hosts use iron for production of microbicidal ROS through the Fenton reaction. These iron-associated antimicrobial mechanisms are considered to be integral components of the innate immunity. On the other hand, many pathogenic bacteria are capable of overcoming these conditions through direct acquisition of iron from the host's iron-binding proteins or haem. Furthermore, a low level of iron in the environment may act as a signal for the pathogen, resulting in the expression of virulence genes (Litwin & Calderwood, 1993). Some known virulence factors are controlled directly by the ferric uptake regulator (Fur). The Fur protein forms a complex with the ferrous ion and acts as a repressor of transcription by binding to a DNA sequence (i.e. the Fur box) located upstream from the iron-regulated gene. In Gram-negative bacteria, Fur regulates the transcription of genes involved in iron transport and virulence, but also in detoxification of ROS, acid tolerance, and various metabolic pathways (Andrews *et al.*, 2003).

Francisella tularensis is a facultative intracellular pathogen capable of multiplying in professional phagocytes as well as in other target cells like hepatocytes and endothelial cells

(Ellis *et al.*, 2002). Based on its high infectivity and possibility of aerosol dissemination, *F. tularensis* is classified as a Category A biological agent as published by CDC, Atlanta (Dennis *et al.*, 2001). However, to date, little is known about the molecular mechanisms of *F. tularensis* pathogenicity. Furthermore, contradictory results regarding the niche in which the bacteria survive and proliferate inside host cells have appeared in the literature. Studies performed by Fortier *et al.* suggested that *F. tularensis* replicates in an acidic vacuolar compartment (Fortier *et al.*, 1995). The authors concluded that localization in an acidic vacuole, which facilitates the accessibility of iron, is essential for *F. tularensis* growth. However, more recent studies have reported a rapid escape from the phagosome, which was found to be only mildly acidic, followed by cytosolic multiplication of the bacteria (Golovliov *et al.*, 2003b; Clemens *et al.*, 2004). This escape and proliferation of the bacteria is dependent on the induction of a 23 kDa protein, denoted IglC (Lindgren *et al.*, 2004). The gene encoding the IglC protein is a member of an operon with four ORFs (*iglABCD*) that is located in a *Francisella* pathogenicity island (FPI) (Nano *et al.*, 2004). It has been shown that a transposon insertion into either the *iglA* or *iglC* gene profoundly affects intramacrophage *F. tularensis* growth (Gray *et al.*, 2002). The importance of the IglC protein for full virulence of *F. tularensis* was supported by several other studies (Golovliov *et al.*, 2003a; Lauriano *et al.*, 2003). Furthermore, two regulatory proteins, MglA and MglB, are required for intracellular proliferation of *Francisella novicida* (Baron & Nano, 1998). The MglA protein positively regulates the expression of the *igl* as well as the *pdpA* and *pdpB* genes. The *pdpA* and *pdpB* are also located in the FPI and are essential for virulence (Lauriano *et al.*, 2004).

Although several genes potentially associated with iron metabolism were identified in the *Francisella* genome, the particular mechanism of iron acquisition remained enigmatic until recently. Very recent work described the production of a siderophore in different *F. tularensis* subspecies grown under iron-limited conditions (Sullivan *et al.*, 2006), and a potential siderophore biosynthetic gene cluster was identified (Sullivan *et al.*, 2006). Moreover, a transcriptomic analysis revealed several genes whose expression was altered in iron-starved *F. tularensis* LVS, and of these, the increased production of two known virulence factors (IglC and PdpB), was also demonstrated at the protein level (Deng *et al.*, 2006).

In this study, the effect of iron limitation directly on protein patterns of *F. tularensis* LVS has been investigated. Using a combination of 2D-PAGE and MS, 56 different proteins were identified whose levels were strongly affected by iron depletion. Importantly, the levels of the IglA, IglB, and IglC proteins were increased, thus demonstrating responsiveness of the *igl* operon to an iron-limited environ-

ment. The data support the information recently obtained at the mRNA level (Deng *et al.*, 2006).

Materials and methods

Apparatus, materials, and bacterial strain

IEF was performed using Multiphor II, a Multitemp II thermostatic circulator, a Dry-Strip kit, pH gradients 4–7 and 6–11, Immobiline DryStrips 18 cm long, and IPG buffers (pH 4–7 and 6–11) from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). The apparatus for casting (Protean II xi Multi-gel Casting Chamber), running (Protean II xi 2-D Multi-cell), and drying the gels (Model 583 Gel Dryer with Hydrotech Vacuum pump) were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). *Francisella tularensis* LVS (ATCC 29684) was purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD).

Bacteria cultivation, radioactive labeling, and sample preparation

Francisella tularensis was grown in iron-rich chemically defined medium prepared according to Chamberlain (1965), containing 0.0002% of ferrous sulfate heptahydrate (ICN Biomedicals, Aurora, OH). For iron-limitation experiments, *F. tularensis* was grown in an identical defined medium, but without the addition of inorganic iron and additionally supplemented with 100 μ M deferoxamine mesylate (Sigma, St Louis, MO).

Francisella tularensis LVS was inoculated from a deep-frozen prestock onto McLeod agar plates supplemented with bovine haemoglobin and IsoVitalEX (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) and grown at 37 °C for 48 h. This stock culture was stored at 4 °C up to four weeks. Before each experiment, the stock culture was inoculated into iron-rich medium and grown overnight with mild shaking at 37 °C. The next day, control and iron-depleted cultures (1 mL, OD_{600 nm} 0.05–0.06) were prepared by diluting the overnight culture with iron-rich and iron-limited media, respectively. After 5 h of incubation, bacteria cultures were harvested, washed, and the media were changed to iron-rich or iron-depleted media without methionine. After 5 min, 200 μ Ci of [³⁵S]-methionine was added (Tran ³⁵S-Label MP Biomedicals, Irvine, CA). After 60 min, the labeling in both cultures was stopped by addition of 1 mL ice-cold complete medium.

The hydrogen peroxide-treated culture was prepared according to the protocol described previously (Lenčo *et al.*, 2005). Briefly, the exponentially growing cells (OD_{600 nm} 0.55) were harvested, the medium was changed to medium without methionine, and hydrogen peroxide was added to a final concentration of 5 mM. Radioactive labeling was then performed as described above.

After labeling, the bacteria were harvested and washed five times with ice-cold PBS. The pellets were resuspended properly in 20 μ L of lysis buffer composed of 28 mM Tris-HCl, 22 mM Tris-Base, 0.3% sodium dodecylsulfate (SDS), and protease inhibitors (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim, Germany). The tubes were immersed in boiling water for 3 min and immediately cooled on ice. After treatment with benzonase, the radioactivity was determined using a Beckman LS 6000LL Liquid Scintillation System (Fullerton, CA). The lysates were diluted in sample buffer consisting of 9 M urea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-Base, 1.2% v/v DeStreak (Olsson *et al.*, 2002), 5% v/v Ampholytes, pH 9–11.

2-DE and autoradiography

A protein sample containing 5×10^6 dpm was diluted to a total volume of 350 μ L with rehydration buffer (6 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-Base, 1.2% v/v DeStreak (Olsson *et al.*, 2002), 0.003% w/v bromophenol blue, and 1% v/v IPG buffer, pH 4–7 or 2% v/v IPG buffer 6–11). Two gels of different pH ranges were prepared for each sample. The protein mixture was loaded on 18 cm IPG strips with pH gradient 4–7 and 6–11, and then in-gel rehydration was performed overnight. In the second dimension, an SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gradient 9–16% was cast, the resolved IPG strip was placed on top, and electrophoresis was performed. The final dimension of the resolved 2-DE gel was 18 \times 20 cm. The gels were fixed with 10% methanol in 7% acetic acid, intensified with the 2,5-diphenyloxazole in dimethyl sulfoxide, dried out, and exposed to RayMax Beta films (MP Biomedicals, Irvine, CA) for 5 days at -80°C .

Image acquisition and software analysis

In this study, three individual experiments were performed. Each experiment consisted of one control sample (prepared from bacteria grown in iron-rich medium) and one stressed sample (prepared from bacteria grown in iron-limited medium). Each sample was resolved on a gel with pH range 4–7 and a gel with pH range 6–11. Film images were digitalized using a CCD camera Image station 2000R (Eastman Kodak, Rochester, NY). The gels were subjected to image analysis using the PDQUEST 7.2.0. software (Bio-Rad, Hercules, CA). For each pH range, one matchset consisting of six films with well-focused spots was created (three for stressed and three for control samples). With respect to the dynamic range of autoradiographic films, the OD of spots was quantified. The values were normalized based on total quantity in valid protein spots presented on the gel, and expressed as p.p.m. In order to detect alterations in protein synthesis, a quantitative criterion was set up (at least twofold

change including qualitative changes, Student's *t*-test with confidence level < 0.01).

In-gel digestion

For the micropreparative 2-DE gels, 500 μ g of protein was loaded on an 18 cm IPG strip, pH gradients 4–7 and pH 6–11. Protein concentration was determined by a modified bicinchoninic acid assay (Brown *et al.*, 1989). Spots of interest were excised from gels stained with the Colloidal Blue Stain Kit (Invitrogen, San Diego, CA) and then destained with 200 μ L of 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, in 50% acetonitrile for 20 min at 30°C . The liquid was removed, and the gel pieces were covered with 200 μ L of equilibration buffer (50 mM NH_4HCO_3 , pH 7.8 in 5% acetonitrile) for 30 min at 30°C . The gel pieces were vacuum dried and then swollen at 4°C in a mixture consisting of 0.1 μ g of sequencing grade trypsin in 0.5 μ L of 50 mM acetic acid (Promega, Madison, WI) and 4.5 μ L of equilibration buffer. After 20 min, an additional 25 μ L of equilibration buffer was added. The tubes with the gel pieces were placed in a thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Germany) and shaken overnight at 37°C .

Protein identification

The mass spectra were recorded in the positive reflectron mode on a MALDI-TOF mass spectrometer Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA). For each protein, 0.5 μ L of the peptide mixture was spotted onto the target plate, air-dried, and covered with 0.5 μ L of matrix solution consisting of 5 mg of 2,5-dihydroxybenzoic acid in 100 μ L of 33% acetonitrile in 0.3% trifluoroacetic acid. The instrument was calibrated externally with a five-point calibration using Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, France). Additionally, spectra containing autolytic tryptic peptide masses were also calibrated internally. Proteins were identified by peptide mass fingerprinting using the MS-FIT tool of the PROTEINPROSPECTOR 4.0.5. program (University of California, San Francisco MS Facility). The peptide masses obtained were searched against the *F. tularensis* Schu4 database. The following parameters were used for protein identification: 100 p.p.m. error, fixed carbamidomethylation of cysteine residues, optional oxidation of methionine, optional formation of pyroglutamate at N-terminal Gln, optional protein N-terminus acetylation, and 1 possible missed cleavage site. Results were evaluated according to the MOWSE score, MALDI coverage, number of matched masses, and error range of matched masses. For nanoESI-MS/MS, the extracts were concentrated in a vacuum centrifuge and diluted in buffer A (2% acetonitrile, 98% water, and 0.1% formic acid). The samples were injected into the CapLC system (Waters, Manchester, UK) and pre-concentrated on μ -PrecolumnTM 300 $\mu\text{m} \times 5 \text{ mm}$

filled with PepMapTM C18, 5 μm , 100 \AA (LC-Packings, Sunnyvale, CA). The peptides were eluted from the analytical column NanoEaseTM 75 μm \times 150 mm filled with AtlantisTM dC18, 3 μm (Waters), by a gradient formed by buffer A and buffer B (98% acetonitrile, 2% water, and 0.1% formic acid) over 20 min at a flow rate 300 nL min^{-1} . The LC system was connected to a Q-TOF UltimaTM API (Waters). Data-directed acquisition was recorded for each protein. PLGS 2.0 software was used for data processing and searching against the *F. tularensis* SCHU4 database. The identified sequences were also subjected to COGNITOR program analysis, which assigns a functional category, the so-called clusters of orthologous groups (COG), to each protein (Tatusov et al., 2001).

Western blot analysis

2-DE gels with pH gradients 4–7 and pH 6–11 for both the control and the stressed samples were electroblotted onto a PVDF membrane and probed with a mouse monoclonal antibody directed against IglC protein (Moravian Biotechnology, Brno, Czech Republic). Peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin (Dako, Copenhagen, Denmark) was used as a secondary antibody. Reactive spots were visualized using CL-XPosure films (Pierce, Rockford, IL).

Results and discussion

Bacterial growth

In order to induce alterations in the *F. tularensis* LVS proteome, the bacteria were cultivated in chemically defined medium (Chamberlain, 1965) without the addition of inorganic iron and supplemented with the chelating agent deferoxamine mesylate at a final concentration of 100 μM . In contrast to recently published work (Deng et al., 2006), it was observed that prestarvation of the bacteria for iron was not necessary to achieve iron-limited growth. The growth of both the control and the iron-limited culture was identical for c. 3 h (Fig. 1). At this time, the bacteria in the iron-deficient medium started to slow down their growth. This phenomenon has previously been observed in *Helicobacter pylori* (Lee et al., 2004) and *Neisseria gonorrhoeae* (Ducey et al., 2005), and is in accordance with the idea that in an iron-restricted environment, the bacteria can utilize the intracellular iron stores for a certain time (Andrews et al., 2003). This intracellular iron pool should not be affected by the deferoxamine treatment, due to the hydrophilic nature of the chelator that prevents its diffusion into the bacterial cells. Based on the results obtained, it can be speculated that the cells are able to grow until the intracellular iron pool is exhausted.

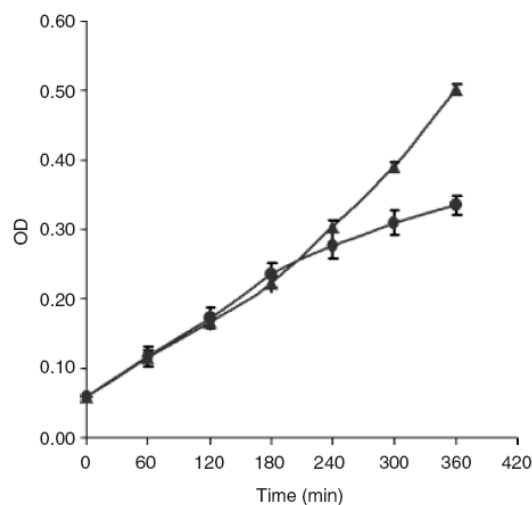


Fig. 1. Proliferation curves of *Francisella tularensis* LVS cultured in complete medium (triangles) and iron-depleted medium (circles). The graphs show means \pm SD of values from three independent experiments.

Labeling and 2-DE analysis

In order to visualize only those proteins synthesized in an exact time interval, metabolic labeling was used in this study. In all experiments, labeling was performed in the time interval from 300 to 360 min. In this time interval, the bacteria in the iron-deficient medium were still growing, but their proliferation rate was significantly reduced compared with that of the control bacteria. Combining autoradiography with the use of IPG strips with two different pH intervals, enabled us to detect proteins within the pH range of 4 to 11 with high resolution and high sensitivity (Fig. 2). Using the PDQUEST 7.2.0 software, this resulted in the detection of about 600 and 360 distinct spots on gels with pH gradient 4–7 and pH gradient 6–11, respectively. According to the criteria selected for detection of spots with altered quantity, 52 spots were found to be increased in production and 89 decreased in production in bacteria grown under iron-limiting conditions.

MS

Specific proteins were identified using a peptide mass fingerprinting approach. In the case of an unsuccessful identification, LC-MS/MS analysis was performed. This was done for about 50 proteins. In order to eliminate false matching of spots on films with spots on a micropreparative gel, all spots were identified at least twice from different micropreparative gels. Protein spots that were unambiguously identified are listed in Table 1, and their standard spot numbers (SSP) are shown on the images of 2-DE gels

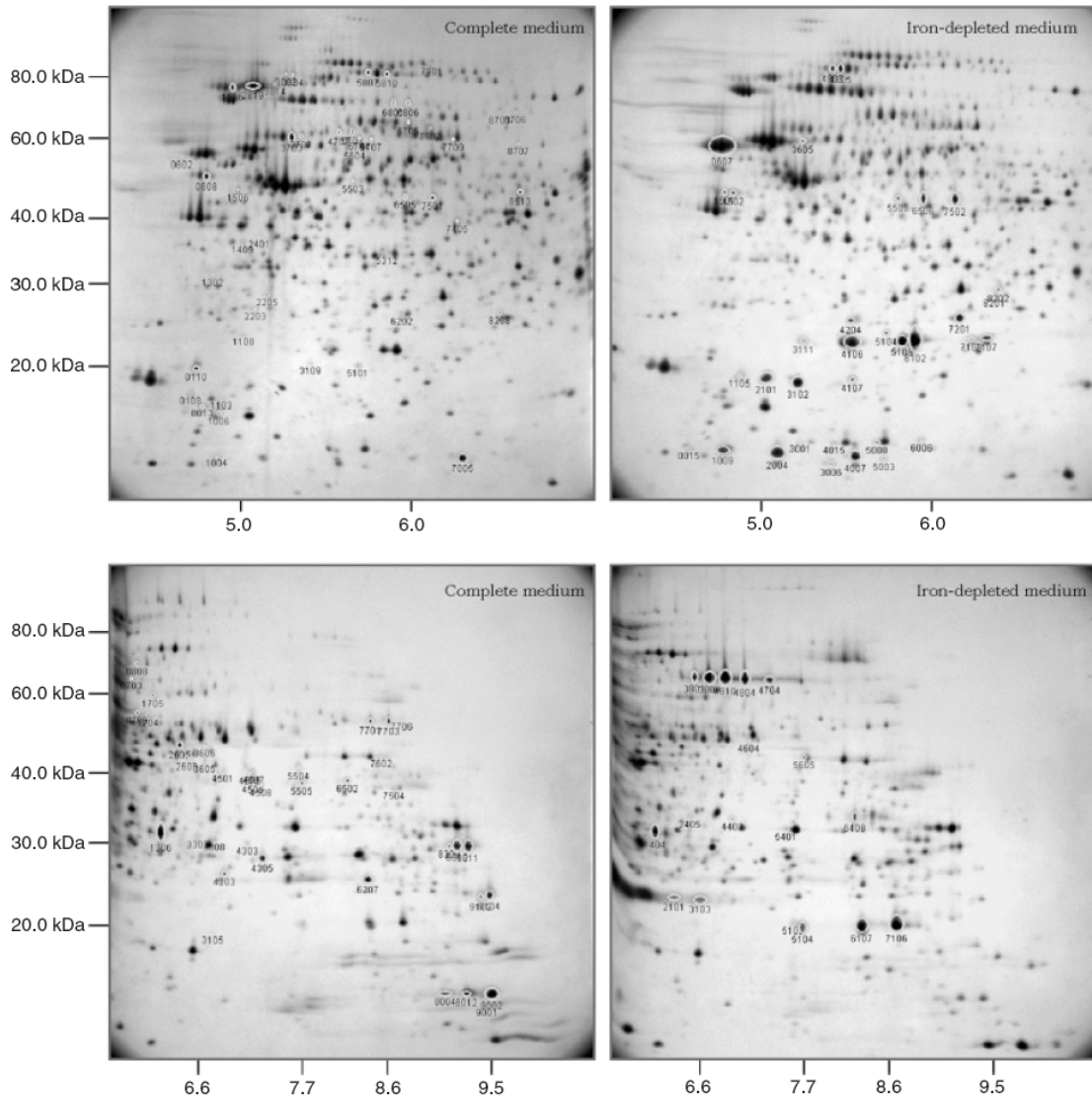


Fig. 2. Representative analytical 2DE-gels of whole cell extracts of *Francisella tularensis* LVS cultured in complete medium and iron depleted medium (raw images of autoradiograms of 5×10^6 dpm of [35 S]methionine labeled proteins separated on 4–7 and 6–11 pH gradient). Spots induced under given growth conditions are marked with their SSP.

(Fig. 2). Unfortunately, several spots remained either unidentified or their identity could not be confirmed repeatedly.

Proteins with increased production in response to iron restriction

Among the proteins with increased production under iron limitation, it was found that different IglC protein variants exhibited the most conspicuous increase. The increase in

production of the IglC protein was confirmed by Western blot analysis. This clearly documented a strong induction of several IglC charge variants after bacterial cultivation under iron-restricted conditions (Fig. 3). The IglC protein is one of several known virulence factors in *F. tularensis*. Its sequence shows no homology to any known protein and the particular function of this protein has not been revealed. Golovliov *et al.* observed overproduction of the IglC protein, previously denoted a hypothetical 23 kDa protein, during

Table 1. Proteins of *Francisella tularensis* that were unambiguously identified in spots with significant altered intensity caused by cultivation in an iron-restricted medium. Spots are sorted by COG category

SSP	Gel*	Acc. no.	COG†	Protein name	Theoretical MW/pl	Observed MW/pl	Spot intensity‡		Ratio§
							Control ± SD	Fe-starved ± SD	
4203	6–11	YP_169522		Hypothetical protein FTT0484	25.7/8.5	25.4/6.9	4288.7 ± 872.0	643.0 ± 217.3	0.15
4305	6–11	YP_169809		Cyanophycinase	29.3/7.1	26.9/7.3	7548.3 ± 596.0	3470.3 ± 396.3	0.46
4204	4–7	YP_169963		Hypothetical protein FTT0975	25.7/7.7	25.0/5.5	831.5 ± 118.0	3820.1 ± 991.4	4.59
7201	4–7	YP_169963		Hypothetical protein FTT0975	25.7/7.7	25.0/6.2	2875.7 ± 121.5	7382.5 ± 707.4	2.57
5104	6–11	YP_170470		Outer membrane protein 26	19.8/9.1	20.1/7.7	3184.8 ± 929.5	8255.0 ± 804.1	2.59
6107	6–11	YP_170470		Outer membrane protein 26	19.8/9.1	20.3/8.3	6220.8 ± 704.3	18022.9 ± 270.1	2.90
1501	4–7	YP_170612		Hypothetical protein FTT1707	44.6/4.8	41.4/4.8	718.0 ± 172.3	1799.1 ± 174.8	2.51
1502	4–7	YP_170612		Hypothetical protein FTT1707	44.6/4.8	41.4/4.9	1053.9 ± 397.8	2745.7 ± 125.9	2.61
3006	4–7	YP_170661		Hypothetical protein FTT1771	13.7/5.3	12.3/5.4	280.2 ± 1036	1790.0 ± 223.6	6.39
3111	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.9/5.3	ND	2671.2 ± 713.8	ON
4106	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.4/5.5	2807.0 ± 697.2	14817.4 ± 485.4	5.28
5108	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.4/5.8	7621.0 ± 1665.0	24113.2 ± 4221.1	3.16
6102	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.4/5.9	13124.4 ± 2430.1	28831.3 ± 2853.7	2.20
7107	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.5/6.3	904.6 ± 256.7	4550.1 ± 471.2	5.03
7109	4–7	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.8/6.2	ND	2268.3 ± 463.4	ON
2101	6–11	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.6/6.3	ND	11716.6 ± 2947.6	ON
3103	6–11	YP_170617		Intracellular growth locus, subunit C	22.4/5.9	22.4/6.6	522.3 ± 381.1	13310.1 ± 2865.4	25.48
0607	4–7	YP_170618	S	Intracellular growth locus, subunit B	58.7/4.7	55.6/4.8	18162.3 ± 1453.5	37479.3 ± 5149.2	2.06
5102	6–11	YP_170619	S	Intracellular growth locus, subunit A	22.4/8.8	20.5/7.6	ND	1624.5 ± 368.7	ON
6107	6–11	YP_170619	S	Intracellular growth locus, subunit A	22.4/8.8	20.3/8.3	6220.8 ± 704.3	18022.9 ± 270.1	2.90
7106	6–11	YP_170619	S	Intracellular growth locus, subunit A	22.4/8.8	20.4/8.7	10138.4 ± 1822.6	29709.8 ± 2118.4	2.93
0110	4–7	YP_170013	C	Inorganic pyrophosphatase	19.6/4.9	19.6/4.7	3567.1 ± 197.1	1359.3 ± 295.3	0.38
3802	4–7	YP_170419	C	Pyruvate dehydrogenase, E2 component	67.2/4.8	81.1/5.3	774.6 ± 82.0	262.0 ± 80.9	0.34
3804	4–7	YP_170419	C	Pyruvate dehydrogenase, E2 component	67.2/4.8	81.0/5.3	1109.7 ± 201.7	428.5 ± 132.4	0.39
5807	4–7	YP_170420	C	Pyruvate dehydrogenase, E1 component	100.1/5.8	81.6/5.7	3179.4 ± 359.6	1585.8 ± 250.5	0.50
5810	4–7	YP_170420	C	Pyruvate dehydrogenase, E1 component	100.1/5.8	81.2/5.8	3834.1 ± 452.2	1692.2 ± 408.9	0.44
8513	4–7	YP_169425	E	NAD(P)-specific glutamate dehydrogenase	49.1/6.5	44.0/6.6	2268.2 ± 125.0	703.2 ± 93.7	0.31
2605	6–11	YP_169425	E	NAD(P)-specific glutamate dehydrogenase	49.1/6.5	45.9/6.4	7668.3 ± 1279.8	3206.5 ± 681.8	0.42
3605	6–11	YP_169588	E	Polyamine transporter, ABC transporter	42.3/6.7	42.3/6.7	3758.9 ± 753.8	632.4 ± 41.6	0.17
5505	6–11	YP_169953	E	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	40.9/8.1	38.7/7.7	3393.6 ± 193.2	649.9 ± 352.7	0.19
6502	6–11	YP_169953	E	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	40.9/8.1	38.4/8.2	4003.1 ± 757.1	811.2 ± 435.1	0.20
4508	6–11	YP_170144	E	Gamma-glutamyltranspeptidase	65.1/8.5	38.3/7.3	2125.8 ± 252.6	329.0 ± 64.3	0.15
5003	4–7	YP_170170	E	Lactoylglutathione lyase	14.3/5.5	12.5/5.7	548.2 ± 149.0	1587.8 ± 278.2	2.90
2203	4–7	YP_169155	G	Triosephosphate isomerase	27.7/5.0	27.0/5.1	1018.6 ± 128.6	4187 ± 137.1	0.41
1506	4–7	YP_169183	G	Phosphopentomutase	45.7/5.1	44.6/5.0	867.9 ± 124.5	283.9 ± 137.0	0.33
0608	4–7	YP_169724	G	Enolase (2-phosphoglycerate dehydratase)	49.5/4.7	48.5/4.8	4850.4 ± 269.8	2031.6 ± 593.9	0.42
1806	4–7	YP_169730	G	Chitinase family 18 protein	83.1/5.0	76.6/5.0	8330.8 ± 1925.7	2152.7 ± 279.3	0.26
7701	6–11	YP_170315	G	Pyruvate kinase	51.7/8.6	51.3/8.4	5513.9 ± 453.4	1672.9 ± 579.4	0.30
7703	6–11	YP_170315	G	Pyruvate kinase	51.7/8.6	51.7/8.6	5565.8 ± 702.4	1800.6 ± 250.0	0.32
1404	6–11	YP_169789	I	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	27.8/6.0	30.7/6.0	3046.9 ± 166.1	11337.6 ± 1907.5	3.72
3302	6–11	YP_169789	I	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)	27.8/6.0	29.8/6.6	2056.5 ± 49.2	298.9 ± 95.3	0.15
4402	6–11	YP_170433	I	Acetyl-coenzyme A carboxylase, carboxyl transferase subunit alpha	35.4/7.7	32.5/7.0	335.4 ± 20.7	2357.6 ± 460.5	7.03
5508	4–7	YP_170461	I	3-ketoacyl-CoA thiolase	41.7/5.7	40.5/5.8	350.8 ± 260.1	2383.6 ± 537.2	6.80
6506	4–7	YP_170461	I	3-ketoacyl-CoA thiolase	41.7/5.7	40.5/5.9	2056.8 ± 124.5	6242.8 ± 214.6	3.04
7502	4–7	YP_170461	I	3-ketoacyl-CoA thiolase	41.7/5.7	40.6/6.1	2394.5 ± 197.4	6835.5 ± 223.9	2.85
4707	4–7	YP_169088	J	Aspartyl-tRNA synthetase	67.0/5.5	62.8/5.6	2618.0 ± 616.6	758.7 ± 194.6	0.29
5703	4–7	YP_169088	J	Aspartyl-tRNA synthetase	67.0/5.5	62.9/5.6	2524.0 ± 382.2	612.7 ± 262.3	0.24

Table 1. Continued.

SSP	Gel*	Acc. no.	COG†	Protein name	Theoretical MW/pI	Observed MW/pI	Spot intensity‡		Ratio§
							Control ± SD	Fe-starved ± SD	
5704	4-7	YP_169253	J	Lysyl-tRNA synthetase	66.2/5.5	60.8/5.7	875.9 ± 177.0	300.6 ± 100.2	0.34
5707	4-7	YP_169253	J	Lysyl-tRNA synthetase	66.2/5.5	60.6/5.8	1259.9 ± 154.9	327.7 ± 147.2	0.26
6705	4-7	YP_169824	J	Threonyl-tRNA synthetase	72.3/5.9	65.7/6.0	1773.8 ± 259.2	818.9 ± 66.2	0.46
5503	4-7	YP_170531	J	CysteinyI-tRNA synthetase	53.1/5.3	47.0/5.7	993.4 ± 35.8	349.1 ± 58.4	0.35
9002	6-11	YP_169206	J	50S ribosomal protein L11	15.2/9.5	15.3/9.5	18009.0 ± 3259.7	4226.2 ± 1518.4	0.23
8309	6-11	YP_169207	J	50S ribosomal protein L1	24.5/9.5	28.5/9.1	3778.3 ± 639.7	874.7 ± 476.8	0.23
8310	6-11	YP_169207	J	50S ribosomal protein L1	24.5/9.5	28.6/9.2	14107.0 ± 1384.2	2857.5 ± 977.6	0.20
8311	6-11	YP_169207	J	50S ribosomal protein L1	24.5/9.5	28.7/9.3	15830.9 ± 1064.3	4047.5 ± 751.4	0.26
9102	6-11	YP_169374	J	50S ribosomal protein L3	22.5/9.6	22.4/9.4	4886.7 ± 614.1	560.3 ± 182.3	0.11
9104	6-11	YP_169374	J	50S ribosomal protein L3	22.5/9.6	22.5/9.5	11489.3 ± 300.7	1449.4 ± 684.1	0.13
3703	4-7	YP_169244	J	30S ribosomal protein S1	61.6/5.2	61.5/5.3	6152.2 ± 466.8	2776.9 ± 511.5	0.45
3707	4-7	YP_169244	J	30S ribosomal protein S1	61.6/5.2	61.6/5.4	1526.3 ± 163.2	558.8 ± 54.0	0.37
8004	6-11	YP_169388	J	30S ribosomal protein S8	14.4/9.4	15.3/9.1	7332.1 ± 1237.5	1618.9 ± 324.0	0.22
8012	6-11	YP_169388	J	30S ribosomal protein S8	14.4/9.4	15.3/9.3	14326.5 ± 2258.8	3845.2 ± 88.8	0.27
7005	4-7	YP_170043	J	30S ribosomal protein S6	13.1/6.0	13.0/6.3	6841.6 ± 1757.0	2091.6 ± 234.4	0.31
3109	4-7	YP_169365	J	Ribosome recycling factor	20.5/5.5	20.2/5.4	476.2 ± 56.2	237.7 ± 33.6	0.50
5101	4-7	YP_169365	J	Ribosome recycling factor	20.5/5.4	19.9/5.7	1489.5 ± 106.0	703.7 ± 117.4	0.47
2819	4-7	YP_169372	J	Elongation factor G (EF-G)	77.7/5.0	77.0/5.1	27832.9 ± 4467.1	8329.7 ± 1505.9	0.30
6801	4-7	YP_169715	J	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75.4/5.6	71.5/5.9	3380.1 ± 780.6	874.9 ± 201.2	0.26
6806	4-7	YP_169715	J	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	75.4/5.6	71.4/6.0	2786.6 ± 544.8	534.7 ± 196.7	0.19
2205	4-7	YP_169860	J	Ribonuclease PH	25.5/5.0	28.9/5.2	1468.2 ± 45.9	298.5 ± 57.9	0.20
1004	4-7	YP_170290	J	Translation initiation inhibitor	13.7/5.5	15.9/4.9	704.8 ± 93.4	ND	OFF
0013	4-7	YP_170266	K	Transcriptional elongation factor	17.7/4.8	16.5/4.8	1578.3 ± 360.2	520.4 ± 133.1	0.33
7501	4-7	YP_170384	K	Transcription termination factor Rho	47.0/6.0	42.6/6.1	2746.2 ± 321.7	649.6 ± 195.5	0.24
4107	4-7	YP_170646	L	Single-strand binding protein	17.5/5.6	18.1/5.5	1377.2 ± 210.5	2784.5 ± 151.5	2.02
4505	6-11	YP_169628	M	1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase	43.9/8.0	40.0/7.2	1917.6 ± 455.7	502.6 ± 164.1	0.26
4303	6-11	YP_169632	M	Beta-lactamase	32.0/7.7	28.9/7.2	1068.4 ± 160.9	458.4 ± 111.9	0.43
5605	6-11	YP_170014	M	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Penicillin-binding protein) family protein	48.1/8.6	43.4/7.7	ND	1595.9 ± 275.7	ON
7102	4-7	YP_170549	M	Lipoprotein-releasing system, subunit A, outer membrane lipoproteins carrier	23.5/7.7	19.4/6.1	331.2 ± 100.6	ND	OFF
1105	4-7	YP_169583	O	AhpC/TSA family protein	19.7/5.1	18.2/4.9	279.7 ± 82.2	2100.6 ± 400.6	7.51
2101	4-7	YP_169583	O	AhpC/TSA family protein	19.7/5.1	18.0/5.1	1994.9 ± 213.8	11713.2 ± 2629.4	5.87
3102	4-7	YP_169583	O	AhpC/TSA family protein	19.7/5.1	17.9/5.2	4793.1 ± 881.0	12780.3 ± 2124.7	2.67
0015	4-7	YP_170600	O	Chaperonin protein, groES	10.2/5.5	13.0/4.6	ND	783.8 ± 232.7	ON
1009	4-7	YP_170600	O	Chaperonin protein, groES	10.2/5.5	12.9/4.8	ND	5595.4 ± 1078.2	ON
2004	4-7	YP_170600	O	Chaperonin protein, groES	10.2/5.5	13.0/5.1	3872.0 ± 995.3	13333.7 ± 813.0	3.44
4007	4-7	YP_170600	O	Chaperonin protein, groES	10.2/5.5	12.7/5.6	4140.5 ± 1688.9	10355.0 ± 1193.4	2.50
4803	4-7	YP_170660	O	ClpB protein	95.3/5.5	80.1/5.4	839.0 ± 244.0	3100.8 ± 458.2	3.70
4805	4-7	YP_170660	O	ClpB protein	95.3/5.5	80.0/5.5	2121.7 ± 277.3	5013.2 ± 846.1	2.36
5008	4-7	YP_170678	O	Heat shock protein	16.7/5.6	13.6/5.7	ND	1811.2 ± 400.1	ON
8202	4-7	YP_170100	P	Rhodanese-like family protein	28.2/6.5	28.3/6.4	651.4 ± 161.8	1892.4 ± 248.5	2.91
3001	4-7	YP_170379	P	Hypothetical protein FTT1441	18.5/5.5	13.6/5.3	204.1 ± 42.3	452.9 ± 37.3	2.22
4015	4-7	YP_170379	P	Hypothetical protein FTT1441	18.5/5.5	13.5/5.4	ND	725.4 ± 66.3	ON
5104	4-7	YP_170091	Q	Isochorismatase hydrolase family protein	21.3/5.4	23.6/5.7	654.7 ± 195.4	2089.9 ± 46.3	3.19
6207	6-11	YP_170324	QR	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein) reductase	26.3/8.5	24.1/8.4	10085.9 ± 900.5	3101.9 ± 844.9	0.31

*Interval indicates the pH range of gel on which the spot was detected.

†Categories according to COGNITOR program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/palox.cgi?fun=all>). Several proteins were not assigned to any category.

‡Spot intensity was calculated as a mean ± SD of values from three independent experiments. Spots not detected on gels prepared from control samples or iron-starved bacteria are denoted 'ND'.

§Values were calculated as ratios Fe-starved/Control from means of spot intensities. Spots observed on gels prepared from iron-starved bacteria only are denoted 'ON', and vice versa spots observed in control samples only are denoted 'OFF'.

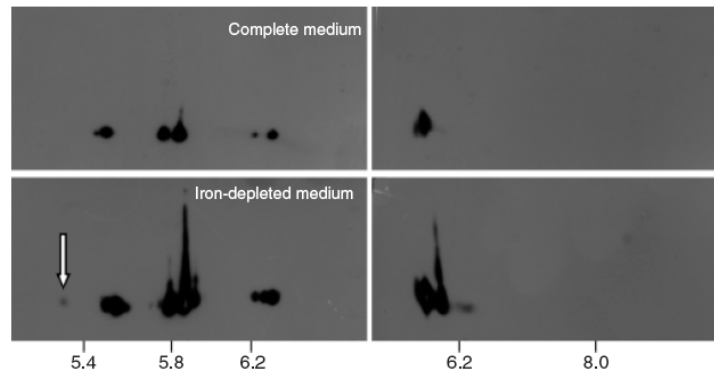


Fig. 3. Western blot analysis of IglC protein (raw images of Western blots of IglC isoforms resolved on 4–7 and 6–11 pH gradient). All isoforms are clearly induced by iron-restriction, and moreover, a new acidic isoforms of IglC is detectable in iron-restricted bacteria (white arrow).

intracellular growth of *F. tularensis* in murine macrophages (Golovliov *et al.*, 1997). So far, various studies have established that IglC is necessary for the ability of *F. tularensis* to survive in phagocytes (Golovliov *et al.*, 2003a), to escape from the phagosome (Lindgren *et al.*, 2004) and for the induction of apoptosis in host cells (Lai *et al.*, 2004). Recently, it has been reported that IglC is involved in down-regulation of the host proinflammatory response after internalization of the bacteria (Telepnev *et al.*, 2005). The gene encoding the IglC protein is located in the possible *igl* operon, which is comprised of four genes. The operon is located in the duplicated FPI (Nano *et al.*, 2004). It has been demonstrated that *iglA*, and the genes regulating expression of the *igl* operon, *mglA*, and *mglB*, are also required for full virulence (Baron & Nano, 1998; Gray *et al.*, 2002; Santic *et al.*, 2005). In addition to the up-regulation of the IglC protein, increased production of the IglA and IglB proteins was observed in response to iron restriction. Unfortunately, the product of the *iglD* gene could not be detected on the 2-DE gels. Therefore, it could not be determined whether iron restriction has an effect on its production. The genes in the *igl* operon seem to be transcribed as a polycistronic mRNA, because the expression of all genes was abolished in a *mglAB* mutant strain (Lauriano *et al.*, 2004). Thus, it would be anticipated that the level of all four proteins, IglA, IglB, IglC, and IglD, is influenced by iron. Indeed, this expectation was confirmed on the mRNA level by Deng *et al.* (2006). Moreover, the authors found putative Fur boxes upstream of *iglA* and *iglC* in the *F. tularensis* Schu4 genome, suggesting direct regulation of their expression by the iron level inside the cells.

Strong induction of IglC in *F. tularensis* LVS has also been documented upon hydrogen peroxide stress (Golovliov *et al.*, 1997). Recently, *F. tularensis* ssp. *tularensis* has been shown to respond similarly to this stressor (Twine *et al.*, 2006). However, these authors only found one of several

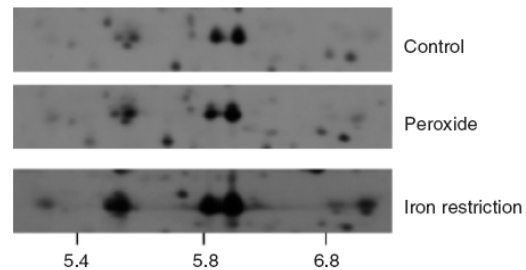


Fig. 4. Comparison of IglC protein induction upon oxidative stress and iron-restriction. Sample treated with hydrogen peroxide was prepared as described in the text.

spots for the IglC protein to be increased. In a previous study, an increase in the synthesis of the IglC protein in response to hydrogen peroxide stress could not clearly be demonstrated (Lenco *et al.*, 2005). Therefore, in the present study, it was attempted to repeat this experiment using an IPG strip with a pH gradient of 4–7. As mentioned above, in an iron-restricted culture, a strong induction of the production of several IglC forms was detected on the gel (Fig. 4). In contrast, on the gel prepared from hydrogen peroxide-treated bacteria, none of the spots representing the IglC protein were found to be more intense in comparison with the control sample. Thus, the effect of hydrogen peroxide on the production of the IglC protein still remains uncertain despite an improved resolution of the 2D-PAGE gels used in this study.

Besides products of the *igl* operon, the level of one additional protein located in the FPI, hypothetical protein 1707, was influenced by iron depletion. Two charge variants of this protein were found in increased levels under the iron-depleted conditions. The function of the protein is unknown. It exhibits sequence similarity to the hypothetical protein PFB0765w of *Plasmodium falciparum* (BLAST *E*-value 7×10^{-5}).

The results show a significant increase in the synthesis of two ClpB variants after iron deprivation. A transposon mutant of *F. tularensis* ssp. *novicida* with a disrupted *clpB* gene has been shown to exhibit poor intramacrophage growth (Gray *et al.*, 2002). ClpB has also been described to participate in the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*, and this effect was apparently not due to the defect in general stress resistance (Chastanet *et al.*, 2004).

Only two proteins with a role in iron acquisition and storage were found in the set of proteins affected by iron depletion. The induction of hypothetical protein 1441, a homologue of bacterioferritin (BLAST *E*-value 1e-42), was not clearly demonstrated, because only two spots with low intensity had increased levels, while the others, approximately fivefold more intense spots, remained unchanged. No changes in the quantity of bacterioferritin have been reported at the mRNA level (Deng *et al.*, 2006). The primary function of bacterioferritin is to accumulate and store iron that can be used later during growth in an iron-restricted environment. Thus, rather than an increased production, bacterioferritin was expected to be produced at a lower level, as documented in other bacteria. Lee *et al.* observed decreased synthesis of ferritin in *H. pylori* in iron-depleted medium and showed that its synthesis increased when the medium was supplemented with excess FeCl₂ (Lee *et al.*, 2004). Likewise, the gene encoding bacterioferritin in *Pseudomonas aeruginosa* displayed an increased expression in an iron-starved culture subsequently treated with an excess of FeCl₃ (Palma *et al.*, 2003). A 3.19-fold up-regulation was detected of an isochorismatase hydrolase family protein, which possibly performs its function in the beginning of the metabolic pathway leading to the synthesis of siderophores. Thus, an increase in siderophore production may be suggested. Siderophore production by *F. tularensis* has recently been demonstrated by two independent analyses (Deng *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2006); however, no homologue of the TonB component (using BLAST search) of a transport system for iron-siderophore complexes (Moeck & Coulton, 1998) has been found in the *F. tularensis* genome.

Overproduction of proteins involved in detoxification of ROS was also revealed in this analysis. We detected strong induction of three charge variants of an AhpC/TSA family protein. The recently reported DNA microarray analysis also revealed a slight increase in its mRNA levels under iron deprivation (Deng *et al.*, 2006). The function of AhpC/TSA proteins is to reduce substrates originating under oxidative stress. This protein was recently found to be up-regulated in response to peroxide stress in *F. tularensis* LVS (Lenco *et al.*, 2005). In addition, after decreasing the quantitative criterion for detection of altered spots from twofold to 1.7-fold, the induction of two peroxidase/katalase (YP_169735) variants was observed. These findings are also supported by data from the DNA microarray analysis (Deng *et al.*, 2006).

However, similar studies in *H. pylori* and *Pseudomonas putida* KT2440 reported down-regulation of proteins involved in radical detoxification (Heim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Another enzyme produced at a higher level was lactoylglutathione lyase, which plays a role in detoxification by catalyzing the conversion of cytotoxic methylglyoxal to S-lactoylglutathione.

Some proteins that function as molecular chaperones and proteins involved in protein turnover, including the ClpB protein, were positively affected by iron depletion. Increased levels of four GroES protein variants were observed but induction of its partner GroEL (YP_170601) was not detected. However, it is believed that the PDQUEST program failed to quantify the GroEL spots accurately due to their saturation. Moreover, an induction of GroEL was evident on visual inspection of the 2 DE gels. When the quantitative criterion was set to 1.7-fold change, an increased level of two chaperone, Hsp90 (YP_169404) spots was detected. An increased synthesis of the single-strand binding protein, which may be involved in DNA repair, was also noted. Increased synthesis of this protein is observed typically under heat shock and oxidative stress. The findings in this study suggest the existence of protein unfolding and damage during the growth of *F. tularensis* LVS in iron-depleted medium. The degradation or damage may simply be associated with growth in the stationary phase and not characteristic for the response to iron-restriction. An increase in the expression of the genes encoding GroEL, GroES, or for DnaK, all of which have been observed previously to be down-regulated during iron-starvation conditions (Deng *et al.*, 2006), was not detected. We have no direct explanation for this discrepancy can be given, but it could possibly be a result of the different protocols (precultivation, media, and bacterial density) used in the two studies. Furthermore, it is well known that there is a rather poor correlation between transcriptome and proteome data even when studies are performed under the same conditions (Gygi *et al.*, 1999).

An increased synthesis of enzymes involved in lipid metabolism and a rhodanese-like family protein, involved in sulfur transfer, was also observed. The importance and possible function of these proteins for growth under iron limitation remain unclear at this stage.

Proteins with decreased production in response to iron restriction

As iron is an essential factor of enzymes of metabolic pathways, the iron-starved cells are not able to produce enough energy and important substrates for protein synthesis. This may result in a slower proliferation rate of *F. tularensis* in the iron-restricted medium, as observed during these studies. Not surprisingly, the functional group of

proteins (according to the COG algorithm) with the highest number of down-regulated proteins is category J: translation, ribosomal structure, and biogenesis. Similar results were observed in the transcriptomic study (Deng *et al.*, 2006). Decreased levels of amino acid-tRNA synthetases for Cys, Asp, Lys, and Thr were detected. Conversely, iron-starvation induced up-regulation of tyrosyl-tRNA synthetase in *H. pylori* (Lee *et al.*, 2004). In addition, the down-regulation of two proteins involved in transcription, COG category K, and the down-regulation of a further three proteins belonging to the COG category C, energy production and conversion, were detected. A chitinase protein, assigned to category G (carbohydrate transport and metabolism), was also found to be down-regulated. Recently, *F. novicida* has been shown to secrete chitinase through type-IV pili (Hager *et al.*, 2006). The levels of four proteins involved in envelope biogenesis and outer membrane formation, COG category M, were also affected. Of these, three were produced at decreased levels, and one was produced at higher levels under iron deprivation. These data indicate that the bacteria may undergo a transformation of the surface structures under iron-restricted conditions. However, this transformation could also be associated with growth in the stationary phase.

Concluding remarks

It has been shown that *F. tularensis* LVS increases the production of proteins encoded by the *igl* operon during growth in an iron-restricted medium. Two proteins encoded by this operon, IglA and IglC proteins, have previously been demonstrated to be essential for intramacrophage growth of different *F. tularensis* strains. The findings raise the hypothesis that iron limitation, a condition encountered by the bacteria in the host, may be a signal to increase the synthesis of virulence factors that may facilitate survival in the hostile host environment.

Acknowledgements

We would like to thank Lenka Lukšíková, Lenka Kriesfalussyová, Jana Michalíková, Alena Firychová, and Jitka Žáková for their excellent technical assistance. The study presented was supported by Project of Defence Research of Ministry of Defence, Czech Republic, Projects No. MO0FVZ0000501 and Project No. OPU0FVZ200602.

References

- Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.
- Baron GS & Nano FE (1998) MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* **29**: 247–259.
- Brown RE, Jarvis KL & Hyland KJ (1989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* **180**: 136–139.
- Chamberlain RE (1965) Evaluation of live Tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl Microbiol* **13**: 232–235.
- Chastanet A, Derre I, Nair S & Msadek T (2004) clpB, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol* **186**: 1165–1174.
- Clemens DL, Lee BY & Horwitz MA (2004) Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* **72**: 3204–3217.
- Deng K, Blick RJ, Liu W & Hansen EJ (2006) Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun* **74**: 4224–4236.
- Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA *et al.* (2001) Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *Jama* **285**: 2763–2773.
- Ducey TF, Carson MB, Orvis J, Stintzi AP & Dyer DW (2005) Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* **187**: 4865–4874.
- Ellis J, Oyston PC, Green M & Titball RW (2002) Tularemia. *Clin Microbiol Rev* **15**: 631–646.
- Fortier AH, Leiby DA, Narayanan RB, Asafoadjei E, Crawford RM, Nacy CA & Meltzer MS (1995) Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infect Immun* **63**: 1478–1483.
- Golovliov I, Ericsson M, Sandstrom G, Tarnvik A & 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.
- Golovliov I, Baranov V, Krocova Z, Kovarova H & Sjostedt A (2003a) An attenuated strain of the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* can escape the phagosome of monocytic cells. *Infect Immun* **71**: 5940–5950.
- Golovliov I, Sjostedt A, Mokrievich A & Pavlov V (2003b) A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett* **222**: 273–280.
- Gray CG, Cowley SC, Cheung KK & Nano FE (2002) The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* **215**: 53–56.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR & Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 1720–1730.

- Hager AJ, Bolton DL, Pelletier MR *et al.* (2006) Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Mol Microbiol* **62**: 227–237.
- Heim S, Ferrer M, Heuer H, Regenhardt D, Nimtz M & Timmis KN (2003) Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol* **5**: 1257–1269.
- Hentze MW, Muckenthaler MU & Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**: 285–297.
- Imbert M & Blondeau R (1998) On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol* **37**: 64–66.
- Lai XH, Golovliov I & 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.
- Lauriano CM, Barker JR, Nano FE, Arulanandam BP & Klose KE (2003) Allelic exchange in *Francisella tularensis* using PCR products. *FEMS Microbiol Lett* **229**: 195–202.
- Lauriano CM, Barker JR, Yoon SS, Nano FE, Arulanandam BP, Hassett DJ & Klose KE (2004) MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4246–4249.
- Lee HW, Choe YH, Kim DK, Jung SY & Lee NG (2004) Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* **4**: 2014–2027.
- Lenco J, Pavkova I, Hubalek M & Stulik J (2005) Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant DeltaiglC1+2 by proteomics analysis. *FEMS Microbiol Lett* **246**: 47–54.
- Lindgren H, Golovliov I, Baranov V, Ernst RK, Telepnev M & Sjostedt A (2004) Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *J Med Microbiol* **53**: 953–958.
- Litwin CM & Calderwood SB (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**: 137–149.
- Moeck GS & Coulton JW (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* **28**: 675–681.
- Nano FE, Zhang N, Cowley SC *et al.* (2004) A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol* **186**: 6430–6436.
- Olsson I, Larsson K, Palmgren R & Bjellqvist B (2002) Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* **2**: 1630–1632.
- Palma M, Worgall S & Quadri LE (2003) Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch Microbiol* **180**: 374–379.
- Posey JE & Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**: 1651–1653.
- Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S & Kwaik YA (2005) The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol* **7**: 969–979.
- Schaible UE & Kaufmann SH (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**: 946–953.
- Sullivan JT, Jeffery EF, Shannon JD & Ramakrishnan G (2006) Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of fslA in siderophore production. *J Bacteriol* **188**: 3785–3795.
- Tatusov RL, Natale DA, Garkavtsev IV *et al.* (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* **29**: 22–28.
- Telepnev M, Golovliov I & 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.
- Twine SM, Mykytczuk NC, Petit MD, Shen H, Sjostedt A, Wayne Conlan J & Kelly JF (2006) In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun* **345**: 1621–1633.

9 LITERATURA

- [1] Tarnvik, A. and Berglund, L. (2003) Tularaemia. *Eur Respir J* 21, 361-373.
- [2] Chamberlain, R.E. (1965) Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol* 13, 232-235.
- [3] Sjösted, A. (2005) Francisella. In: *The Proteobacteria, Part B* (Brenner, K. and Staley, G., Eds.), Vol. pp. 200-210. Springer, New York.
- [4] Lundquist, M., Caspersen, M.B., Wikstrom, P. and Forsman, M. (2005) Discrimination of Francisella tularensis subspecies using surface enhanced laser desorption ionization mass spectrometry and multivariate data analysis. *FEMS Microbiol Lett* 243, 303-310.
- [5] Broekhuijsen, M., Larsson, P., Johansson, A., Bystrom, M., Eriksson, U., Larsson, E., Prior, R.G., Sjöstedt, A., Titball, R.W. and Forsman, M. (2003) Genome-wide DNA microarray analysis of Francisella tularensis strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent F. tularensis subsp. tularensis. *J Clin Microbiol* 41, 2924-2931.
- [6] Hubalek, M., Hernychova, L., Brychta, M., Lenco, J., Zechovska, J. and Stulik, J. (2004) 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* 4, 3048-3060.
- [7] Pavkova, I., Reichelova, M., Larsson, P., Hubalek, M., Vackova, J., Forsberg, A. and Stulik, J. (2006) Comparative proteome analysis of fractions enriched for membrane-associated proteins from Francisella tularensis subsp. tularensis and F. tularensis subsp. holarctica strains. *J Proteome Res* 5, 3125-3134.
- [8] Abd, H., Johansson, T., Golovliov, I., Sandstrom, G. and Forsman, M. (2003) Survival and growth of Francisella tularensis in Acanthamoeba castellanii. *Appl Environ Microbiol* 69, 600-606.
- [9] Hubalek, Z., Sixl, W., Halouzka, J. and Mikulaskova, M. (1997) Prevalence of Francisella tularensis in Dermacentor reticulatus ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. *Cent Eur J Public Health* 5, 199-201.
- [10] Eliasson, H., Lindback, J., Nuorti, J.P., Arneborn, M., Giesecke, J. and Tegnell, A. (2002) The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg Infect Dis* 8, 956-960.
- [11] Saslaw, S., Eigelsbach, H.T. and Wilson, H.E. (1961) Tularemia vaccine study. I. Intracutaneous challenge. *Arch Intern Med* 107, 689-701.

- [12] Saslaw, S., Eigelsbach, H.T. and Wilson, H.E. (1961) Tularemia vaccine study. II. Respiratory challenge. *Arch Intern Med* 107, 702-714.
- [13] 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.
- [14] Johansson, A., Forsman, M. and Sjostedt, A. (2004) The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. *Apmis* 112, 898-907.
- [15] 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.
- [16] Conlan, J.W. (2004) Vaccines against *Francisella tularensis*--past, present and future. *Expert Rev Vaccines* 3, 307-314.
- [17] Larsson, P., Oyston, P.C., Chain, P., Chu, M.C., Duffield, M., Fuxelius, H.H., Garcia, E., Halltorp, G., Johansson, D., Isherwood, K.E., Karp, P.D., Larsson, E., Liu, Y., Michell, S., Prior, J., Prior, R., Malfatti, S., Sjostedt, A., Svensson, K., Thompson, N., Vergez, L., Wagg, J.K., Wren, B.W., Lindler, L.E., Andersson, S.G., Forsman, M. and Titball, R.W. (2005) The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* 37, 153-159.
- [18] Golovliov, I., Sjostedt, A., Mokrievich, A. and Pavlov, V. (2003) A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett* 222, 273-280.
- [19] Evans, M.E., Gregory, D.W., Schaffner, W. and McGee, Z.A. (1985) Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)* 64, 251-269.
- [20] Perez-Castrillon, J.L., Bachiller-Luque, P., Martin-Luquero, M., Mena-Martin, F.J. and Herreros, V. (2001) Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis* 33, 573-576.
- [21] Siret, V., Barataud, D., Prat, M., Vaillant, V., Ansart, S., Le Coustumier, A., Vaissaire, J., Raffi, F., Garre, M. and Capek, I. (2006) An outbreak of airborne tularaemia in France, August 2004. *Euro Surveill* 11, 58-60.
- [22] Ellis, J., Oyston, P.C., Green, M. and Titball, R.W. (2002) Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 15, 631-646.
- [23] Gill, V. and Cunha, B.A. (1997) Tularemia pneumonia. *Semin Respir Infect* 12, 61-67.

- [24] Syrjala, H., Schildt, R. and Raisainen, S. (1991) In vitro susceptibility of *Francisella tularensis* to fluoroquinolones and treatment of tularemia with norfloxacin and ciprofloxacin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10, 68-70.
- [25] Scheel, O., Hoel, T., Sandvik, T. and Berdal, B.P. (1993) Susceptibility pattern of Scandinavian *Francisella tularensis* isolates with regard to oral and parenteral antimicrobial agents. *Apmis* 101, 33-36.
- [26] Ikaheimo, I., Syrjala, H., Karhukorpi, J., Schildt, R. and Koskela, M. (2000) In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 46, 287-290.
- [27] Johansson, A., Urich, S.K., Chu, M.C., Sjostedt, A. and Tarnvik, A. (2002) In vitro susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand J Infect Dis* 34, 327-330.
- [28] Garcia del Blanco, N., Gutierrez Martin, C.B., de la Puente Redondo, V.A. and Rodriguez Ferri, E.F. (2004) In vitro susceptibility of field isolates of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* recovered in Spain to several antimicrobial agents. *Res Vet Sci* 76, 195-198.
- [29] Tomaso, H., Al Dahouk, S., Hofer, E., Spletstoeser, W.D., Treu, T.M., Dierich, M.P. and Neubauer, H. (2005) Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis* *holarctica* biovar II strains. *Int J Antimicrob Agents* 26, 279-284.
- [30] Maurin, M., Mersali, N.F. and Raoult, D. (2000) Bactericidal activities of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 3428-3431.
- [31] Gil, H., Platz, G.J., Forestal, C.A., Monfett, M., Bakshi, C.S., Sellati, T.J., Furie, M.B., Benach, J.L. and Thanassi, D.G. (2006) Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12897-12902.
- [32] Elkins, K.L., Rhinehart-Jones, T.R., Culkin, S.J., Yee, D. and Winegar, R.K. (1996) Minimal requirements for murine resistance to infection with *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 64, 3288-3293.
- [33] Elkins, K.L., Cowley, S.C. and Bosio, C.M. (2003) Innate and adaptive immune responses to an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* 5, 135-142.
- [34] Casadevall, A. (1998) Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends Microbiol* 6, 102-107.
- [35] Casadevall, A. (2003) Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect Immun* 71, 4225-4228.

- [36] Havlasova, J., Hernychova, L., Halada, P., Pellantova, V., Krejsek, J., Stulik, J., Macela, A., Jungblut, P.R., Larsson, P. and Forsman, M. (2002) Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics* 2, 857-867.
- [37] Havlasova, J., Hernychova, L., Brychta, M., Hubalek, M., Lenco, J., Larsson, P., Lundqvist, M., Forsman, M., Krocova, Z., Stulik, J. and Macela, A. (2005) Proteomic analysis of anti-*Francisella tularensis* LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics* 5, 2090-2103.
- [38] Twine, S.M., Petit, M.D., Shen, H., Mykytczuk, N.C., Kelly, J.F. and Conlan, J.W. (2006) Immunoproteomic analysis of the murine antibody response to successful and failed immunization with live anti-*Francisella* vaccines. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 999-1008.
- [39] Lee, B.Y., Horwitz, M.A. and Clemens, D.L. (2006) Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 74, 4002-4013.
- [40] Huntley, J.F., Conley, P.G., Hagman, K.E. and Norgard, M.V. (2006) Characterization of *Francisella tularensis* Outer Membrane Proteins. *J Bacteriol*.
- [41] Tempel, R., Lai, X.H., Crosa, L., Kozlowski, B. and Heffron, F. (2006) Attenuated *Francisella novicida* transposon mutants protect mice against wild-type challenge. *Infect Immun* 74, 5095-5105.
- [42] Pammit, M.A., Raulie, E.K., Lauriano, C.M., Klose, K.E. and Arulanandam, B.P. (2006) Intranasal vaccination with a defined attenuated *Francisella novicida* strain induces gamma interferon-dependent antibody-mediated protection against tularemia. *Infect Immun* 74, 2063-2071.
- [43] Pechous, R., Celli, J., Penoske, R., Hayes, S.F., Frank, D.W. and Zahrt, T.C. (2006) Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect Immun* 74, 4452-4461.
- [44] Twine, S., Bystrom, M., Chen, W., Forsman, M., Golovliov, I., Johansson, A., Kelly, J., Lindgren, H., Svensson, K., Zingmark, C., Conlan, W. and Sjostedt, A. (2005) A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun* 73, 8345-8352.
- [45] 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.
- [46] Gray, C.G., Cowley, S.C., Cheung, K.K. and Nano, F.E. (2002) The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiol Lett* 215, 53-56.

- [47] Baron, G.S. and Nano, F.E. (1998) MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Mol Microbiol* 29, 247-259.
- [48] Lauriano, C.M., Barker, J.R., Yoon, S.S., Nano, F.E., Arulanandam, B.P., Hassett, D.J. and Klose, K.E. (2004) MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4246-4249.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Qin, A. and Mann, B.J. (2006) Identification of transposon insertion mutants of *Francisella tularensis* strain Schu S4 deficient in intracellular replication in the hepatic cell line HepG2. *BMC Microbiol* 6, 69.
- [52] Mohapatra, N.P., Balagopal, A., Soni, S., Schlesinger, L.S. and Gunn, J.S. (2007) AcpA Is a *Francisella* Acid Phosphatase That Affects Intramacrophage Survival and Virulence. *Infect Immun* 75, 390-396.
- [53] 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.
- [54] Melillo, A., Sledjeski, D.D., Lipski, S., Wooten, R.M., Basrur, V. and Lafontaine, E.R. (2006) Identification of a *Francisella tularensis* LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol Lett* 263, 102-108.
- [55] Bakshi, C.S., Malik, M., Regan, K., Melendez, J.A., Metzger, D.W., Pavlov, V.M. and Sellati, T.J. (2006) Superoxide Dismutase B Gene (*sodB*)-Deficient Mutants of *Francisella tularensis* Demonstrate Hypersensitivity to Oxidative Stress and Attenuated Virulence. *J Bacteriol* 188, 6443-6448.
- [56] Clemens, D.L., Lee, B.Y. and Horwitz, M.A. (2005) *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 73, 5892-5902.
- [57] Balagopal, A., MacFarlane, A.S., Mohapatra, N., Soni, S., Gunn, J.S. and Schlesinger, L.S. (2006) Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Infect Immun* 74, 5114-5125.

- [58] Ben Nasr, A., Haithcoat, J., Masterson, J.E., Gunn, J.S., Eaves-Pyles, T. and Klimpel, G.R. (2006) Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J Leukoc Biol* 80, 774-786.
- [59] Schulert, G.S. and Allen, L.A. (2006) Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J Leukoc Biol*.
- [60] Dermine, J.F. and Desjardins, M. (1999) Survival of intracellular pathogens within macrophages. *Protoplasma* 210, 11-24.
- [61] Clemens, D.L., Lee, B.Y. and Horwitz, M.A. (2004) Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infect Immun* 72, 3204-3217.
- [62] Santic, M., Molmeret, M. and Abu Kwaik, Y. (2005) Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- γ . *Cell Microbiol* 7, 957-967.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] Santic, M., Molmeret, M., Klose, K.E., Jones, S. and Kwaik, Y.A. (2005) The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol* 7, 969-979.
- [66] Lindgren, H., Stenman, L., Tarnvik, A. and Sjostedt, A. (2005) The contribution of reactive nitrogen and oxygen species to the killing of *Francisella tularensis* LVS by murine macrophages. *Microbes Infect* 7, 467-475.
- [67] Gao, L. and Abu Kwaik, Y. (2000) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes Infect* 2, 1705-1719.
- [68] Gao, L.Y. and Kwaik, Y.A. (2000) The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol* 8, 306-313.
- [69] DeLeo, F.R. (2004) Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 9, 399-413.

- [70] Lai, X.H., Golovliov, I. and Sjostedt, A. (2001) *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 69, 4691-4694.
- [71] Lai, X.H. and Sjostedt, A. (2003) Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect Immun* 71, 4642-4646.
- [72] Hrstka, R., Stulik, J. and Vojtesek, B. (2005) The role of MAPK signal pathways during *Francisella tularensis* LVS infection-induced apoptosis in murine macrophages. *Microbes Infect* 7, 619-625.
- [73] Telepnev, M., Golovliov, I., Grundstrom, T., Tarnvik, A. and Sjostedt, A. (2003) *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF-alpha and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiol* 5, 41-51.
- [74] Lai, X.H., Golovliov, I. and Sjostedt, A. (2004) Expression of IgIC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 37, 225-230.
- [75] 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.
- [76] Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3, 165-170.
- [77] Beier, D. and Gross, R. (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* 9, 143-152.
- [78] Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. and Salmond, G.P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365-404.
- [79] Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174, 1-7.
- [80] Konkel, M.E. and Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2, 157-166.
- [81] Litwin, C.M. and Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6, 137-149.
- [82] Schaible, U.E. and Kaufmann, S.H. (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2, 946-953.

- [83] Sleator, R.D. and Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol Rev* 26, 49-71.
- [84] Guiney, D.G. (1997) Regulation of bacterial virulence gene expression by the host environment. *J Clin Invest* 99, 565-569.
- [85] Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G. and Finlay, B.B. (2000) Salmonella pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* 2, 145-156.
- [86] Prouty, A.M., Brodsky, I.E., Manos, J., Belas, R., Falkow, S. and Gunn, J.S. (2004) Transcriptional regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium genes by bile. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41, 177-185.
- [87] 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.
- [88] Walduck, A., Rudel, T. and Meyer, T.F. (2004) Proteomic and gene profiling approaches to study host responses to bacterial infection. *Curr Opin Microbiol* 7, 33-38.
- [89] Jansen, A. and Yu, J. (2006) Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr Opin Microbiol* 9, 138-142.
- [90] Abu Kwaik, Y., Eisenstein, B.I. and Engleberg, N.C. (1993) Phenotypic modulation by Legionella pneumophila upon infection of macrophages. *Infect Immun* 61, 1320-1329.
- [91] Molestina, R.E., Klein, J.B., Miller, R.D., Pierce, W.H., Ramirez, J.A. and Summersgill, J.T. (2002) Proteomic analysis of differentially expressed Chlamydia pneumoniae genes during persistent infection of HEp-2 cells. *Infect Immun* 70, 2976-2981.
- [92] Hanawa, T., Yamamoto, T. and Kamiya, S. (1995) Listeria monocytogenes can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect Immun* 63, 4595-4599.
- [93] Buchmeier, N.A. and Heffron, F. (1990) Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248, 730-732.
- [94] Twine, S.M., Mykytczuk, N.C., Petit, M.D., Shen, H., Sjostedt, A., Wayne Conlan, J. and Kelly, J.F. (2006) In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, Francisella tularensis, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1621-1633.
- [95] Gonzalez-Flecha, B. and Demple, B. (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing Escherichia coli. *J Biol Chem* 270, 13681-13687.

- [96] Imlay, J.A. and Fridovich, I. (1991) Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 266, 6957-6965.
- [97] Bogdan, C., Rollinghoff, M. and Diefenbach, A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12, 64-76.
- [98] Conlan, J.W., Chen, W., Shen, H., Webb, A. and KuoLee, R. (2003) Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb Pathog* 34, 239-248.
- [99] Storz, G. and Imlay, J.A. (1999) Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2, 188-194.
- [100] Zheng, M., Aslund, F. and Storz, G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718-1721.
- [101] Wu, J. and Weiss, B. (1992) Two-stage induction of the soxRS (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 3915-3920.
- [102] Martinez, A. and Kolter, R. (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. *J Bacteriol* 179, 5188-5194.
- [103] Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. and Storz, G. (1999) OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* 181, 4639-4643.
- [104] Gruer, M.J. and Guest, J.R. (1994) Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* 140 (Pt 10), 2531-2541.
- [105] Liochev, S.I. and Fridovich, I. (1992) Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the soxRS regulon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5892-5896.
- [106] Posey, J.E. and Gherardini, F.C. (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288, 1651-1653.
- [107] Imbert, M. and Blondeau, R. (1998) On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol* 37, 64-66.
- [108] Andrews, S.C., Robinson, A.K. and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215-237.
- [109] Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U. and Andrews, N.C. (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285-297.
- [110] Hantke, K. (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4, 172-177.

- [111] Sullivan, J.T., Jeffery, E.F., Shannon, J.D. and Ramakrishnan, G. (2006) Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of *fslA* in siderophore production. *J Bacteriol* 188, 3785-3795.
- [112] Deng, K., Blick, R.J., Liu, W. and Hansen, E.J. (2006) Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect Immun* 74, 4224-4236.
- [113] Rowbury, R.J. (2005) Intracellular and extracellular components as bacterial thermometers, and early warning against thermal stress. *Sci Prog* 88, 71-99.
- [114] Yura, T. and Nakahigashi, K. (1999) Regulation of the heat-shock response. *Curr Opin Microbiol* 2, 153-158.
- [115] Raivio, T.L. and Silhavy, T.J. (2001) Periplasmic stress and ECF sigma factors. *Annu Rev Microbiol* 55, 591-624.
- [116] Ades, S.E. (2004) Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 7, 157-162.
- [117] Ewalt, K.L., Hendrick, J.P., Houry, W.A. and Hartl, F.U. (1997) In vivo observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* 90, 491-500.
- [118] Georgopoulos, C. and Welch, W.J. (1993) Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu Rev Cell Biol* 9, 601-634.
- [119] Fink, A.L. (1999) Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* 79, 425-449.
- [120] Bukau, B. and Horwich, A.L. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- [121] Henderson, B., Allan, E. and Coates, A.R. (2006) Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* 74, 3693-3706.
- [122] Gottesman, S. (1996) Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet* 30, 465-506.
- [123] Thieringer, H.A., Jones, P.G. and Inouye, M. (1998) Cold shock and adaptation. *Bioessays* 20, 49-57.
- [124] Carty, S.M., Sreekumar, K.R. and Raetz, C.R. (1999) Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J Biol Chem* 274, 9677-9685.
- [125] Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. and de Mendoza, D. (1998) A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* 180, 2194-2200.

- [126] VanBogelen, R.A. and Neidhardt, F.C. (1990) Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5589-5593.
- [127] La Teana, A., Brandi, A., Falconi, M., Spurio, R., Pon, C.L. and Gualerzi, C.O. (1991) Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10907-10911.
- [128] Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R. and Wolffe, A.P. (1992) DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 174, 5798-5802.
- [129] Jiang, W., Hou, Y. and Inouye, M. (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* 272, 196-202.
- [130] Graumann, P.L. and Marahiel, M.A. (1998) A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23, 286-290.
- [131] Maurelli, A.T. and Sansonetti, P.J. (1988) Identification of a chromosomal gene controlling temperature-regulated expression of *Shigella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2820-2824.
- [132] Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P. and Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1315-1352.
- [133] Stevenson, B., Schwan, T.G. and Rosa, P.A. (1995) Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 63, 4535-4539.
- [134] Finkel, S.E. (2006) Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol* 4, 113-120.
- [135] Voigt, B., Schweder, T., Becher, D., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Feesche, J., Maurer, K.H. and Hecker, M. (2004) A proteomic view of cell physiology of *Bacillus licheniformis*. *Proteomics* 4, 1465-1490.
- [136] Phillips, Z.E. and Strauch, M.A. (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* 59, 392-402.
- [137] Foster, P.L. and Rosche, W.A. (1999) Mechanisms of mutation in nondividing cells. Insights from the study of adaptive mutation in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* 870, 133-145.
- [138] Zinser, E.R. and Kolter, R. (2004) *Escherichia coli* evolution during stationary phase. *Res Microbiol* 155, 328-336.
- [139] Hengge-Aronis, R. (1999) Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* 2, 148-152.

- [140] 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.
- [141] Schellhorn, H.E., Audia, J.P., Wei, L.I. and Chang, L. (1998) Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 6283-6291.
- [142] Boyce, J.D., Cullen, P.A. and Adler, B. (2004) Genomic-scale analysis of bacterial gene and protein expression in the host. *Emerg Infect Dis* 10, 1357-1362.
- [143] Cash, P. (2000) Proteomics in medical microbiology. *Electrophoresis* 21, 1187-1201.
- [144] Hinton, J.C., Hautefort, I., Eriksson, S., Thompson, A. and Rhen, M. (2004) Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol* 7, 277-282.
- [145] Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L. and Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090-1094.
- [146] Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R. and Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1720-1730.
- [147] Hegde, P.S., White, I.R. and Debouck, C. (2003) Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 14, 647-651.
- [148] Kersten, B., Wanker, E.E., Hoheisel, J.D. and Angenendt, P. (2005) Multiplex approaches in protein microarray technology. *Expert Rev Proteomics* 2, 499-510.
- [149] Yates, J.R., 3rd (2004) Mass spectral analysis in proteomics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, 297-316.
- [150] Tanaka, K., Waki, W., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. and Yoshida, T. (1988) Protein and Polymer Analyses up to m/z 100,000 by Laser Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2, 151-153.
- [151] Karas, M. and Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 60, 2299-2301.
- [152] Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71.
- [153] Gorg, A., Weiss, W. and Dunn, M.J. (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685.

- [154] Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. and Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-339.
- [155] Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D. (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14, 1357-1365.
- [156] O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021.
- [157] Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G.M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L. and Righetti, P.G. (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25, 1327-1333.
- [158] Sinha, P., Poland, J., Schnolzer, M. and Rabilloud, T. (2001) A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 1, 835-840.
- [159] Berggren, K., Chernokalskaya, E., Steinberg, T.H., Kemper, C., Lopez, M.F., Diwu, Z., Haugland, R.P. and Patton, W.F. (2000) Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis* 21, 2509-2521.
- [160] Unlu, M., Morgan, M.E. and Minden, J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077.
- [161] Raman, B., Cheung, A. and Marten, M.R. (2002) Quantitative comparison and evaluation of two commercially available, two-dimensional electrophoresis image analysis software packages, Z3 and Melanie. *Electrophoresis* 23, 2194-2202.
- [162] Rosengren, A.T., Salmi, J.M., Aittokallio, T., Westerholm, J., Lahesmaa, R., Nyman, T.A. and Nevalainen, O.S. (2003) Comparison of PDQuest and Progenesis software packages in the analysis of two-dimensional electrophoresis gels. *Proteomics* 3, 1936-1946.
- [163] Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H. and Mann, M. (1996) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14440-14445.
- [164] 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.

- [165] Spengler, B., Kirsch, D., Kaufmann, R. and Jaeger, E. (1992) Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 6, 105-108.
- [166] Chaurand, P., Luetzenkirchen, F. and Spengler, B. (1999) Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 10, 91-103.
- [167] Keough, T., Youngquist, R.S. and Lacey, M.P. (1999) A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7131-7136.
- [168] Keough, T., Lacey, M.P. and Youngquist, R.S. (2000) Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsource decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14, 2348-2356.
- [169] Lenco, J. and Stulik, J. (2004) Identification of Proteins by Combination of MALDI-TOF Peptide Mass Fingerprinting and Fragmentation of Sulfonated Peptides. *Chemické listy* 98, 264-267.
- [170] Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T. and Mann, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379, 466-469.
- [171] Yates, J.R., 3rd (1998) Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom* 33, 1-19.
- [172] Swanson, S.K. and Washburn, M.P. (2005) The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discov Today* 10, 719-725.
- [173] Nesvizhskii, A.I. (2006) Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol* 367, 87-120.
- [174] Neverova, I. and Van Eyk, J.E. (2005) Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815, 51-63.
- [175] Zhen, Y., Xu, N., Richardson, B., Becklin, R., Savage, J.R., Blake, K. and Peltier, J.M. (2004) Development of an LC-MALDI method for the analysis of protein complexes. *J Am Soc Mass Spectrom* 15, 803-822.
- [176] Wolters, D.A., Washburn, M.P. and Yates, J.R., 3rd (2001) An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem* 73, 5683-5690.

- [177] Xiao, Z., Conrads, T.P., Lucas, D.A., Janini, G.M., Schaefer, C.F., Buetow, K.H., Issaq, H.J. and Veenstra, T.D. (2004) Direct ampholyte-free liquid-phase isoelectric peptide focusing: application to the human serum proteome. *Electrophoresis* 25, 128-133.
- [178] Essader, A.S., Cargile, B.J., Bundy, J.L. and Stephenson, J.L., Jr. (2005) A comparison of immobilized pH gradient isoelectric focusing and strong-cation-exchange chromatography as a first dimension in shotgun proteomics. *Proteomics* 5, 24-34.
- [179] Schirle, M., Heurtier, M.A. and Kuster, B. (2003) Profiling core proteomes of human cell lines by one-dimensional PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2, 1297-1305.
- [180] Aebersold, R. and Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- [181] Wells, J.M. and McLuckey, S.A. (2005) Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods Enzymol* 402, 148-185.
- [182] Zubarev, R., Kelleher, N. and McLafferty, F. (1998) Electron Capture Dissociation of Multiply Charged Protein Cations - a Nonergodic Process *Journal of the American Chemical Society* 120, 3265-3266.
- [183] Syka, J.E., Coon, J.J., Schroeder, M.J., Shabanowitz, J. and Hunt, D.F. (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9528-9533.
- [184] Eng, J., McCormack, A. and Yates, J.R., 3rd (1994) An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5, 976-989.
- [185] Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. and Cottrell, J.S. (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- [186] Colinge, J., Masselot, A., Giron, M., Dessingy, T. and Magnin, J. (2003) OLAV: towards high-throughput tandem mass spectrometry data identification. *Proteomics* 3, 1454-1463.
- [187] Putz, S., Reinders, J., Reinders, Y. and Sickmann, A. (2005) Mass spectrometry-based peptide quantification: applications and limitations. *Expert Rev Proteomics* 2, 381-392.
- [188] Oda, Y., Huang, K., Cross, F.R., Cowburn, D. and Chait, B.T. (1999) Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6591-6596.

- [189] Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A. and Mann, M. (2002) Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.
- [190] Heller, M., Mattou, H., Menzel, C. and Yao, X. (2003) Trypsin catalyzed 16O-to-18O exchange for comparative proteomics: tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-ion trap mass spectrometers. *J Am Soc Mass Spectrom* 14, 704-718.
- [191] Chakraborty, A. and Regnier, F.E. (2002) Global internal standard technology for comparative proteomics. *J Chromatogr A* 949, 173-184.
- [192] Schmidt, A., Kellermann, J. and Lottspeich, F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. *Proteomics* 5, 4-15.
- [193] Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H. and Aebersold, R. (1999) Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 17, 994-999.
- [194] Blagoev, B., Ong, S.E., Kratchmarova, I. and Mann, M. (2004) Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* 22, 1139-1145.
- [195] 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.
- [196] Shadforth, I.P., Dunkley, T.P., Lilley, K.S. and Bessant, C. (2005) i-Tracker: for quantitative proteomics using iTRAQ. *BMC Genomics* 6, 145.
- [197] Urfer, W., Grzegorzczak, M. and Jung, K. (2006) Statistics for proteomics: a review of tools for analyzing experimental data. *Proteomics* 6 Suppl 2, 48-55.
- [198] Gavrillin, M.A., Bouakl, I.J., Knatz, N.L., Duncan, M.D., Hall, M.W., Gunn, J.S. and Wewers, M.D. (2006) Internalization and phagosome escape required for *Francisella* to induce human monocyte IL-1 β processing and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 141-146.
- [199] Lenco, J., Pavkova, I., Hubalek, M. and Stulik, J. (2005) Insights into the oxidative stress response in *Francisella tularensis* LVS and its mutant Delta*iglC1+2* by proteomics analysis. *FEMS Microbiol Lett* 246, 47-54.

- [200] Olsson, I., Larsson, K., Palmgren, R. and Bjellqvist, B. (2002) Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics* 2, 1630-1632.
- [201] Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. (1989) Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem* 180, 136-139.
- [202] Pappin, D.J., Hojrup, P. and Bleasby, A.J. (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3, 327-332.
- [203] Hernychova, L., Stulik, J., Halada, P., Macela, A., Kroca, M., Johansson, T. and Malina, M. (2001) Construction of a *Francisella tularensis* two-dimensional electrophoresis protein database. *Proteomics* 1, 508-515.
- [204] Hubalek, M., Hernychova, L., Havlasova, J., Kasalova, I., Neubauerova, V., Stulik, J., Macela, A., Lundqvist, M. and Larsson, P. (2003) Towards proteome database of *Francisella tularensis*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 787, 149-177.
- [205] Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D. and Koonin, E.V. (2001) The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res* 29, 22-28.
- [206] Lee, H.W., Choe, Y.H., Kim, D.K., Jung, S.Y. and Lee, N.G. (2004) Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of *Helicobacter pylori*: regulation of *Helicobacter pylori* gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* 4, 2014-2027.
- [207] Ducey, T.F., Carson, M.B., Orvis, J., Stintzi, A.P. and Dyer, D.W. (2005) Identification of the iron-responsive genes of *Neisseria gonorrhoeae* by microarray analysis in defined medium. *J Bacteriol* 187, 4865-4874.
- [208] Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. and Storz, G. (2001) DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 183, 4562-4570.
- [209] 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.
- [210] Zuber, M., Hoover, T.A., Dertzbaugh, M.T. and Court, D.L. (1995) Analysis of the DnaK molecular chaperone system of *Francisella tularensis*. *Gene* 164, 149-152.

- [211] Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A.P., Tomoyasu, T. and Bukau, B. (1999) Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13732-13737.
- [212] Porankiewicz, J. and Clarke, A.K. (1997) Induction of the heat shock protein ClpB affects cold acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *J Bacteriol* 179, 5111-5117.
- [213] Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., 2nd and Wilkinson, B.J. (2002) Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 68, 1697-1705.
- [214] Chastanet, A., Derre, I., Nair, S. and Msadek, T. (2004) *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol* 186, 1165-1174.
- [215] Hossain, M.M. and Nakamoto, H. (2003) Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr Microbiol* 46, 70-76.
- [216] Heyde, M. and Portalier, R. (1990) Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 57, 19-26.
- [217] Santos, P.M., Benndorf, D. and Sa-Correia, I. (2004) Insights into *Pseudomonas putida* KT2440 response to phenol-induced stress by quantitative proteomics. *Proteomics* 4, 2640-2652.
- [218] Rohrwild, M., Coux, O., Huang, H.C., Moerschell, R.P., Yoo, S.J., Seol, J.H., Chung, C.H. and Goldberg, A.L. (1996) HslV-HslU: A novel ATP-dependent protease complex in *Escherichia coli* related to the eukaryotic proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5808-5813.
- [219] Manchado, M., Michan, C. and Pueyo, C. (2000) Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo. *J Bacteriol* 182, 6842-6844.
- [220] Palma, M., Worgall, S. and Quadri, L.E. (2003) Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch Microbiol* 180, 374-379.
- [221] Moeck, G.S. and Coulton, J.W. (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol Microbiol* 28, 675-681.
- [222] Heim, S., Ferrer, M., Heuer, H., Regenhardt, D., Nimtz, M. and Timmis, K.N. (2003) Proteome reference map of *Pseudomonas putida* strain KT2440 for genome expression profiling: distinct responses of KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 to iron deprivation and a new form of superoxide dismutase. *Environ Microbiol* 5, 1257-1269.

- [223] Begg, K.J., Dewar, S.J. and Donachie, W.D. (1995) A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* 177, 6211-6222.
- [224] 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.
- [225] Pogliano, J.A. and Beckwith, J. (1994) *SecD* and *SecF* facilitate protein export in *Escherichia coli*. *Embo J* 13, 554-561.
- [226] 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.
- [227] Kikuchi, G. (1973) The glycine cleavage system: composition, reaction mechanism, and physiological significance. *Mol Cell Biochem* 1, 169-187.
- [228] 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*.
- [229] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.