Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Role HuB ve virulenci patogenní bakterie *Francisella tularensis*

Diplomová práce

Autor: Bc. Lucie Krátká

Studijní program: N 1501 Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

Hradec Králové červenec 2015

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor:	**Bc. Lucie Krátká**
Studijní program:	N1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Název závěrečné práce:	**Role HuB ve virulenci patogenní bakterie *Francisella tularensis***
Název závěrečné práce AJ:	The role of HuB in the virulence of pathogenic bacterium *Francisella tularensis*

Cíl, metody, literatura, předpoklady:
Práce je zaměřena na studium potenciálního faktoru virulence HuB (histone-like protein B) v mírně virulentním evropském kmeni *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Kandidátní gen pro deleční mutagenezi byl vybrán na základě proteomické studie provedené na Ústavu molekulární patologie FVZ UO. Mutantní kmen připravený v rámci diplomové práce bude dále testován v systémech *in vitro* a *in vivo* a bude sledován vliv mutace na virulenci bakterie. Pro potvrzení, že sledované změny fenotypu mutantního kmene jsou způsobeny delecí genu, bude provedena *cis* komplementace mutantního kmene.

Garantující pracoviště: Katedra biologie, Přírodovědecká fakulta, UHK

Vedoucí práce: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

Oponent: RNDr. Alena Fučíková, Ph.D.

Datum zadání práce: leden 2014

Datum odevzdání práce:

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, z kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne Bc. Lucie Krátká

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování paní RNDr. Petře Špidlové, Ph.D. za její cenné rady, ochotu a vstřícný přístup při vedení mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům Katedry molekulární patologie a biologie FVZ UO za možnost vypracování diplomové práce v laboratořích tohoto pracoviště a za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Mé poděkování patří také panu Doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. z Katedry biologie PřF UHK za umožnění externího zpracování diplomové práce.

Anotace

KRÁTKÁ, L. *Role HuB ve virulenci patogenní bakterie Francisella tularensis*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Petra Špidlová. 84 + II s.

Práce je zaměřena na studium potenciálního faktoru virulence HuB (histone-like protein B) v mírně virulentním evropském kmeni *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Kandidátní gen pro deleční mutagenezi byl vybrán na základě proteomické studie provedené na Ústavu molekulární patologie FVZ UO. Mutantní kmen připravený v rámci diplomové práce bude dále testován v systémech *in vitro* a *in vivo* a bude sledován vliv mutace na virulenci bakterie. Pro potvrzení, že sledované změny fenotypu mutantního kmene jsou způsobeny delecí genu, bude provedena *cis* komplementace mutantního kmene.

Klíčová slova

Francisella tularensis, virulence, histone-like protein B, deleční mutageneze, komplementace

Annotation

KRÁTKÁ, L. *The role of HuB in the virulence of pathogenic bacterium Francisella tularensis.* Hradec Králové, 2015. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Petra Špidlová. 84 + II p.

The thesis is focused on the study of potential virulence factor HuB (histone-like protein B) in a mild virulent European strain *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. The candidate gene for the deletion mutagenesis was chosen on the basis of proteomic study performed at Institute of Molecular Pathology at University of Defence, Faculty of Military Health Sciences. Hereafter, the mutant strain prepared within this work will be tested in the systems *in vitro* and *in vivo* to monitor the influence of the mutation on the bacteria virulence. Further, complementation *in cis* will be performed in order to confirm that the observed changes in mutant strain phenotype were the result of gene deletion.

Keywords

Francisella tularensis, virulence, histone-like protein B, deletion mutagenesis, complementation

Obsah

Seznam použitých zkratek **9**
1 Úvod a cíle práce **11**
2 Literární přehled **12**
2.1 Bakterie *Francisella tularensis* 12
2.1.1 Obecná charakteristika 12
2.1.2 Taxonomie 12
2.1.3 Porovnání genomů poddruhů *F. tularensis* 13
2.1.4 Kultivační podmínky 14
2.1.5 *Francisella tularensis* jako potenciální biologická zbraň 15
2.2 Tularémie 16
2.2.1 Epidemiologie 16
2.2.2 Klinické formy 17
2.2.3 Léčba 18
2.2.4 Vakcína 19
2.3 Interakce *Francisella tularensis* s hostitelskou buňkou 21
2.4 Faktory virulence 23
3 Experimentální část **30**
3.1 Přístroje a laboratorní zařízení 30
3.2 Materiál 31
3.3 Kultivace bakterií 37
3.4 Izolace chromozomální DNA 37
3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA 37
3.6 Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu a izolace DNA fragmentů z agarózového gelu 38
3.7 Izolace plazmidové DNA 38
3.8 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami 38
3.9 Navržení primerů pro PCR amplifikace 39
3.10 Deleční mutageneze 40
3.10.1 Amplifikace delečního konstruktu 40
3.10.2 Klonování delečního konstruktu za využití TOPO-TA Cloning Kit 41
3.10.3 Příprava chemokompetentních buněk *E. coli* XL1 42
3.10.4 Ověření ligačního a transformačního kroku 43
3.10.5 Ligace delečního konstruktu a vektoru pDM4 44
3.10.6 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk *E. coli* 44
3.10.7 Příprava chemokompetentních buněk *E. coli* S17-1λpir 45
3.10.8 Konjugace 45
3.10.9 Sacharózová selekce 47
3.10.10 Potvrzení rekombinantů 47
3.10.11 Příprava bakteriálních konzerv *F. tularensis* 48
3.10.12 Příprava elektrokompetentních buněk *F. tularensis* FSC200/*ΔhuB* 48

3.11 Komplementace *in trans* delečního mutanta *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200/*ΔhuB* ... 49
3.11.1 Syntéza genu *huB* ... 49
3.11.2 Klonování PCR produktu za využití TOPO-TA Cloning Kit a selekce pozitivních transformantů ... 49
3.11.3 Ligace genu *huB* a fragmentu vektoru pKK289Km, transformace do kompetentních buněk *E. coli* ... 49
3.11.4 Elektroporace plazmidu pKK289Km-*huB* do delečního kmene *F. tularensis* FSC200/*ΔhuB* ... 50
3.12 Testování delečního a *trans* komplementovaného kmene v systémech *in vitro* a *in vivo* ... 50
3.12.1 Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů (BMMs) ... 50
3.12.2 Proliferace *F. tularensis* v primárních kostně-dřeňových makrofázích (BMMs) ... 52
3.12.3 Infekce myší typu BALB/c ... 53
3.12.4 Testování protektivního účinku ... 54
3.12.5 Měření růstové křivky ... 54
4 Výsledky ... 56
4.1 Příprava kmene *F. tularensis* s chromozomální delecí genu *huB* ... 56
4.1.1 Amplifikace delečního konstruktu ... 56
4.1.2 Příprava plazmidu pCR4-TOPO-*ΔhuB* ... 57
4.1.3 Příprava plazmidu pDM4-*ΔhuB* ... 58
4.1.4 Konjugace a sacharózová selekce ... 61
4.2 Komplementace *in trans* delečního mutanta *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200/*ΔhuB* ... 62
4.2.1 Amplifikace genu *huB* ... 62
4.2.2 Příprava plazmidu pCR4-TOPO-*huB* ... 63
4.2.3 Příprava plazmidu pKK289Km-*huB* ... 64
4.2.4 Elektroporace plazmidu pKK289Km-*huB* do delečního kmene *F. tularensis* FSC200/*ΔhuB* ... 66
4.3 Proliferace *F. tularensis* v primárních kostně-dřeňových makrofázích (BMMs) ... 67
4.4 Infekce myší typu BALB/c ... 68
4.5 Měření růstové křivky ... 69
5 Diskuze ... 71
6 Závěr ... 75
Seznam použité literatury ... 76
Seznam obrázků ... 83
Seznam tabulek ... 83
Přílohy

Seznam použitých zkratek

A/T	Adenin/thymin
ATB	Antibiotika
BMMs	Bone marrow macrophages (primární makrofágové buňky odvozené z kostně- dřeňových buněk)
BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
ccc forma	Covalently closed circular (cirkulární forma plazmidu)
CFU	Colony forming unit (kolonie tvořící jednotky)
ČR	Česká republika
dATP	Deoxyadenosin trifosfát
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DNáza	Deoxyribonukleáza
dNTP	Deoxynukleosid trifosfát
dsDNA	Dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina
E. coli	*Escherichia coli*
F. tularensis	*Francisella tularensis*
FBS	Fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
FCP	*Francisella*- containing phagosome (fagozom obsahující bakterie *Francisella*)
FCV	*Francisella*- containing vacuole (vakuola obsahující bakterie *Fracisella*)
FDA	U.S. Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
FNR	Rodina regulačních proteinů fumarát- a nitrátreduktasy
FPI	*Francisella* pathogenicity island (ostrov patogenity bakterie *Francisella*)
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany
G + C	Guanin a cytosin
GFP	Green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)
HLP	Histone-like DNA-binding protein
HuB	Histone-like protein B
iTRAQ	Isobaric tag for relative and absolute quantitation (Izobarické značky pro relativní a absolutní kvantifikaci)
KAN	Kanamycin
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysacharid
LVS	Live vaccine strain (živý vakcinační kmen)
MOI	Multiplicita infekce
NAP	Nucleoid-associated protein

mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
OD	Optická densita
PBS	Phosphate buffered saline (fosfáty pufrovaný fyziologický roztok
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pI	Izoelektrický bod
RNA	Ribonukleová kyselina
RNáza	Ribonukleáza
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RT	Room temperature (pokojová teplota)
SOB	Super optimal broth
SOC médium	Super optimal broth with catabolite repression
SPI	*Salmonella* pathogenicity island (ostrov patogenity bakterie *Salmonella*)
ssDNA	Jednořetězcová deoxyribonukleová kyselina
TAE	Tris-acetate-EDTA
Tm	Teplota tání
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
US	United States (Spojené státy)
UV	Ultrafialové záření

1 Úvod a cíle práce

Intracelulární bakteriální patogeny jsou poměrně rozmanitou skupinou mikroorganismů způsobujících často závažné infekce, ale možnosti obrany proti těmto infekcím jsou omezené. Důvodem bývají nedostatečné poznatky o molekulární patogenezi infekčních chorob, přičemž intracelulární patogeny si vyvinuli důmyslné strategie, jak obejít vnitrobuněčné rozpoznání a zajistit si tak přežití a proliferaci v hostiteli.

Do kategorie intracelulárních patogenů patří také jedna z nejinfekčnějších známých bakterií a původce tularémie, *Francisella tularensis*. Tento mikrob je schopen účinně parazitovat či kolonizovat široké spektrum hostitelů, což samo o sobě naznačuje, že se dokáže přizpůsobit na rozmanitá růstová prostředí. Klíčovým prvkem životního cyklu *F. tularensis* je její schopnost po infekci přežít a replikovat se v makrofázích či jiných buňkách hostitele, což je nezbytným krokem pro vyvolání tularémie. Navzdory vysoké virulenci a relativně dobře prozkoumanému principu intracelulárního způsobu života jsou ovšem stále nedostatečné informace týkající se mechanismu patogeneze a virulenčních faktorů kódovaných touto bakterií.

Díky vývoji genetických nástrojů umožňujících cílené manipulace s *F. tularensis* se postupně daří tyto specifické virulenční faktory, jež přispívají k patogenezi, odhalovat. Změny v těchto mechanismech mohou vést k odlišné schopnosti přežití či případnému útlumu virulence bakterie v *in vitro* či *in vivo* podmínkách. Pokračující studie genetických faktorů spojených s virulencí budou mít zřejmě zásadní význam pro vývoj léčiv nebo očkovacích látek, které budou schopné chránit proti tularémii.

Cílem této diplomové práce je studium potenciálního faktoru virulence, jež nese označení histone-like protein B (HuB). Pro práci bude použit mírně virulentní evropský kmen *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. V rámci práce bude připraven mutantní kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 s delecí genu pro HuB (Δ*huB*). Vliv delece tohoto genu na virulenci bakterie bude poté testován v *in vitro* a *in vivo* systémech. V případě zjištění oslabení delečního kmene *in vivo* bude dalším bodem zájmu ověření, zda tento kmen poskytuje určitou úroveň protekce proti mateřskému kmeni. Deleční kmen bude dále komplementován zpětným navrácením genu *huB* a opět testován v *in vitro* a *in vivo* podmínkách.

2 Literární přehled

2.1 Bakterie Francisella tularensis

2.1.1 Obecná charakteristika

Francisella tularensis je charakterizována jako gramnegativní, fakultativně intracelulární patogen způsobující onemocnění zvané tularémie (Santic et al., 2010). Nemá schopnost pohybu, netvoří spóry a vyžaduje aerobní prostředí. Tvar může být proměnlivý, nejčastěji tyčinkovitý průměrné velikosti 0,8- 1 μm x 0,4-0,6 μm (Bednář et al., 1994). Na kultivaci je tato bakterie náročná, ale v životním prostředí se vyznačuje poměrně vysokou odolností. Dokáže přežít několik týdnů při nízkých teplotách ve vodě, vlhké půdě, senu, slámě a rozkládajících se zvířecích tělech (Dennis et al., 2001).

Poprvé byla *Francisella tularensis* izolována v roce 1912 ze syslů umírajících na onemocnění podobné moru v oblasti Tulare v Kalifornii. Bakterie byla nazvána podle místa nálezu *Bacterium tularense* (McCoy et Chapin, 1912). Na počest Edwarda Francise, jenž se významně podílel na výzkumu tohoto mikroorganismu, byl později rodový název změněn na *Francisella* (Oyston, 2008). První případ infekce člověka *F. tularensis* byl zaznamenán v roce 1913 (Wherry et Lamb, 1914).

2.1.2 Taxonomie

Francisella je jediným rodem v rámci čeledi *Francisellaceae*. Na základě podobnosti DNA a složení mastných kyselin jsou v rámci rodu rozlišovány dva druhy: *Francisella tularensis* a *Francisella philomiragia* (McLendon et al., 2006).

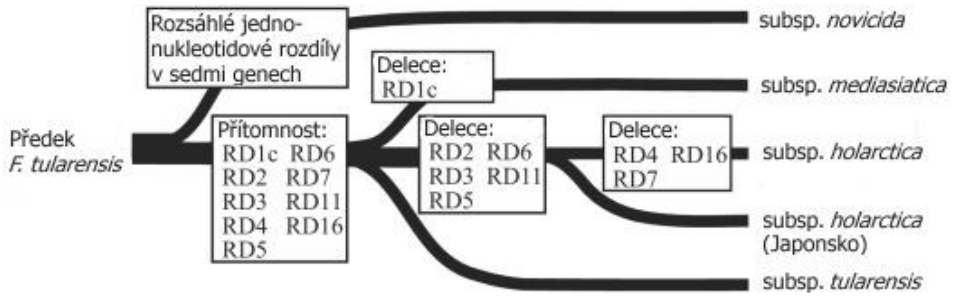
F. philomiragia se vyznačuje nižší virulencí, onemocnění vyvolává pouze u jedinců s poškozeným imunitním systémem. Často je spojována s vodním prostředím (Hollis et al., 1989).

Podle Svensson et al. (2005) je druh *F. tularensis* členěn na poddruhy (Obr. 1): *tularensis*, *holarctica*, *mediaasiatica*, *novicida* a variantu poddruhu *holarctica* nalezenou v Japonsku, která se výrazně odlišuje biochemickými vlastnostmi. Tyto poddruhy se liší virulencí (Tab. 1), geografickým rozšířením a vykazují rozdíly v některých biochemických testech. V současnosti se objevují spíše názory, že subsp. *novicida* by měl být zachován jako samostatný druh, protože přeřazení do poddruhu je založeno pouze na genetické příbuznosti mezi *F. tularensis* a *novicida* a nezohledňuje značné fenotypové (ekologické nároky, virulence, patogeneze) a genomické rozdíly (Kingry et Petersen, 2014).

- *F. tularensis* subsp. *tularensis* se vyskytuje převážně v Severní Americe. Vysoce virulentní je pro člověka i zvířata a může způsobit život ohrožující onemocnění. Infekční dávka u člověka je velmi nízká, stačí vdechnout i méně než 10 bakterií. Poddruh *tularensis*, někdy označovaný jako typ A,

je možné dále rozlišit na geneticky rozdílné podtypy A1 a A2 (Farlow et al., 2001)

- *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B) je ve srovnání s předchozím typem méně virulentní. Rozšíření zahrnuje velkou část severní polokoule, v prvé řadě Evropu, dále Asii, Severní Ameriku a Mexiko. Subsp. *holarctica* je primárním původcem tularémie na území Evropy, drobné epidemie způsobuje i v České republice.
- *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* byla izolována ve střední Asii a v některých částech bývalého Sovětského svazu. Virulence je velmi podobná jako u subsp. *holarctica*.
- *F. tularensis* subsp. *novicida* má rozšíření převážně na severoamerickém kontinentu a v Austrálii. Tento evolučně nejstarší poddruh je pro lidské jedince s funkční imunitou téměř avirulentní, vysoce patogenní ale zůstává pro hlodavce (Svensson et al., 2005; Pechous et al., 2009). Tato bakterie nebyla dosud identifikována u volně žijících zvířat ani členovců a jediným zdrojem izolátů je slaná voda (Kingry et Petersen, 2014).



Obrázek 1: Evoluční schéma *F. tularensis* založené na ztrátě znaků za předpokladu postupného ubývání genetického materiálu v průběhu evoluce (Svensson et al., 2005, upraveno)

RD... oblast rozdílu většího rozsahu

Tabulka 1: Virulence biotypů *F. tularensis* (Ellis et al., 2002)

Biotyp	50 % letální dávka, CFU			
	člověk	myš	morče	králík
F. tularensis subsp. *tularensis*	<10	<10	<10	1-10
F. tularensis subsp. *holarctica*	$<10^3$	<1	<10	$>10^6$
F. tularensis subsp. *mediaasiatica*	-	-	-	$>10^6$
F. tularensis subsp. *novicida*	$>10^3$	$<10^3$	$<10^3$	$>10^3$

všechny dávky byly aplikovány subkutánně

2.1.3 Porovnání genomů poddruhů F. tularensis

Sekvenční analýzy poddruhů *F. tularensis* (Tab. 2) poukazují na jejich značnou podobnost na genetické úrovni. Velikost genomu je shodně přibližně 1,8 Mb, nejrozsáhlejší genom 1,91 Mb má subsp. *novicida* (kmen U112). Obsah G + C v genomech všech poddruhů je poměrně nízký a tvoří cca 32 %. Předpokládá se, že

funkční proteiny kóduje 70 až 90 % otevřených čtecích rámců. Virulentnější poddruhy *tularensis* a *holarctica* obsahují v genomu asi 200 až 300 pseudogenů, zatímco méně patogenní *novicida* U112 jich má pouze 14. Sekvenované kmeny se shodují v počtu kódovaných tRNA, rRNA a dalších strukturálních a regulačních RNA. Srovnávací genomické studie také odhalily vysoký stupeň nukleotidové identity mezi jednotlivými poddruhy, a to přibližně v rozsahu od 97 do 99 %. Ve virulentnějších kmenech typu A jsou však přítomné četné přestavby DNA, zatímco u kmenů typu B je genomová reorganizace menší (Barabote et al., 2009; Pechous et al., 2009).

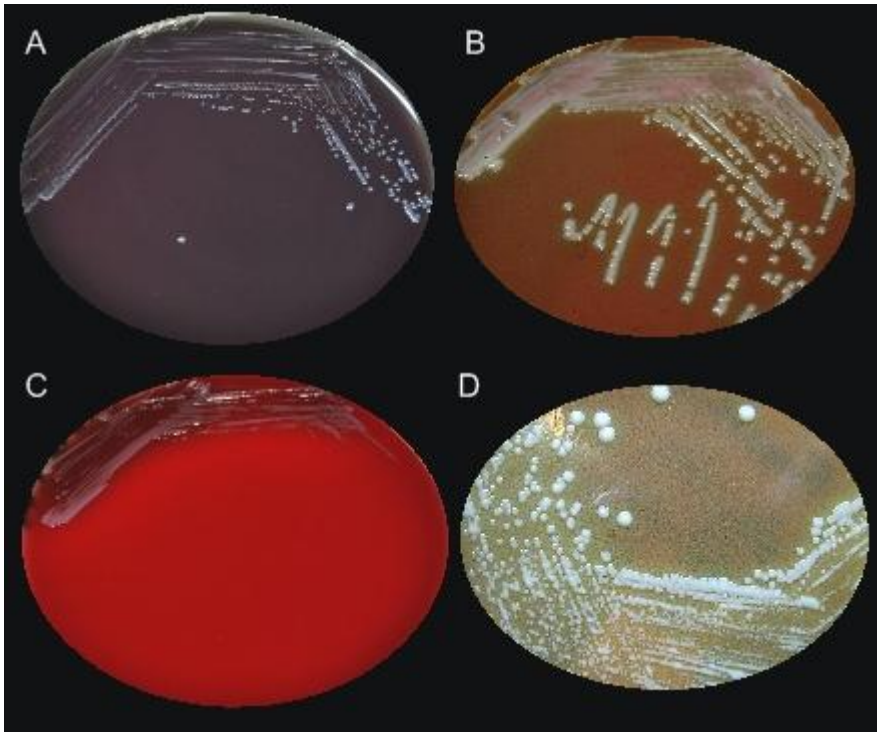
Tabulka 2: Přehled obecných charakteristik genomů kompletně osekvenovaných kmenů *F. tularensis* (Barabote et al., 2009)

	Francisella tularensis						
Poddruh	***holarctica***	***holarctica***	***holarctica***	***tularensis***	***tularensis***	***tularensis***	***novicida***
Kmen	FTNF002-00	OSU18	LVS	FSC198	SCHU-S4	WY96-3418	U112
Velikost genomu (Mb)	1,890909	1,895727	1,895994	1,892616	1,892819	1,898476	1,910031
% G + C	32,161	32,158	32,152	32,26	32,259	32,268	32,475
% kódování	87	74	82	79	78	79	89
Odhadované proteiny	1580	1555	1754	1605	1603	1634	1719
Pseudogeny	256	328	213	199	201	186	14
tRNA	38	38	38	38	38	38	38
rRNA	10	10	10	10	10	10	10
Ostatní RNA	5	5	5	5	5	5	5

2.1.4 Kultivační podmínky

Rod *Francisella* je na kultivaci poměrně náročný. Optimální podmínky pro růst *F. tularensis* jsou při teplotě 37 °C a pH 6,9. Poddruh *novicida* a *F. philomiragia* rostou dobře také při 28 °C. Ke kultivaci jsou vhodné půdy obohacené cysteinem, který tato bakterie vyžaduje pro svůj růst (Foley et Nieto, 2010). Často se používá krevní agar s glukózou a cysteinem, čokoládový agar obohacený cysteinem či lze zvolit i neselektivní agar s aktivním uhlím a kvasničním extraktem (Obr. 2). Jednotlivé, dobře rozlišitelné kolonie jsou obvykle získány po 2- 4 denní kultivaci (Ellis et al., 2002). Na krevním agaru jsou kolonie hladké, šedé, mukózní, s patrnou malou zónou α-hemolýzy (Foley et Nieto, 2010). Kolonie rostoucí na srdcovém agaru s cysteinem jsou typicky opaleskující a barvu kultivační půdy nemění (Dennis et al., 2001).

V tekutém médiu *Francisella* neroste příliš dobře, ani pokud je doplněno o cystein. Pro viditelný nárůst kultury v průběhu 24 hodin je nutné zaočkovat do média větší množství inokula (Ellis et al., 2002). Vhodným médiem je kompletní Chamberlainovo médium (Chamberlain, 1965).



Obrázek 2: *Francisella tularensis* na různých typech médií: A- pufrované médium s aktivním uhlím a kvasničním extraktem, B- čokoládový agar, C- krevní agar s ovčí krví, D- srdcový agar s cysteinem (The Journal of Undergraduate Biological Studies, 2010)

2.1.5 Francisella tularensis jako potenciální biologická zbraň

Do souvislosti s možným vojenským či teroristickým zneužitím je *Francisella tularensis* dávána z důvodu snadného šíření vzdušnou cestou, velmi nízké infekční dávky a schopnosti usmrtit nebo zneschopnit člověka (Dennis et al., 2001). Na základě těchto vlastností byla US Centers for Disease Control and Prevention zařazena do kategorie A zahrnující patogeny s nejvyšší rizikovostí možného zneužití (CDC, 2015).

F. tularensis je za potenciální biologickou zbraň považována již dlouhou dobu. Byla jedním z patogenů testovaných japonskými speciálními výzkumnými jednotkami v letech 1932-1945. Ve Spojených státech probíhal výzkum této bakterie v 50. a 60. letech minulého století, v průběhu kterého vyvinuli a vyrobili biologické zbraně s aerosolovým šířením *F. tularensis*. Paralelně prováděli výzkum zaměřený na lepší pochopení patofyziologie tularémie, vývoj vakcíny a antibiotické profylaxe a léčby. K částečné ochraně před virulentním SCHU S4 kmenem vyvinuli živou oslabenou vakcínu a objevili účinná antibiotika v profylaxi a léčbě, a to streptomycin, tetracyklin a chloramfenikol. Formálně byl program zaměřený na rozvoj biologických zbraní ukončen v roce 1970. V Sovětském svazu vývoj biologických zbraní údajně pokračoval až do 90. let a vyústil v produkci rezistentních kmenů *F. tularensis* navržených tak, aby byly odolné vůči působení antibiotik i vakcín. I tento historický vývoj zvyšuje obavy, že by *F. tularensis* mohla být v budoucnu jako biologická zbraň zneužita (Dennis et al., 2001).

2.2 Tularémie

2.2.1 Epidemiologie

Tularémie je zoonotické onemocnění s přírodní ohniskovostí. Svým výskytem se váže na severní polokouli, nákazy jsou hlášeny ze Spojených států, zemí bývalého Sovětského svazu, Japonska, Kanady, Mexika. V Evropě je nejvíce případů spojováno se Skandinávií (převážně Švédsko, Finsko) a střední Evropou. V jižní Evropě infekce není příliš obvyklá (Foley et Nieto, 2010).

V České republice je výskyt spojován nejčastěji s jižní Moravou, vzácně k menším epidemiím dochází i na jiných místech ČR (okolí Plzně, Chlumce nad Cidlinou). Tyto mikroepidemie často souvisí s loveckou sezónou (Macela a kol., 2002)

Případy nakažení člověka tularémií jsou zpravidla ojedinělé. Dochází k nim většinou v období se zvýšeným výskytem krev sajících členovců, tj. od června do září. V zimě je onemocnění spojováno převážně s lovci, kteří manipulují s těly nakažených zvířat (Dennis et al., 2001).

Celosvětově se počet osob přirozeně nakažených tularémií snižuje, a to zejména v důsledku snížení expozice nakaženým hlodavcům, králíkům a zajícům (Foley et Nieto, 2010). Například Titball a Sjöstedt (2003) ve své práci uvádí, že ve Spojených státech bylo v roce 1939 zaznamenáno 2291 případů tularémie, kdežto v letech 1993-2003 byla průměrná roční incidence pouze 125 případů. Na souvislost mezi zvýšeným výskytem tularémie a zhoršenými hygienickými podmínkami poukázal i nárůst počtu případů během konfliktů v Bosně a Kosovu (Foley et Nieto, 2010).

Infekce *F. tularensis* může proniknout do organismu mnoha cestami. Primární způsob přenosu na člověka i jiná zvířata je kousnutí infikovanými členovci. Nákaza může nastat také po manipulaci s infekčními živočišnými tkáněmi či tekutinami, požitím vody nebo jídla kontaminovaného infikovanými zvířaty a inhalací infekčního aerosolu. Z těchto důvodů do rizikové skupiny patří lidé zabývající se lovem, odchytem a porážením zvířat a laboratorní pracovníci (Dennis et al., 2001). Přímý přenos onemocnění z člověka na člověka nebyl dosud zaznamenán (Pechous et al., 2009).

Jen málo intracelulárních bakteriálních patogenů má tak široké spektrum hostitelů a složitý životní cyklus jako *F. tularensis* (Foley et Nieto, 2010). Tato bakterie dokáže infikovat volně žijící zvířata ze skupin zajícovců, hlodavců, hmyzožravců, masožravců, kopytníků, vačnatců, ptáků, obojživelníků, ryb i bezobratlých. Obecně nejvnímavější k nákaze jsou hlodavci, zajíci a králíci, kteří pak vytváří zdroj nákazy pro jiné živočichy i člověka. Je však málo pravděpodobné, že by tato zvířata byla přírodním rezervoárem *F. tularensis*, protože u nich infekce vede k rozvoji akutního onemocnění. Ve vodních cyklech mohou hrát roli hostitelů prvoci (Pechous et al., 2009).

Při šíření nákazy mezi hostiteli se významně uplatňují jako vektory členovci (Pechous et al., 2009). Rozmanitost těchto přenašečů je vysoká, více než 15 druhů klíšťat, >10 druhů komárů, ovádi, roztoči a blechy (Foley et Nieto, 2010). Ačkoli většina členovců slouží jako přechodní hostitelé, klíšťaty může být *F. tularensis* přenášena v průběhu celého jejich životního cyklu při každém kousnutí (Pechous et al., 2009).

Ve střední Evropě jsou významnými vektory klíšťata piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) a klíště obecné (*Ixodes ricinus*) (Hubálek et al., 1998). S komáry je přenos tularémie spojován na severu Evropy (Švédsko), kde jsou vektorem převážně komáři rodu *Aedes*. V České republice se komáři jako vektory *F. tularensis* neuplatňují (Hubálek et Halouzka, 1997). K přenosu *F. tularensis* subsp. *tularensis* v Severní Americe přispívají nejčastěji klíšťata, a to klíště americké (*Amblyomma americanum*) a piják americký (*Dermacentor variabilis*) (Foley et Nieto, 2010).

F. tularensis subsp. *holarctica* je na rozdíl od poddruhu *tularensis* spojována i s přenosem vodou (Santic et al., 2010). Mezi vnímavé hostitele patří mimo jiné hraboši a vodní hlodavci, kteří mohou hrát roli při udržování bakterie ve vodních tocích. Infikovaní hraboši vylučují bakterie močí, což vede ke kontaminaci vodních zdrojů (Foley et Nieto, 2010). Tato bakterie může přežít a růst v *Acanthamoeba castellanii*, což je volně žijící améba běžně se vyskytující v přirozeném vodním prostředí. Nalezena byla také v cystách améb, což poukazuje na fakt, že by všudypřítomní prvoci mohli být důležitým rezervoárem *F. tularensis* v životním prostředí (Abd et al., 2003).

2.2.2 Klinické formy

Závažnost a forma tularémie se odvíjí od kmene způsobujícího onemocnění, dávky a způsobu infekce (Ellis et al., 2002). Příčinou většiny zaznamenaných případů jsou *F. tularensis* subsp. *tularensis* a subsp. *holarctica*, přičemž poddruh *tularensis* je původcem nejčastěji v oblasti Severní Ameriky, *holarctica* v Evropě (Oyston, 2008). Onemocnění způsobené subtypem *tularensis* má mnohem závažnější průběh. V případě neléčení se udává smrtnost až 60 %, při včasné léčbě antibiotiky tato hodnota klesá pod 10 %. U neléčených onemocnění vyvolaných subtypem *holarctica* je smrtnost v rozmezí 1-10 %, při léčbě antibiotiky se blíží téměř k nule (Macela a kol., 2002).

Ačkoliv tularémie může mít závažný až smrtelný průběh, zvláště pokud je původcem poddruh *tularensis*, onemocnění vyvolaná málo virulentními kmeny nemusí být vzhledem k nespecifickým příznakům v některých případech ani diagnostikována. Inkubační doba je zpravidla 3-5 dní. U pacientů se poté objevují příznaky podobné chřipce, a pokud se neléčí, může mít onemocnění vleklý a recidivující průběh (Oyston, 2008).

Nejběžnější formou (až v 80 % případů) je ulceroglandulární tularémie, která se většinou objevuje v důsledku kousnutí infikovaným členovcem nebo průnikem infekce přes drobné oděrky na kůži, např. při přímém kontaktu s nakaženým

zvířetem. Po uplynutí inkubační doby se u pacienta projeví horečky, zimnice, malátnost, bolesti hlavy. V místě vstupu infekce do těla se utvoří vřed, odkud jsou bakterie prostřednictvím lymfatického systému šířeny do regionálních mízních uzlin, což je doprovázeno jejich zduřením. Bakterie se mohou šířit i do dalších tkání v těle (plic, jater, sleziny), nicméně fáze bakteriémie je přechodná a nastává v rámci infekčního procesu poměrně brzy (Ellis et al., 2002). U neléčených případů je úmrtnost u této formy odhadována na 5 % (Foley et Nieto, 2010).

Méně častou formou (1-4 % ze všech případů tularémie (Pechous et al., 2009)) je okuloglandulární tularémie, která se rozvíjí po zanesení infekčního agens do spojivkového vaku. Infekce v oku pacienta se projeví zánětem spojivek, otokem víček a hnisavou sekrecí. Pokud není zahájena léčba, infekce se může šířit podobně jako při předchozím typu tularémie do lokálních mízních uzlin (Oyston, 2008).

Požití infikovaných potravin nebo vody kontaminované *F. tularensis* vede k projevům orofaryngeální, či gastrointestinální tularémie. Příznakem je bolest v krku se zvětšenými mandlemi a vznikem žluto- bílých pablán, často doprovázené zduřením cervikálních lymfatických uzlin. V závislosti na infekční dávce se může gastrointestinální tularémie projevit od formy mírných, dlouhodobě trvajících průjmů, až po rozsáhlou ulceraci střev se smrtelnými následky (Ellis et al., 2002).

Inhalací *F. tularensis* se rozvíjí zřejmě nejakutnější forma tularémie, plicní. Vektorem pro infekční agens bývají prachové částice a částice aerosolu. Plicní onemocnění se může objevit i jako sekundární komplikace při jiných formách tularémie, pokud se patogen rozšíří krevním nebo lymfatickým systémem z jiné infikované tkáně do plic. Příznaky jsou variabilní a závisí na virulenci bakteriálního kmene. Mohou být od mírné pneumonie až po akutní infekci s vysokou horečkou, malátností, zimnicí a kašlem (Oyston, 2008). Infekční dávka potřebná k vyvolání onemocnění respirační cestou je velmi nízká, u člověka stačí vdechnout 1-10 bakterií *F. tularensis* subsp. *tularensis* (Dennis et al., 2001). Při neléčené infekci způsobené tímto subtypem se úmrtnost blíží k 30- 60 %. Včasné zahájení léčby antibiotiky tuto hodnotu snižuje na přibližně 2 % (Pechous et al., 2009).

2.2.3 Léčba

Současný standard péče při nákaze tularémií zahrnuje léčbu antibiotiky. *F. tularensis* je bakterie citlivá k řadě antibiotik včetně streptomycinu, kanamycinu, amikacinu, gentamicinu, fluorochinolonů, tetracyklinu, doxycyklinu či chloramfenikolu. Oproti tomu odolává působení penicilinů a cefalosporinů první generace. Tato rezistence na beta-laktamová antibiotika je vyvolaná tvorbou destrukčních enzymů, tzv. beta-laktamáz, které tento typ antibiotik rozkládají (Foley et Nieto, 2010).

Lékem první volby jsou aminoglykosidy. Klinicky účinný je streptomycin, avšak kvůli nežádoucím nefrotoxickým a ototoxickým účinkům se používá pouze zřídka. Podobné je to s chloramfenikolem, který se dříve k léčbě používal, ale může mít nevratné negativní účinky na hematopoézu. Vhodnou alternativou pro léčbu

tularémie se zdá být gentamicin (Oyston, 2008). Fluorochinolony, zejména ciprofloxacin, představoval dobrou volbu pro léčbu tularémie u dětí a těhotných (Johansson et al., 2000), nicméně jeho užívání pro léčbu tularémie bylo nedávno FDA zakázáno, protože bylo zjištěno, že kmeny *F. tularensis* jsou schopné rychle k tomuto antibiotiku získat rezistenci a kmeny *F. novicida* dokonce *in vitro* vykazují i kříženou rezistenci vůči doxycyklinu a erytromycinu (Sutera et al., 2014). Obecně, pokud je léčba antibiotiky zahájena včas, výrazně se u akutních forem onemocnění snižuje míra úmrtnosti (Oyston, 2008).

Současné možnosti léčby by mohly být omezeny rozvojem přirozené rezistence na antibiotika či navržením rezistentních kmenů (Barry et al., 2009). Proto je velký zájem o vývoj bezpečné a účinné vakcíny, která by mohla být použita k ochraně lidské populace (Mann et Ark, 2009).

2.2.4 Vakcína

Jedním z hlavních cílů při vývoji vakcíny je navržení očkovací látky s dobrou snášenlivostí, která člověka ochrání i před kmeny typu A šířenými aerosolem (Mann et Ark, 2009). K vytvoření vakcíny byly použity různé přístupy od celobuněčných usmrcených vakcín, po podjednotkové a živé oslabené vakcíny (Barry et al., 2009). Přesto do dnešní doby není dostupná žádná očkovací látka s licencí pro humánní použití (Macela a kol., 2002).

Usmrcené celobuněčné vakcíny

Rozvoji vakcíny ve formě usmrcených bakterií *F. tularensis* byla věnována pozornost hlavně v dřívější době. První vakcíny tohoto typu připravil fenolizací, či acetonovou extrakcí ve 40. letech Lee Foshay. Imunizace Foshayovou vakcínou snížila počet infekcí a značně ovlivňovala a zmírňovala jejich průběh, ale nedokázala zabránit rozvoji onemocnění po kontaktu s vysoce virulentními kmeny (Barry et al., 2009).

Podjednotkové vakcíny

Možné kandidáty pro tvorbu podjednotkové vakcíny představují antigeny rozpoznávané T-buňkami nebo imunosérem (Barry et al., 2009). Řada těchto antigenů byla posuzována z hlediska protektivních účinků na zvířecích modelech, avšak dosud jediným zjištěným ochranných antigenem je lipopolysacharid (LPS). Významnou nevýhodou použití LPS jako vakcíny je, že imunizací je zajištěna protekce pouze proti méně virulentním *Francisella* kmenům. Při ochraně před vysoce virulentním poddruhem *tularensis* je důležité zapojení imunity zprostředkované T- lymfocyty (Griffin et al., 2007). Hledání dalších ochranných antigenů k doplnění protekce indukované LPS stále probíhá (Oyston, 2008).

Živé oslabené vakcíny

Oslabený kmen by se měl vyznačovat omezenou schopností přežití a replikace *in vivo*, měl by vést k rozvoji ochranné imunitní odpovědi organismu, ale bez potenciálu vyvolat skutečné onemocnění (Griffin et al., 2007).

Použití nedefinovaných oslabených kmenů poddruhu *holarctica* jako vakcíny bylo rozšířeno v bývalém Sovětském svazu. Zde byla využívána lyofilizovaná živá vakcína, kterou ve 40. letech minulého století připravili Elbert a Galski. Ochranný efekt byl dobrý, ale časté byly silné vedlejší účinky, které se podobaly projevům infekce způsobené evropskými kmeny (Macela a kol., 2002).

Američtí vědci z ruského vakcinačního kmene opakovaným pasážováním izolovali kmen, který nese označení *F. tularensis* LVS (live vaccine strain). LVS pochází z oslabeného kmene poddruhu *holarctica* (Barry et al., 2009). Ve Spojených státech využívali živou oslabenou vakcínu k ochraně laborantů pracujících s *F. tularensis*. U vakcinovaných jedinců byly při ulceroglandulární formě tularémie patrné mírnější příznaky a snížil se výskyt respirační formy onemocnění (Dennis et al., 2001).

Přestože LVS prokázal určitý ochranný efekt, nezískal oprávnění pro použití u běžné populace. Důvodem je, že i přes osekvenování celého genomu LVS a porovnání genomové sekvence s divokým kmenem, není přesně jasné, jaké genetické změny přispívají k oslabení LVS, čímž nelze vyloučit možnost navrácení virulence. Kolonie LVS se také vyznačují nestabilním fenotypem (Barry et al., 2009).

V současnosti je snaha o připravení plně definovaného, stabilního a oslabeného mutanta. Cílem mutací jsou především geny kódující metabolické enzymy, faktory virulence a regulační proteiny. Většina cílených mutací je nejprve provedena na kmenech s nižší virulencí, se kterými se snadněji manipuluje, a po identifikování slibných cílových genů je zahájena práce s kmeny typu A (Barry et al., 2009). Nicméně inaktivace genu u jednoho poddruhu *F. tularensis* se nemusí projevit stejným účinkem u jiného poddruhu (Oyston, 2008).

Jako možný kandidát pro tvorbu vakcíny byla zvážena i *F. tularensis* subsp. *novicida*, jež pro člověka není patogenní, ale zachovává si virulentnost pro myši. Oproti LVS nemá necharakterizované oslabující mutace a nukleotidová podobnost s typem A i B je více než 95 % (Mann et Ark, 2009). Přesto se neukázala jako vhodný základ pro vakcínu, protože nedokáže vyvolat ochrannou imunitní odpověď proti virulentnějším poddruhům (Shen et al., 2004).

Dalším přístupem je vývoj oslabeného kmene typu A. U tohoto virulentního typu je náročnější dosáhnout bezpečné úrovně oslabení a zároveň vyvolat vysoký stupeň imunitní ochrany (Mann et Ark, 2009). Twine et al. (2005) zkonstruovala kmen SCHU S4 s delecí v FTT0918, což vedlo v produkci kmene, který dokázal částečně ochránit myši i před infekcí vysoce virulentním kmenem. Zdá se, že i oslabený kmen typu A by mohl být použit pro tvorbu bezpečné vakcíny.

2.3 Interakce Francisella tularensis s hostitelskou buňkou

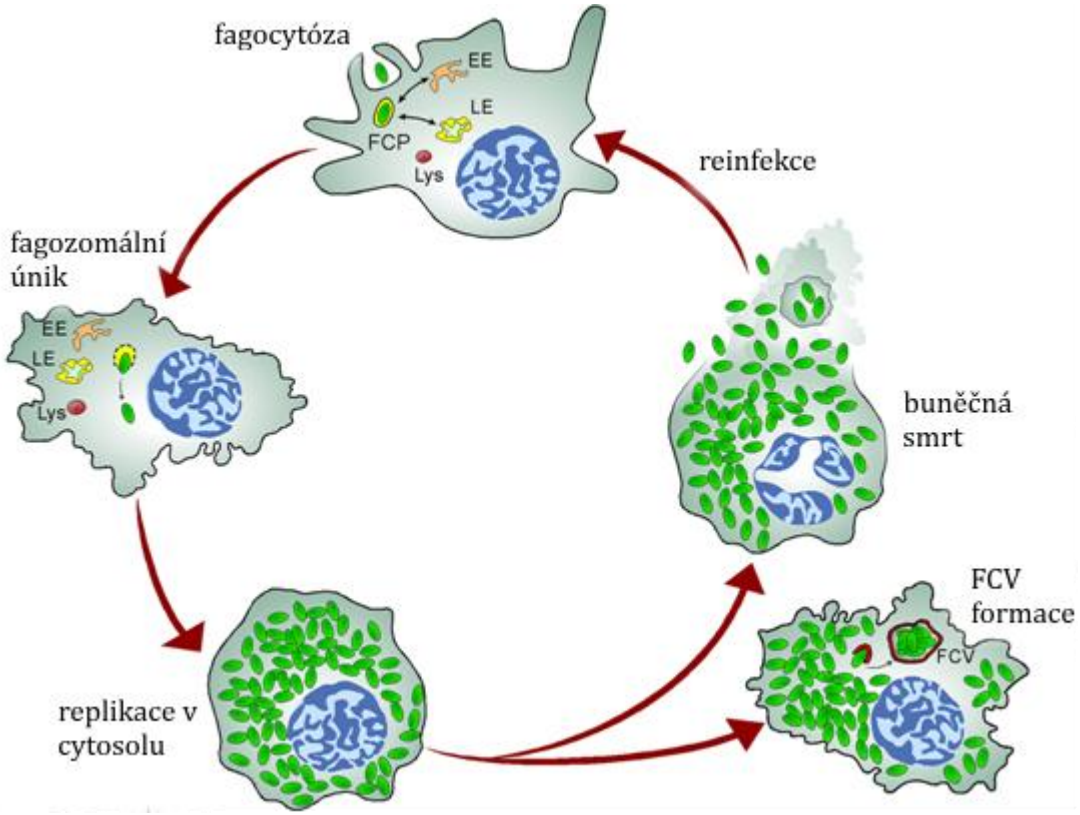
F. tularensis se stejně jako mnoho dalších patogenních mikroorganismů vyznačuje intracelulárním stylem života (Obr. 3) a schopností vstupovat, přežít a proliferovat v buňkách infikovaného hostitele. Patogeny tuto intracelulární strategii často využívají, protože jim umožňuje vyhnout se rozpoznání a eliminaci extracelulárními imunitními mechanismy hostitele. Vzhledem k důležitosti intracelulárního způsobu života ve virulenci *F. tularensis* jsou interakce mezi touto bakterií a hostitelskými buňkami významným předmětem studia (Chong et Celli, 2010).

Zásadní pro rozvoj tularémie je schopnost *F. tularensis* napadnout a množit se v mononukleárních fagocytech, jako jsou makrofágy a dendritické buňky, ačkoliv může infikovat i polymorfonukleární neutrofily, hepatocyty, epiteliální a endoteliální buňky (Chong et Celli, 2010).

Do makrofágů *F. tularensis* proniká unikátní formou fagocytózy zvanou looping fagocytóza. Hostitelská buňka utvoří z buněčné membrány asymetrickou, prostornou smyčku, která obklopí bakterie. Do interakce mezi bakterií a hostitelskou buňkou jsou zapojené různé povrchové receptory zahrnující manózové receptory, Fc receptory a komplementové receptory. Virulentní i oslabené kmeny *F. tularensis* přežívají fagocytózu tím, že zabraňují okyselení fagozomu a ovlivňují jeho zrání (Steiner et al., 2014). Velmi důležitou součástí intracelulární strategie *F. tularensis* je fagozomální únik, pro který je významným signálem zřejmě okyselování fagozomu. Bez ohledu na to, zda se jedná o lidské nebo myší makrofágy, z fagozomu do cytoplazmy hostitelské buňky bakterie začínají unikat po 2-4 hodinách, po 4-8 hodinách se většina bakterií vyskytuje volně v cytoplazmě (Sjöstedt, 2006). Checroun et al. (2006) uvádí rychlejší únik do cytosolu už po 1 hodině po infekci. Mechanismus rozrušení fagozomální membrány není znám. V cytosolu hostitelských buněk virulentní i oslabené kmeny *F. tularensis* začnou intenzivně proliferovat. Replikační proces nezačíná dříve než 6 hodin po infekci a v době vrcholu intracelulární proliferace bakterií končí zničením hostitelské buňky vyvoláním apoptózy. Tato apoptóza je zřejmě upřednostňována patogenem, protože umožňuje bakteriím uniknout z hostitelských buněk a infikovat sousední buňky (Sjöstedt, 2006). U myších makrofágů bylo také pozorováno, že v pozdnějších fázích intracelulární infekce po replikaci v cytoplazmě dochází u části bakterií místo navození apoptózy k opětovnému vstoupení do endocytické cesty prostřednictvím autofágie a stávají se tak součástí velkých, fúzogenních vakuol (Checroun et al., 2006). Není jisté, zda je tento proces součástí buněčné obrany proti infekci, nebo adaptivní strategií bakterií (Steiner et al., 2014).

Molekulární mechanismy a důležité faktory podílející se na řízení jednotlivých fází vnitrobuněčného cyklu *Franciselly*, jako je rozrušení fagozomální membrány nebo únik do cytosolu, zůstávají neobjasněné, ale zdá se, že důležitou roli ve vývoji

fagozomu a následném úniku hrají geny kódované ostrovem patogenity (Chong et Celli, 2010).



Obrázek 3: Intracelulární cyklus rodu *Francisella* v makrofázích (převzato z Chong et Celli, 2010)

Popis obr. 3: Po fagocytóze jsou pohlcené bakterie součástí fagozomu (FCP), který nejprve získává znaky časného (EE) a poté pozdního endozomu (LE), ale už nedochází k fúzi s lysozomem (Lys). Bakterie unikají z endocytické cesty narušením membrány FCP do cytosolu, kde dochází k rozsáhlému množení. Tento proces je ukončen buněčnou smrtí a uvolněním bakterií, nebo u myších makrofágů opětovným vstupem cytosolických bakterií prostřednictvím autofágie do vakuol (FCV).

Je zřejmé, že v průběhu infekčního cyklu je bakterie vystavena různým typům prostředí. Aby tyto změny mikroprostředí úspěšně zvládla, přizpůsobuje se jim navyšováním, nebo snižováním exprese mnoha genů, což jí umožňuje regulovat virulenční fenotyp. Důležitým signálem je dostupnost železa. Snížení koncentrace železa v růstovém médiu (napodobení hostitelského prostředí) zvyšuje expresi virulenčních faktorů kódovaných ostrovem patogenity (FPI). Známým signálem spouštějícím expresi genů potřebných ve virulenci bakterie je také teplota. Největší změně teploty je bakterie vystavena při přechodu z environmentálního (modelově 26 °C) do hostitelského (37 °C) prostředí. Posun teploty vede k pozitivní regulaci genů specifických pro růst a virulenci v savčím prostředí a k potlačení exprese genů zásadních pro přežití v environmentálním prostředí (Hazlett et Cirillo, 2009).

2.4 Faktory virulence

Znalosti týkající se mechanismu patogeneze a virulenčních faktorů *Francisella tularensis* jsou i přes vysokou virulenci bakterie stále nedostatečné. Probíhající genetické studie tyto znalosti rychle rozšiřují a jistě povedou k identifikaci virulenčních faktorů, jejichž nalezení by přispělo k rozvoji bezpečné vakcíny a léčiv (Pechous et al., 2009).

Povrchové struktury

K virulenci *F. tularensis* přispívají jednak povrchové struktury, mezi něž patří kapsula, lipopolysacharidy a pili. Kapsula pokrývající povrch *F. tularensis* je bohatá na sacharidy a pomáhá zvyšovat rezistenci vůči různým environmentálním či hostitelem utvářeným stresovým podmínkám. Tento obal chrání bakterie před lyzí zprostředkovanou sérovým komplementem. Mutanti vykazují vyšší citlivost ke zničení komplementem a zmírnění virulence. Pro vyjádření úplné virulence je zřejmě přítomnost kapsuly nezbytná (Pechous et al., 2009).

Lipopolysacharid (LPS) je hlavní složkou vnější membrány gramnegativních bakterií a je převládajícím epitopem rozpoznávaným vrozeným imunitním systémem. Skládá se z hydrofobní části lipidu A, oligosacharidového jádra a O-polysacharidového řetězce, který určuje antigenicitu (Pechous et al., 2009). *Francisella* LPS se vyznačuje jedinečnými biologickými a strukturálními vlastnostmi. V porovnání s jinými gramnegativními bakteriemi, jako je *E. coli,* LPS produkovaný *F. tularensis* vyvolává velmi nízkou endotoxicitu *in vitro* i *in vivo* a špatně aktivuje protizánětlivou odpověď v důsledku nedostatečné interakce s toll-like receptorem 4 (TLR4). LPS může být modifikován různými sacharidy. Změny v LPS mohou odpovídat za nové fenotypy a ovlivňovat virulenci bakterie. Mutanti postrádající O-antigen mají zhoršené intracelulární přežití a virulenci u myší. Tato povrchová složka je tedy důležitá v patogenezi *F. tularensis*. Neschopnost LPS aktivovat imunitní systém ve spojení s častými změnami LPS pravděpodobně podporuje schopnost *Franciselly* infikovat hostitele (Gunn et Ernst, 2007).

Na povrchu *Franciselly* jsou přítomné pili typu IV. U jiných organismů tyto pili zprostředkovávají přilnutí bakterií k povrchu hostitelských buněk, příjem DNA, pohyblivost a tvorbu biofilmu (McLendon et al., 2006). Studie s *F. tularensis* LVS ukázala, že pili u LVS jsou důležité pro adherenci na povrch hostitelské buňky a *pil* geny kódující povrchová vlákna fungují jako virulenční faktory *F. tularensis* (Chakraborty et al., 2008).

FPI (*Francisella* pathogenicity island)

Ostrov patogenity (FPI) je oblast ve *Francisella* genomu o velikosti přibližně 30 kb, jež zahrnuje klastr genů kódujících faktory virulence. Virulentní poddruhy *tularensis* a *holarctica* mají FPI přítomný v duplikátu, v genomu poddruhu *novicida* je pouze jedna FPI oblast. FPI se vyznačuje v porovnání se zbytkem genomu

nízkým zastoupením guaninu a cytosinu a zahrnuje 17 otevřených čtecích rámců různých velikostí, z nichž většina byla identifikována jako nezbytná pro patogenezi (Nano et al., 2004). Má se také za to, že několik FPI genů kóduje složky sekrečního systému podobného systému typu VI (Pechous et al., 2009).

Geny přítomné v FPI jsou indukovány během intracelulárního růstu *F. tularensis*. Na regulaci FPI genů se podílí podmínky prostředí typu železo a peroxid vodíku a některé regulační faktory včetně MglAB, SspA, PmrA, FevR a MigR (Pechous et al., 2009).

Z hlediska intracelulárního růstu a virulence se jako nepostradatelné pro *F. tularensis* ukázaly geny intracelulárního růstového lokusu *iglABCD* a geny *pdpABCD* (Nano et al., 2004). Proteiny IglABC přispívají k intracelulární patogenezi a mutace v některých z *igl* genů mají za následek zhoršení růstu *F. tularensis* v makrofázích. IglA a IglB jsou interagující cytoplazmatické proteiny a zdá se, že se účastní sekrece. IglC inhibuje zrání fagozomu, také je důležitý pro únik bakterií do cytosolu. IglD je potřebný pro intracelulární replikaci *Franciselly* v lidských makrofázích i pro intracelulární replikaci u myší (Pechous et al., 2009).

Gen *pdpA* je nezbytný pro virulenci, ale jeho funkce ani funkce ostatních *pdp* genů není známá. Gen *pdpD* je přítomný u poddruhu *novicida* a *tularensis,* ale u poddruhu *holarctica* jeho značná část chybí. PdpD je zřejmě zapojený do intramakrofágového přežití (Steiner et al., 2014).

Některé geny v rámci FPI včetně *vgrG*, *dotU* a několika *igl* genů sdílejí sekvenční homologii, biochemické a strukturální vlastnosti s geny zapojenými do sekrečního systému typu VI jiných bakterií. Produkty genů *vgrG* a *iglI* jsou vylučovány bakteriemi v průběhu intracelulární infekce (Steiner et al., 2014).

Regulátory transkripce

Ve virulenci *F. tularensis* hraje významnou roli tzv. makrofágový růstový lokus s geny *mglA* a *mglB*. Tyto geny jsou organizovány v operonu. MglA je globálním transkripčním faktorem *F. tularensis*, který reguluje mnoho genů i v rámci FPI. MglA je homologní k SspA proteinu *E. coli*, který reguluje expresi četných genů v odpovědi na nutriční stres (Sjöstedt, 2006). Mutace v genech *mglA* a *mglB* oslabují intracelulární růst *F. tularensis*. Narušení *mglA* tlumí schopnost *Franciselly* inhibovat zrání fagozomu a unikat do cytosolu hostitelské buňky, což je pravděpodobně v důsledku regulace genů *iglABCD* (Pechous et al., 2009).

Vysokou homologii k MglA vykazuje transkripční faktor SspA *F. tularensis*. U *F. tularensis* LVS SspA i MglA interagují s RNA polymerázou. Tyto transkripční faktory koregulují stejné soubory genů a společně tak v kombinaci s RNA polymerázou působí na regulaci genové exprese (Pechous et al., 2009).

Regulačním faktorem nezbytným pro expresi virulenčních faktorů je dále FevR, u něhož bylo zjištěno, že je zapojený do exprese genů v rámci FPI a dalších genů MglA/SspA regulonu. Předpokládá se, že MglA a FevR paralelním působením pozitivně regulují expresi virulenčních faktorů. FevR je zásadní pro bakteriální replikaci v makrofázích a u myší (Brotcke et Monack, 2008).

MigR byl popsán jako regulátor exprese *iglABCD* operonu v LVS a pozitivní regulátor transkripčního faktoru FevR. Není objasněno, zda regulace *igl* transkripce je přímá, nebo nepřímá prostřednictvím vlivu na FevR. Zajímavé je, že mutanti pro *migR* jsou oslabení při růstu v makrofázích, ale ne v epiteliálních buňkách (Buchan et al., 2009).

Osamoceným regulátorem genové exprese je PmrA, který se podílí na regulaci 65 genů, z nichž většina leží v oblasti obklopující *pmrA*, nebo v FPI (Mohapatra et al., 2007).

2.4.1.1 Histone-like protein HU

Histone-like proteiny jsou malé, bazické, DNA vazebné proteiny syntetizované prokaryotickými buňkami. Jsou nezbytné pro zajištění integrity bakteriálního genomu a regulaci genové exprese. Kvůli srovnatelné funkci s eukaryotickými histony jsou někdy nazývány jako proteiny podobné histonům (histone-like protein) (Pettijohn, 1988). Podobnost na sekvenční nebo strukturální úrovni je pouze okrajová, proto je nyní častěji používáno označení nukleoid asociované proteiny (NAP), což primárně odráží jejich lokalizaci (Gupta et al., 2014). NAP mají nízkou molekulovou hmotnost (16-20 kDa) a jsou v buňkách přítomné v dostatečně vysokých koncentracích (Anuchin et al., 2011).

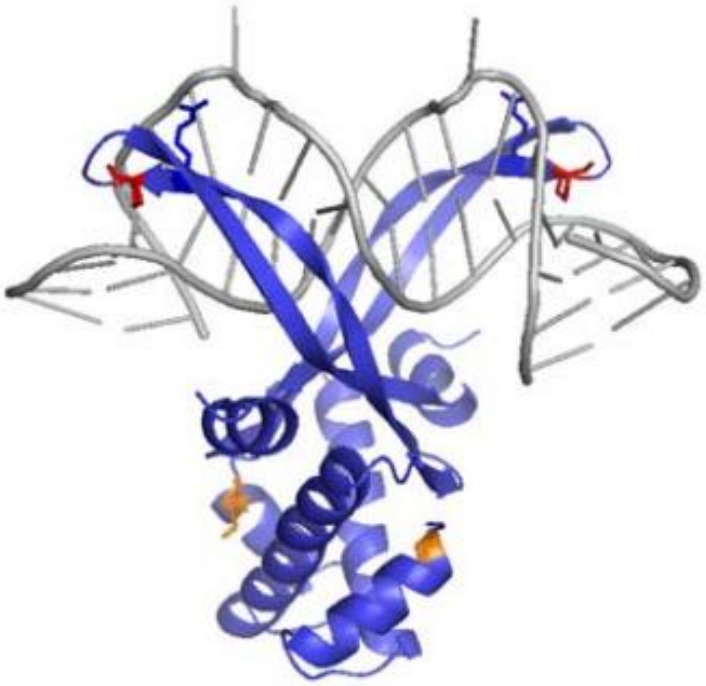
NAP jsou považovány za globální regulátory genové exprese u bakterií. Jako strukturní proteiny stanovují celkovou DNA konformaci tím, že nukleovou kyselinu zabalují, ohýbají či stáčejí, což vede k mnoha účinkům na bakteriální buňky. NAP jsou zapojené do regulace aktivit jednotlivých genů a do procesů, jako je rekombinace, replikace, transkripce a opravy DNA. Jsou to sekvenčně nespecifické DNA vázající proteiny (Azam et Ishihama, 1999).

Na základě stupně homologie aminokyselinové sekvence jsou rozlišovány čtyři hlavní skupiny histonům podobných proteinů, a to HU (histone-like proteins *E. coli* U93), H-NS (histone-like nucleoid structuring proteins), IHF (integration host factors) a FIS (factors for inversion stimulation). Jsou také další histonům podobné proteiny, které nemají homologii s těmito hlavními skupinami (Anuchin et al., 2011). Většina bakteriálních druhů nekóduje homology všech těchto proteinů. Ale zdá se, že HU proteiny jsou kódovány všemi eubakteriemi, nalezeny byly i v archebakteriích a organelách typu chloroplastů, kde zřejmě také plní funkci při organizaci DNA. HU patří k nejvíce konzervativním NAP (Pettijohn, 1988; Grove, 2011).

Název HU je odvozen od kmene *E. coli* U93, ze kterého byl poprvé izolován, H značí „histone-like“ (Drlica et Rouviere-Yaniv, 1987). Aktivní protomery fungují jako dimery a jsou malé, obvykle složené z 90-99 aminokyselin. Typicky se jedná o homodimery složené pouze z jednoho typu podjednotky. HU z *E. coli* a dalších enterobakterií jsou heterodimery (Grove, 2011). Ve formě heterodimeru je protein složen ze dvou podjednotek HU-α a HU-β kódovaných geny *hupA* a *hupB* (Pettijohn, 1988). U *E. coli* jsou pozorovány i homodimery ve formě HU-α2, HU-β2. Převaha jednotlivých forem souvisí s různými fázemi růstu. Heterodimery jsou dominantní

formou ve většině fází kromě počátku exponenciální fáze, ve které převládá HU-α2, HU-β2 je detekován převážně v pozdní stacionární fázi (Claret et Rouviere-Yaniv, 1997).

HU proteiny jsou kladně nabité a sekvenčně i strukturálně konzervativní (Obr. 4). Jsou tvořeny kompaktním jádrem propletených monomerů. Dva helikální segmenty z každého monomeru tvoří tělo proteinu, které je uzavřeno β-listy, jež se prodlužují v β-řetězce objímající DNA šroubovici. β-řetězce jsou v nepřítomnosti DNA z velké části neuspořádané a skládají se za účelem vazby na DNA. Strukturu doplňuje krátký C- terminální α-helix. β-řetězce obsahují terminální prolin, který umožňuje ohyb DNA vložením mezi páry bazí. DNA- interkalační prolin je konzervativní a jeho substituce způsobuje významně pozměněné vázání DNA. HU proteiny jsou typicky poměrně teplotně stabilní (Grove, 2011).



Obrázek 4: Struktura *Anabaena* HU v komplexu s DNA. DNA-interkalační proliny jsou zvýrazněny červenou barvou (Grove, 2011)

Na rozdíl od většiny DNA vazebných proteinů se HU proteiny váží na dsDNA, ssDNA i RNA (Drlica et Rouviere-Yaniv, 1987). Vazba HU k DNA je sekvenčně nespecifická, ačkoliv zřejmě i z důvodu energetické náročnosti ohybu DNA vyvolaného HU vazbou, tyto proteiny upřednostňují vazbu na DNA se strukturálními narušeními spíše než vazbu na dokonalý DNA duplex. HU proteiny mají potenciál nejen volit preferovaný DNA substrát, ale také vyvolat v DNA strukturální deformace na různých vazebných místech. Tato vlastnost přispívá k široké škále s DNA spojených činností, kterých se HU proteiny účastní (Grove, 2011). HU *E. coli* se váže se zvláštní preferencí k cílovým A/T bohatým úsekům (Prieto et al., 2012).

HU proteiny jsou schopné zavést negativní nadšroubovicové vinutí do relaxované cirkulární molekuly DNA v přítomnosti topoizomerázy I a vést ke kompakci DNA (Anuchin et al., 2011). HU mají ale pravděpodobně dvojí účinek na strukturu DNA, který závisí na místní koncentraci tohoto proteinu. Vazba jednotlivých HU dimerů v náhodných polohách může vyvolat ohyb DNA a zvýšit průměrnou flexibilitu DNA. Dame a Goosen (2002) navrhují, že vazba více HU dimerů v těsné blízkosti se zřejmě nepodílí na kompakci chromozomální DNA *E. coli*, ale že hraje roli modulátoru kompaktnosti nukleoidu antagonizací kompaktního efektu H-NS. Rozdíly v úrovni HU exprese tak mohou nepřímo ovlivňovat expresi velkého počtu genů (Dame et Goosen, 2002).

Rozsah působení HU na genovou expresi byl zjišťován pro různé patogenní i nepatogenní druhy bakterií. U *E. coli* se HU projevuje poměrně pleiotropním účinkem, protože hraje roli v mnoha buněčných procesech, jako je iniciace replikace DNA (Hwang et Kornberg, 1992) či místně specifická rekombinace (Li et Waters, 1998). HU je zapojený do regulace aktivity několika promotorů. Například je nezbytný pro účinnou a koordinovanou represi dvou překrývajících se *gal* promotorů *E. coli*, při níž je třeba Gal represor a jako kofaktor HU protein. Interakce DNA a HU umožňuje represoru utvořit smyčku v místě promotorů (Aki et Adhia, 1997).

HU proteiny se váží také k transkripčním terminátorům, které mají dyádovou symetrii následovanou AT páry bazí. Oblast terminátoru zřejmě přitahuje HU proteiny vytvářením vlásenky v nadšroubovicové DNA. V mnoha procesech HU napomáhá prostorově odděleným sekvenčně specifickým DNA vazebným proteinům ke spojení tím, že se naváže a ohne příslušnou DNA oblast (Aki et Adhia, 1997).

HU mohou ovlivňovat i translaci vazbou na mRNA. Příkladem, HU je jedním z faktorů účastnících se exprese genu *rpoS* kódujícího sigma S podjednotku RNA polymerázy. HU se specificky váže k RNA v místě iniciační translační oblasti *rpoS* mRNA. V buňkách postrádajících HU je translace *rpoS* velmi ovlivněna. HU je tak požadován pro optimální přežití *E. coli* za stresových podmínek vyvolaných delším hladověním (Balandina et al., 2001).

HU regulon *E. coli* zahrnuje velké množství genů a reguluje cca 8 % genomu. Obsahuje čtyři biologicky významné třídy genů, jejichž regulace je reakcí na anaerobiózu, acidifikaci, vysokou osmolaritu a SOS indukci. Bylo zjištěno, že HU *E. coli* reguluje expresi pomocí dvou mechanismů, prvním je spolupráce s transkripčními regulátory, jako je LexA, GadX z FNR, druhým je samostatné působení HU na cílové oblasti ve struktuře DNA (Oberto et al., 2009).

V rámci genomické analýzy provedené s *E. coli* K12 mutanti s deficitem v HU rovněž vykazovali velké změny v genové expresi. Se zahrnutím všech tří typů mutantů bylo zaznamenáno navýšení či snížení exprese 1490 genů. Největší vliv na genovou expresi byl pozorován u Δ*hupAB* kmene (1266 genů), u něhož byla většina odlišně exprimovaných genů up-regulována. Nejméně byl změněn expresní profil u Δ*hupB*. Up-regulované geny v Δ*hupAB* jsou zapojené do základních

buněčných procesů typu translace a ukazují vyšší vazbu k DNA gyráze. Zajímavé je, že konzervativnější podjednotka HU napříč bakteriemi, kterou je HupB, hraje u *E. coli* a *Salmonella enteritica* v kontrole genové exprese menší roli (Prieto et al., 2012).

Z výše uvedeného je patrné, že HU *E. coli* reguluje mnoho důležitých genů zapojených do bakteriálních adaptací na změny environmentálního prostředí i genů potřebných k odpovědím na stres. Přesto, ačkoliv HU hraje roli strukturálního i regulačního faktoru, pro životaschopnost buněk *E. coli* není nezbytný (Kano et Imamoto, 1990). I dvojití mutanti postrádající obě podjednotky HU jsou životaschopní, i když vykazují určité růstové defekty a narušení buněčného dělení (Huisman et al., 1989). Toto bylo odůvodněno zjištěním, že role HU v *E. coli* může být částečně komplementována jinými NAP, jako je IHF (Kano et Imamoto, 1990).

Úloha HU proteinů v regulaci genů byla zkoumána také u *Salmonella typhimurium*. Dimerní HU proteiny jsou u salmonel složeny z různých kombinací HU-α a HU-β podjednotek. V práci Mangan et al. (2011) byl pro každého ze tří typů mutantů detekován odlišný, ale překrývající se profil genové exprese, čímž byly odhaleny tři regulony genů řízených HU proteiny. Mutace v *hup* genech ovlivňovaly expresi regulačních i strukturních genů v SPI1 i SPI2 ostrově patogenity. Dvojití mutanti měli zhoršený růst, byli defektní v invazi epiteliální buněčné linie a ve schopnosti přežít v makrofázích, došlo u nich ke snížení fitnes. Inaktivace pouze genu *hupB* měla za následek naopak zvýšení fitnes a korelovala s up-regulací členů RpoS regulonu v exponenciální fázi růstu. HU *S. typhimurium* koordinuje expresi genů zapojených v centrálním metabolismu a virulenci a přispívá k úspěchu *S. typhimurium* jako patogenu (Mangan et al., 2011).

Pro některé bakterie jsou HU životně důležité a jejich role je nezastupitelná. Například u *Streptococcus intermedius* bylo prokázáno, že tyto proteiny jsou nezbytné pro životaschopnost buněk a normální růst, což je podporováno faktem, že se ze *S. intermedius* nezdařilo připravit mutanta v genu kódujícím histone-like protein *Si*-HLP (homodimerní protein, homologní k HU *E. coli*). Místo toho byl zkonstruován kmen s indukovanou transkripcí antisense *Si-hlp* RNA, u něhož byla prokázána omezená schopnost růstu a byly pozorovány významné změny v buněčné morfologii a v povrchových vlastnostech buňky. Také došlo k ovlivnění úrovně transkripce několika genů včetně faktorů spojených s virulencí. HLP *Streptococcus intermedius* tak slouží jako esenciální NAP upravující architekturu nukleoidu a kontrolující genový transkripční profil (Liu et al., 2008).

Mykobakterie mají HU tvořený pouze jedním typem podjednotky kódované genem *hupB*. N-terminální sekvence mykobakteriálního HU je homologní k N-terminální sekvenci HU *E. coli*. C-terminální doména je bohatá na prolin, alanin a lysin a obsahuje motiv odpovídající eukaryotickému histonu H1, který zahrnuje repetitivní sekvence PAKKA (Anuchin et al., 2011). HupB má vlastnosti nukleoid asociovaného proteinu pokud jde o nespecifickou DNA vazebnou aktivitu. C-koncová oblast zajišťuje navýšení specificity při vazbě na DNA a zřejmě napomáhá

při sevření DNA. Vazba HupB k DNA je stabilní a chrání DNA před působením reaktivních forem kyslíku a štěpením DNázou I. HupB vykazuje zvýšenou preferenci vazby k AT bohaté DNA, stejně jako HU *E. coli*. Vzhledem k upřednostňování vazby na AT bohaté úseky bylo navrženo, že by místem působení HupB v mykobakteriálním genomu mohly být replikační počátky a regulační oblasti genů. HupB je také považován za nezbytný pro mykobakteriální růst, což je v souladu s předpokladem možné účasti při replikaci DNA (Kumar et al., 2010).

Mykobakteriální HupB se podílí na adaptaci bakterií ke stresovým podmínkám, a to možná inhibicí buněčného metabolismu a snížením růstové rychlosti bakterií reorganizací nukleoidu (Gupta et al., 2014). Ve fázích zpomaleného růstu dochází k indukci exprese HupB, což značí určitou jeho roli v přežití dormantní fáze bakterií (Lee et al., 1998).

V nedávné studii bylo zjištěno, že DNA vazebná aktivita mykobakteriálního HupB je regulována fosforylací. HupB je součástí serin/threonin proteinkinázové signalizace a je fosforylován na serinových i threoninových zbytcích. Fosforylace N-terminální domény HupB (N-HupB) prokazatelně vede ke snížení interakce s DNA. Je navrženo, že aktivita je upravována fosforylací v závislosti na růstové fázi (Gupta et al., 2014).

Histone-like protein HU forma B (HuB) *Francisella tularensis*

V rámci studie Lenco et al. (2009) byla za využití iTRAQ analýzy odhalena sada proteinů potenciálně se podílejících na virulenci dvou *Francisella* kmenů: LVS (subsp. *holarctica*) a SCHU S4 (subsp. *tularensis*). Konkrétně byla studie zaměřena na změny *Francisella* proteomu v souvislosti s kultivací při různých teplotách a ve stacionární fázi růstu. Proteomickou analýzou byl mezi kandidáty pro virulenční faktory zařazen také histone-like protein HU forma B (HuB).

HU *Francisella tularensis* je 90 aminokyselin velký protein, odhadované pI je 9,79. V aktivní formě je to homodimer tvořený jedním typem podjednotky kódované genem *huB*. Sekvence genu *huB* je známá a dostupná v databázi NCBI-lokus FTS _0886 pro *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200 (NCBI, 2014).

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a laboratorní zařízení

Název:	**Výrobce**
Centrifuga 5804 R	Eppendorf
Centrifuga Biofuge Pico	Heraeus
Centrifuga Megafuge 16 R	Thermo Scientific
Centrifuga Mini Pico 21	Heraeus
Centrifuga MiniSpin plus	Eppendorf
CO_2 Inkubátor 5215	SHEL LAB
Densitometr CO8000	WPA Biowave
Elektroforéza Mupid-One	NIPPON Genetics
Gene Pulser Xcell Electroporaton System	Bio-Rad
Ice Flaker GB 1540	Brema
Labcycler Gradient 96	SensoQuest
Laboratorní autokláv MLS-3020 U	Sanyo
Laboratorní elektrická váha 440-33 N	KERN
Laminární box SafeFlow 1.2	BIOAIR Instruments
Lázeň digitální Hot block, 2	P-LAB
Lednice	ARDO
Lednice	Whirlpool
Míchačka magnetická Big Squid	IKA
Mikropipety	Eppendorf
Mikrovlnná trouba	LG
Minitřepačka MS 3 digital	IKA
Mrazák Lexicon ULT	ESCO
Mrazák Ultra low	Sanyo
MS Vortex Incubator	Major Science
NanoPhotometer UV/Vis spectrophotometer	Implen
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research
Systém Infinity 3026 WL	Schoeller
Termostat závěsný Assistent 3180	Karl Hecht GmbH & Co
Thermo-Shaker TS 100	Biosan
Třepačka inkubátor Ecotron	INFORS HT
Třepačka inkubátor Multitorn Standatd	INFORS HT
Třepačka inkubátor S16-2	SHEL LAB
Třepačka Minishaker MS2	IKA
Vodní lázeň třep. SWB-10L-1	Major Science

3.2 Materiál

Chemikálie

Název:	**Výrobce**
100 mM dNTP	Qiagen
10x NEBuffer 4	New Englad Biolabs
10x *Pfu*Ultra II reakční pufr	Agilent Technologies
10x Standard *Taq* Reaction Buffer	New Englad Biolabs
2x Quick Ligation Reaction Buffer	New Englad Biolabs
50x TAE pufr	Serva
Agaróza	BioRad
Agaróza pro preparativní elektroforézu	Cambrex
Ampicilin (sodná sůl)	Serva
BSA	New Englad Biolabs
Calcium pantothenate	Sigma Aldrich
CutSmart	New Englad Biolabs
Deoxycholát sodný ($C_{24}H_{39}NaO_4$)	USB
Dietyléter ($C_4H_{10}O$)	Penta
Difco^{TM}GC medium base	BD
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	Sigma Aldrich
DL-methionin	Sigma Aldrich
DL-prolin	Sigma Aldrich
DL-serin	Sigma Aldrich
DL-threonin	Sigma Aldrich
DL-valin	Fluka
DMEM GlutaMAX médium	Invitrogen
DMSO	Sigma Aldrich
Ethanol (C_2H_5OH)	Penta
Gentamicin (zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml)	Sigma Aldrich
Glukóza p.a. ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma Aldrich
Glycerol ($C_3H_8O_3$)	Penta
Heat- inactivated FBS	Dominique Dutscher
Hemoglobin, Bovine, Freeze-Dried	BD
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N´- [2-ethanesulfonic acid])	Sigma Aldrich
Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	Sigma Aldrich
Hydrogenfosforečnan sodný (Na_2HPO_4)	Penta
Chloramfenikol	Sigma Aldrich
Chlorid draselný (KCl)	Lachema
Chlorid hořečnatý ($MgCl_2$)	Lachema
Chlorid manganatý ($MnCl_2$)	Lachema

Chlorid sodný p.a. (NaCl)	Sigma Aldrich
Chlorid vápenatý ($CaCl_2$)	Penta
Isopropylalkohol (C_3H_8O)	Serva
IsoVitaleX™ Enrichment	BD
Kanamycin sulfát	Serva
L- conditioned medium	-
L-arginin-HCl	Sigma Aldrich
L-cystein-HCl	Fluka
L-histidin-HCl	Sigma Aldrich
L-isoleucin	Sigma Aldrich
L-kyselina asparagová	Sigma Aldrich
L-leucin	Sigma Aldrich
L-lysin-HCl	Sigma Aldrich
L-tyrosin	Sigma Aldrich
Nanášecí pufr (6x DNA Loading Dye)	Thermo Scientific
Penicilin- streptomycin (zásobní roztok penicilin 10 000 U/ml, streptomycin 10 mg/ml)	Sigma Aldrich
Polymyxin B sulfát	Sigma Aldrich
Sacharóza ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	Sigma Aldrich
Síran hořečnatý ($MgSO_4$)	Sigma Aldrich
Síran hořečnatý heptahydrát ($MgSO_4.7H_2O$)	Sigma Aldrich
Síran železnatý heptahydrát ($FeSO_4.7H_20$)	ICN Biomedicals Inc.
SOC médium	New Englad Biolabs
Spermine tetrahydrochlorid ($C_{10}H_{26}N_4 \cdot 4HCl$)	Sigma Aldrich
SYBR Safe DNA gel stain	Invitorgen
Thiamin-HCl	Sigma Aldrich
Trypton	Oxoid
Yeast extrakt	Serva

DNA standardy

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
HyperLadder I	Bioline

Enzymy

Název	**Výrobce**
Restrikční enzymy:	
*Xho*I	New Englad Biolabs
*Sac*I	New Englad Biolabs
*Nde*I	New Englad Biolabs
*Hind*III-HF	New Englad Biolabs
DNA polymerázy:	
Taq DNA polymeráza	New Englad Biolabs

PfuUltra II Fusion HS DNA polymeráza	Agilent Technologies
Quick-Load *Taq* 2X Master Mix	New Englad Biolabs
Ostatní	
Quick Ligase	New Englad Biolabs

Komerční sady

AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad)- izolace chromozomální DNA
QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)- izolace plazmidové DNA
QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)- izolace DNA z agarózového gelu
TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen)
Quick Ligation Kit (New England Biolabs)- ligace inzertu a vektoru

Bakteriální kmeny

Seznam kmenů *Escherichia coli* a *Francisella tularensis* použitých v této práci:

- *Escherichia coli* XL1- Blue- pro klonování (Stratagene): endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB$^+$ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K^- m_K^+)
- *Escherichia coli* NEB Turbo- chemokompetentní buňky pro klonování (New Englad Biolabs): F' proA$^+$B$^+$ lacI^q ΔlacZM15 / fhuA2 Δ(lac-proAB) glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)Tet^S endA1 thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5
- *Escherichia coli* S17-1 λpir- donorový kmen pro konjugativní přenos plazmidové DNA (Simon et al., 1983): recA, thi, pro, hsdR$^-$M+, <RP4:2-Tc:Mu:Km:Tn7>Tp^R, Sm^R
- *Francisella tularensis* subsp*. holarctica* kmen FSC200 (klinický izolát, *Francisella* Strain Collection (FSC) of the Swedish Defense Research Agency, Umeå, Sweden)
- *Francisella tularensis* subsp*. holarctica* kmen FSC200/Δ*huB* – kmen s delecí genu pro histone-like protein B připravený v rámci diplomové práce
- *Francisella tularensis* subsp*. holarctica* kmen FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* – *trans* komplementovaný deleční kmen připravený v rámci diplomové práce

Vektory

- pCR4-TOPO (Invitrogen)(mapa viz Příloha 1)
- pDM4 (Milton et al., 1996): *mob*$_{RP4}$; *ori*$_{R6K}$; *sacB*; Cm^R
- pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008): Ft *ori*, p15a *ori,* Km^R, groES promotor (mapa viz Příloha 2)

Kultivační půdy

Do selektivních půd byla přidávána antibiotika (po zchladnutí na přibližně 50 °C) ve finální koncentraci: ampicilin 100 μg/ml, kanamycin 50 μg/ml, chloramfenikol 25 μg/ml pro kultivaci *E. coli* a kanamycin 20 μg/ml, chloramfenikol 2,5 μg/ml, polymyxin B 75 μg/ml pro kultivaci *F. tularensis*.

Živné půdy pro kultivaci *E. coli*

LB médium

- Na 1 litr: Trypton 10 g, kvasniční extrakt 5 g, NaCl 10 g, doplnit demineralizovanou vodou na objem 1 litr. Médium bylo sterilizováno v autoklávu.

LB agar

- Na 100 ml LB média přidat 1,5 g agaru a roztok sterilizovat v autoklávu. Ztuhlé plotny byly uchovávány v lednici.

Živné půdy pro kultivaci *F. tularensis*

McLeod agar

- Pevná McLeod půda se připravuje ze dvou pracovních roztoků:
  Roztok I
  Difco™GC medium base 72 g, deionizovaná voda 1 litr. Smíchat a povařit do rozpuštění. Roztok se připravuje v den přípravy ploten.
  Roztok II
  Hemoglobin 20 g, deionizovaná voda 1 litr. Odvážený hemoglobin zalít deionizovanou vodou a nechat do druhého dne za stálého míchání bobtnat.
- Oba připravené roztoky byly autoklávovány při 121 °C po dobu 20 minut. Poté byly sterilně smíseny a nechány zchladnout na cca 50 °C. Dále bylo přidáno 20 ml IsoVitalexu, případně příslušná antibiotika, nebo 5 % sacharóza a půda byla rozlita do sterilních Petriho misek. Ztuhlé plotny byly uchovávány v lednici.

Kompletní Chamberlainovo médium

- Chemikálie (rozpis níže v Tab. 3 a 4) pro roztoky 1, 2 a 3 byly naváženy a pro každý roztok zvlášť rozpuštěny v cca 200 ml demineralizované vody. Roztok 4 byl připraven rozpouštěním za přidávání 3M NaOH.
- Roztoky byly smíchány s předepsanými objemy jejich doplňků.
- Připravený roztok 1 byl smíchán s roztokem 2 a zamíchán. Poté byl přidán roztok 3 a k čirému roztoku 1+2+3 byl přidán roztok 4 a zamíchán.

- Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na 6,3 a objem roztoku byl doplněn do 2 litrů. Médium bylo přefiltrováno přes jednorázový 0,22 μm filtr do sterilních lahví a uchováváno při 4 °C.

Tabulka 3: Chemikálie pro přípravu jednotlivých roztoků Chamberlainova média

Roztok 1	**% koncentrace**	**Navážka na 2 litry (gramy)**
L-arginin-HCl	0,04	0,8
L-cystein-HCl	0,02	0,4
L-histidin-HCl	0,02	0,4
L-isoleucin	0,04	0,8
L-leucin	0,04	0,8
L-lysin-HCl	0,04	0,8
DL-prolin	0,2	4,0
DL-serin	0,04	0,8
DL-threonin	0,2	4,0
DL-valin	0,04	0,8
DL-methionin	0,04	0,8
Roztok 2		
Glukóza p.a.	0,4	8,0
Roztok 3		
NaCl p.a.	1,0	20,0
KH_2PO_4	0,1	2,0
K_2HPO_4	0,1	2,0
Roztok 4		
L-kyselina asparagová	0,04	0,8
L-tyrosin	0,04	0,8

Tabulka 4: Doplňky roztoků Chamberlainova média

Doplňky roztoku 1	**% koncentrace**	**Navážka (gramy)**	**Voda (ml)**	**Do 2 litrů média přidat**
Thiamin-HCl	0,0004	0,02	10	4 ml roztoku
Spermine tetrahydrochlorid	0,004	0,08	10	10 ml roztoku
Calcium pantothenate	0,0002	0,01	10	4 ml roztoku
Doplňky roztoku 2				
$MgSO_4.7H_2O$	0,0135	0,675	10	4 ml roztoku
$FeSO_4.7H_20$	0,0002	0,01	10	4 ml roztoku

Kultivace savčích buněk

Kultivační BMMs médium

- DMEM médium, 10 % teplotně inaktivované FBS (filtrované), 10 % L-conditioned médium z L929 buněk

- BMMs médium s antibiotiky: přidat 50 U/ml penicilin, 50 µg/ml streptomycin

Zásobní a pracovní roztoky

- Zásobní roztoky antibiotik:
  - Zásobní roztoky (ampicilin 50 mg/ml, kanamycin 50 mg/ml, polymyxin B 75 mg/ml) byly připraveny rozpuštěním antibiotika ve sterilizované vodě a přefiltrováním přes 0,22 µm filtr. Zásobní roztok chloramfenikolu (25 mg/ml) byl připraven rozpuštěním v etanolu.
  - Roztoky byly uchovávány při -20 °C.
- Roztoky primerů:
  - Lyofilizovaný primer dodaný výrobcem byl rozpuštěn ve sterilizované vodě na koncentraci 100 pmol/µl (0,1 mM roztok). Pracovní roztok byl připraven naředěním na koncentraci 10 pmol/µl (10 µm roztok).
- dNTP
  - Z jednotlivých 100 mM dNTP (Qiagen) byl připraven naředěním sterilizovanou vodou pracovní roztok dNTP směsi o koncentraci 10 mM pro každý dNTP.
- dATP
  - Ze 100 mM dATP (Qiagen) byl připraven naředěním sterilizovanou vodou pracovní roztok o koncentraci 10 mM.
- PBS: 10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4, pH=7,4
- SOB: 2 % trypton, 0,5 % yeast extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl. Po sterilizaci v autoklávu byl přidán 10 mM $MgCl_2$ a 10 mM $MgSO_4$.
- TB (10 x koncetrované): 10 mM HEPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl. Rozpustit ve vodě a sterilizovat filtrací. Poté přidat 55 mM $MnCl_2$.
- 1 % agarózový gel: na 20 ml gelu- 0,2 g agarózy, 20 ml 1x TAE pufru, 2 µl SYBR Safe
- Fyziologický roztok: 0,9 % roztok NaCl
- Zamražovací roztok: fyziologický roztok s 10 % glycerolem
- 0,1 % deoxycholát sodný: 0,01 g rozpustit v 10 ml PBS, nefiltrovat

3.3 Kultivace bakterií

Z důvodu zabezpečení sterilního prostředí a tím zabránění nechtěné kontaminaci byla všechna zaočkování médií bakteriemi prováděna v prostoru laminárního boxu.

E. coli kmeny byly kultivovány v tekutém i pevném LB médiu při 37 °C. V tekutém médiu kultivace probíhala za stálého třepání 200 rpm. Kultivace *E. coli* nesoucí plazmidový vektor probíhala pod selekčním tlakem příslušného antibiotika, ke kterému nesl daný plazmid rezistenci.

F. tularensis byla kultivována na McLeod agaru nebo v tekutém Chamberlainově médiu při 37 °C. V tekutém médiu kultivace probíhala za stálého třepání 200 rpm. Pro zaočkování bylo používáno pouze předehřáté Chamberlainovo médium. *F. tularensis* nesoucí plazmidový vektor byla kultivována pod selekčním tlakem příslušného antibiotika.

3.4 Izolace chromozomální DNA

Chromozomální DNA byla izolována z *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200 s použitím komerční soupravy AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad).

Bakteriální kultura *F. tularensis* FSC200 byla připravena vysetím zásobní kultury na McLeod agar a následnou kultivací 24-48 hodin (podle nárůstu bakterií) při 37 °C. Poté byla kultura přepasážována na jednu, nebo dvě McLeod půdy a kultivována při 37 °C 20-24 hodin. Z narostlé kultury byla připravena suspenze v PBS o OD_{600} = 0,6.

Dále bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

3.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Pro následnou práci s izolovanou DNA je důležité znát její koncentraci v roztoku, především z důvodu přidávání optimálního množství DNA do reakcí a přispění tak k jejich správnému průběhu.

Koncentrace DNA byla měřena na přístroji NanoPhotometer (Implen). K měření byly používány speciální Label Guard kyvety a víčko s faktorem 10 (ředění 1:10).

Vzorek byl nanášen v objemu 3 µl a proti slepému vzorku byla proměřena jeho absorbance při vlnových délkách 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm.

Koncentraci nukleových kyselin ve vzorku odráží absorbance při 260 nm. Čistota izolované DNA byla zjištěna z poměru A_{260}/A_{280}. Čistá DNA vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 1,8. Při znečištění bílkovinami nastává zvýšení absorpce při 280 nm a hodnota poměru klesá, při znečištění RNA naopak hodnota poměru stoupá.

3.6 Elektroforetická separace DNA v agarózovém gelu a izolace DNA fragmentů z agarózového gelu

Separace molekul DNA byla prováděna v 1 % agarózovém gelu. Agarózový gel byl připraven z 1 % agarózy a 1 x TAE pufru. Jako fluorescenční barvivo určené k vizualizaci DNA byl do gelu přidáván SYBR-Safe. Po rozpuštění agarózy byl roztok nalit do elektroforetické vaničky se vsazeným hřebenem pro vytvoření jamek. Po úplném zatuhnutí byl hřeben opatrně vyjmut, gel vložen do elektroforetické vany a zalit 1x TAE pufrem tak, aby byl gel zcela ponořen. Do jamek gelu byly naneseny vzorky DNA s přidaným nanášecím pufrem, pro rozpoznání velikostí fragmentů byl do jedné nebo několika jamek nanesen standard molekulových hmotností. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 30 minut. Fragmenty DNA byly zviditelněny pod UV světlem. V případě následné izolace fragmentů DNA z gelu a práce s nimi bylo k detekci použito filtru, který UV světlo mění na modré světlo.

K izolaci DNA z agarózového gelu byla využita komerčně vyráběná souprava QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Při práci byly dodržovány pokyny výrobce.

3.7 Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla z bakterií *E. coli* a *F. tularensis* izolována pomocí komerčně vyráběné soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). V průběhu izolace bylo postupováno přesně podle pokynů výrobce.

3.8 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

DNA byla štěpena restrikčními enzymy *Xho*I, *Sac*I, *Nde*I a *Hind*III. Použité enzymy rozpoznávají palindromatické sekvence (Tab. 5) a výsledkem štěpení jsou kohézní konce. Zvolené enzymy optimálně pracují v pufru 4, za přidání BSA do reakce. Pouze do reakcí s *Hind*III byl použit restrikční pufr CutSmart, bez přidání BSA. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6. Štěpení probíhalo při 37 °C po dobu 4 hodin. Správnost štěpení byla ověřena elektroforézou v 1 % agarózovém gelu.

Tabulka 5: Rozpoznávací sekvence a místa štěpení použitých enzymů

Enzym	Rozpoznávací sekvence a místo štěpení
*Sac*I	5'...GAGCT▼C...3' 3'...C▲TCGAG...5'
*Xho*I	5'...C▼TCGAG...3' 3'...GAGCT▲C ...5'
*Nde*I	5'...CA▼TATG...3' 3'...GTAT▲AC...5'
*Hind*III	5'...A▼AGCTT...3' 3'...TTCGA▼A...5'

Tabulka 6: Reakční směs pro restrikční štěpení DNA

Komponenta	Objem (µl)
DNA	Variabilní
10x restrikční pufr	1
10x BSA	1
Enzym	0,5
Enzym	0,5
Voda	Doplněk do 10 µl
Celkový objem	**10**

Množství plazmidové DNA do reakční směsi pro kontrolní restrikce bylo cca 200 ng.
Jiná restrikční štěpení než kontrolní byla obvykle prováděna v dvojnásobném objemu 20 µl a DNA byla přidávána v objemu 14 µl.

3.9 Navržení primerů pro PCR amplifikace

Sekvence genu *huB* a jeho okolí byla získána z databáze NCBI (lokus FTS _0886 pro *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200). Primery byly navrženy manuálně za dodržení obecných pravidel pro navrhování PCR primerů. Prostřednictvím online aplikace OligoAnalyzer Tool (dostupné z https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/) byla u navržených primerů zkontrolována tvorba vlásenek a dimerů. Primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech (Hradec Králové).

Primery pro přípravu delečního konstruktu byly navrženy komplementárně k postranním sekvencím deletovaného genu tak, aby ohraničovaly úsek délky cca 1300 bp před genem zájmu (včetně start kodonu deletovaného genu) a oblast přibližně stejného rozsahu za tímto genem (zahrnující i stop kodon deletovaného genu). 5'-konec vnějších primerů byl modifikován přidáním nekódující sekvence a rozpoznávacího místa pro vybranou restrikční endonukleázu. Restrikční enzymy byly vybrány tak, aby neštěpily PCR konstrukt (otestováno pomocí nástroje NEBcutter V2.0, dostupný z http://nc2.neb.com/NEBcutter2/) a jejich rozpoznávací sekvence byla přítomna v použitých plazmidových vektorech. 5' konec vnitřních primerů nesl navzájem se překrývající sekvence nezbytné pro „overlapping“ PCR.

Pro kontrolu úspěšnosti homologní rekombinace byly navrženy dva páry primerů. Tyto páry byly navrženy tak, aby v případě úspěšné rekombinace PCR s jednou dvojicí primerů neproběhla a s druhou dala vzniknout fragmentu příslušné velikosti.

Dále byly navrženy primery pro syntézu genu *huB*. Tyto primery přesně ohraničují sekvenci genu. 5'-konec primerů byl upraven přidáním nekódující sekvence a rozpoznávacího místa pro vybranou restrikční endonukleázu.

Seznam navržených primerů je uveden v tabulce 7. Pro každý oligonukleotid je uveden jeho název, sekvence, teplota tání, orientace, účel použití a případné umístění navrženého restrikčního místa.

Tabulka 7: Navržené primery pro PCR amplifikace

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Tm (°C)	Restrikční místo	Orientace	Účel použití
FTS_0886_A	GCATGTCTCGAGTGAGTATGTGC GTATGGCTTT	60	*Xho*I	Forward	Amplifikace delečního konstruktu
FTS_0886_B	ACTTTTTATTATTTTTCACTCTT GTTCATGTTTTTAAA	60, ocásek 30	-	Reverse	
FTS_0886_C	ACAAGAGTGAAAAATAATAAAA AGTTACAAAAAAGTAA	60, ocásek 30	-	Forward	
FTS_0886_D	GCATGTGAGCTCTCTTATCTATC TTCTTTCCGCT	60	*Sac*I	Reverse	
FTS_0886_1F	TGGGGTAAGAGGGCAAAAGT	60	-	Forward	Kontrola úspěšnosti homologní rekombinace
FTS_0886_2R	CTACTAGAGTTACGCTATCAC	60	-	Reverse	
FTS_0886_F1	AATGACAGGTGAGGTGACAC	60	-	Forward	
FTS_0886_R1	CTCAAGTTTATCCATTCCACC	60	-	Reverse	
FTS_0886_R2	GCTACTTACAGGGGTTATTTC	60	-	Reverse	Sekvenace
pKK_0886_F	AAACATATGAACAAGAGTGAATT AGTAAG	60	*Nde*I	Forward	Syntéza genu *huB*
pKK_0886_R	AACGAGCTCTTATTTTACAGCGT CTTTAAGAC	60	*Sac*I	Reverse	

Restrikční místo primeru je podtrženo. Šedým podbarvením jsou zvýrazněny překrývající se sekvence.

Primer ozn. R1 byl použit také jako sekvenační primer.

3.10 Deleční mutageneze

3.10.1 Amplifikace delečního konstruktu

Deleční konstrukt byl syntetizován pomocí PCR podle chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200. V prvním kroku byly provedeny dvě samostatné PCR, jedna s primery FTS_0886_A a FTS_0886_B, druhá s kombinací primerů FTS_0886_C a FTS_0886_D .

Pro amplifikaci byla použita *Pfu* polymeráza, která se vyznačuje kromě polymerázové aktivity také 5’ → 3’ exonukleázovou aktivitou. Tato opravná (proofreadingová) aktivita umožňuje opravit chybně zařazené nukleotidy a tím efektivně eliminovat chyby při čtení a replikaci templátu.

Složení reakční směsi a podmínky pro amplifikaci jsou uvedeny v Tab. 8 a 9.

Tabulka 8: Složení PCR směsi za použití *Pfu* polymerázy

Komponenta	Objem (µl)
10 x *PfuUltra* II reakční pufr	2,5
10 mM dNTP	0,5
10 µm forward primer (= primer A, nebo C)	0,625
10 µm reverse primer (= primer B, nebo D)	0,625
Templátová DNA (100 ng)	0,5
PfuUltra II Fusion HS DNA polymeráza	0,5
Voda	19,75
Celkový objem	**25**

Tabulka 9: Nastavení podmínek PCR za použití *Pfu* polymerázy

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	2 minuty	1
2	95 °C	20 s	40
3	50 °C	20 s	
4	72 °C	15 s/ kb (30 s)	
5	72 °C	3 minuty	1
6	4 °C		

PCR produkty byly přečištěny na 1 % GTG agarózovém gelu a z gelu vyizolovány. Množství produktu v eluátu bylo ověřeno elektroforetickou separací v 1 % agarózovém gelu.

V druhém kroku byly připravené produkty z obou PCR použity jako templát pro následnou „overlapping" PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D. Během této reakce byl pomocí překryvných sekvencí na 3' konci fragmentu „A-B" a 5' konci fragmentu „C-D" amplifikován konstrukt „A-D", který je složen z úseků komplementárních k sekvencím před a za deletovanou oblastí. Pro amplifikaci byla použita *Pfu* polymeráza. Templátové DNA, tj. fragmentu „A-B" a „C-D", bylo do reakce přidáno shodné množství, a to v celkovém objemu nejvýše 2 µl.

Produkt PCR byl přečištěn na 1 % GTG agarózovém gelu a z gelu vyizolován. Koncentrace a čistota vyizolovaného PCR produktu byla stanovena spektrofotometricky.

Přečištěný „A-D" produkt byl použit pro klonování do TOPO-TA klonovacího systému pro sekvenování.

3.10.2 Klonování delečního konstruktu za využití TOPO-TA Cloning Kit

Komerční souprava TOPO-TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) poskytuje velmi účinnou jednokrokovou taktiku klonování pro přímé vložení PCR produktu do plazmidového vektoru pro sekvenování. Plazmidový vektor pCR4-TOPO, který je součástí kitu, je dodáván jako linearizovaný s jednoduchými 3' deoxythymidinovými (T) přesahy. Pomocí *Taq* polymerázy jsou k PCR produktu přidány jednoduché 3' deoxyadenosinové (A) přesahy, čímž je umožněno přímé vložení PCR produktu do vektoru bez potřeby ligázy nebo PCR primerů obsahujících specifické sekvence.

Přidání 3'- A přesahů k PCR produktu

Komponenty reakční směsi (Tab. 10) byly smíchány a reakční směs následně inkubována 10-15 minut při 68 °C v termobloku. Poté byla směs ihned použitelná pro TOPO klonování.

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro přidání 3'-A přesahů

Komponenta	Objem (µl)
PCR produkt	10,9
10 x Standard *Taq* Reaction Buffer	1,25
10 mM dATP	0,25
Taq DNA polymeráza	0,1
Celkový objem	**12,5**

TOPO TA klonování a transformace do chemokompetentních buněk

Pro TOPO TA klonování byla smíchána následující reakční směs (Tab. 11):

Tabulka 11: Reakční směs pro TOPO TA klonování

Komponenta	Objem (µl)
PCR produkt s 3'- A přesahem	4
Salt solution	1
TOPO vektor	1
Celkový objem	**6**

Reakční směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě a přesunuta na led. Poté byla provedena transformace do chemokompetentních buněk *E. coli* XL1. Po rozmražení 100 µl chemokompetentních buněk na ledu k nim bylo přidáno 6 µl reakční směsi. Směs byla lehce promíchána a inkubována na ledu po dobu 30 minut. Poté byl proveden teplotní šok 30 sekund při 42 °C a zkumavky byly ihned přesunuty na led. K buňkám bylo přidáno 400 µl SOC média předehřátého na laboratorní teplotu a buňky byly kultivovány při 37 °C za stálého třepání 200 rpm jednu hodinu. Buněčná suspenze byla vyseta na selektivní LB plotny a kultivována při 37 °C přes noc.

3.10.3 Příprava chemokompetentních buněk E. coli XL1

Bakteriální buňky byly zaočkovány do 50 ml SOB média a kultivovány do $0D_{600}$ = 0,6. Narostlá kultura byla inkubována 10 minut na ledu a poté centrifugována 10 minut při 2500 g a 4 °C. Usazené buňky byly resuspendovány ve 20 ml studeného TB pufru, inkubovány 10 minut na ledu a centrifugovány opět 10 minut, 2500 g a 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována ve 4 ml studeného TB pufru a opatrně bylo přidáno DMSO do konečné koncentrace 7 %. Po 10 minutové inkubaci na ledu byly buňky rozděleny po 200 µl do vychlazených zkumavek a uchovávány při -80 °C.

Transformační účinnost připravených kompetentních buněk byla ověřena transformací kontrolního plazmidu pUC19 do daného objemu kompetentních buněk. Odvozena byla podle vzorce:

$$\text{Transformační účinnost} = \frac{\text{počet kolonií}}{10\ \text{pg pUC19 DNA}} \times \frac{10^6\ \text{pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\text{celkový objem µl}}{\text{vysetý objem µl}} \times \text{faktor ředění}$$

3.10.4 Ověření ligačního a transformačního kroku

Ověření klonů nesoucích inzertní DNA bylo v prvním kroku provedeno pomocí PCR na koloniích. Templátová DNA byla z jednotlivých narostlých kolonií připravena odebráním části kolonie z plotny sterilním párátkem a resuspendováním v 10 µl vody. Zároveň byly kolonie tímto párátkem přeočkovány na čerstvou LB plotnu s příslušným antibiotikem a kultivovány při 37 °C.

Pro amplifikaci byl použit Quick-Load *Taq* 2X Master Mix, což je roztok obsahující *Taq* DNA polymerázu, dNTP, $MgCl_2$, KCl a nanášecí pufr. Tento master mix je používán k urychlení práce při rutinních PCR. Dále byly použity primery specifické pro zaklonovaný fragment, které nasedají na jeho počáteční a koncovou oblast.

Složení reakční směsi a podmínky pro amplifikaci jsou uvedeny v Tab. 12 a 13.

Tabulka 12: Složení PCR směsi za použití Quick-Load *Taq* 2X Master Mix

Komponenta	Objem (µl)
10 µm forward primer (primer A)	0,5
10 µm reverse primer (primer D)	0,5
Templátová DNA	1
Quick-Load *Taq* 2X Master Mix	12,5
Voda	10,5
Celkový objem	**25**

Tabulka 13: Nastavení podmínek PCR za použití Quick-Load *Taq* 2X Master Mix

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
1	95 °C	30 s	1
2	95 °C	30 s	25
3	50 °C	30 s	
4	68 °C	1 minuta/kb (2 minuty 30 s)	
5	68	5 minut	1
6	4 °C		

PCR byla vyhodnocena elektroforeticky. Pozitivní kolonie byly zaočkovány do 10 ml LB média s příslušným antibiotikem a kultivovány při 37 °C za stálého třepání 200 rpm přes noc. Z narostlé bakteriální kultury byla vytvořena glycerolová konzerva (500 µl sterilně odebrané kultury smícháno s 500 µl 60 % glycerolu, uloženo na -80 °C) a zbylý objem byl centrifugován 3 minuty při 13 000 rpm. Z bakteriálního peletu byla vyizolována plazmidová DNA pomocí komerční soupravy a poté spektrofotometricky stanovena její koncentrace.

Pro znovuověření pozitivních kolonií byla izolovaná plazmidová DNA podrobena restrikčnímu štěpení s kombinací restriktáz *Xho*I a *Sac*I. Úspěšnost štěpení byla potvrzena elektroforetickou separací.

Konečným krokem pro ověření bezchybnosti sekvence zaklonovaného inzertu je jeho osekvenování. Sekvenace byla provedena na Mikrobiologickém ústavu AV

ČR na pracovišti Střediska sekvenování DNA. K osekvenování DNA byly použity univerzální primery M13 a T7 (Tab. 14), které jsou specifické k sekvencím klonovacího vektoru a s ohledem na délku sekvenovaného fragmentu také primery FTS_0886_R1 a FTS_0886_R2 specifické k inzertní DNA. Tento krok byl nezbytný, protože v sekvenci PCR produktu mohou být vlivem nepřesnosti PCR zaměněné nukleotidy.

Výsledek sekvenace byl vyhodnocen pomocí aplikace SeqMan Pro, která je součástí softwaru Lasergene (DNASTAR).

Tabulka 14: Sekvence univerzálních sekvenačních primerů

Primer	Sekvence primeru (5'-3')
M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

3.10.5 Ligace delečního konstruktu a vektoru pDM4

Deleční konstrukt byl vyštěpen z vektoru pCR4-TOPO pomocí restrikčních enzymů *Xho*I a *Sac*I. Kompatibilní konce plazmidového vektoru byly vytvořeny linearizací plazmidu pDM4 stejnými restrikčními enzymy. Produkty štěpení byly přečištěny na 1 % GTG agarózovém gelu a z gelu vyizolovány. Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky.

K integraci inzertu do vektoru, tj. ligaci byl použit enzym Quick T4 DNA Ligase. Ligační reakce byla provedena v poměru molarity volných konců inzertu : vektoru = 4 : 1. Vstupní množství vektoru do reakce bylo 50 ng. Potřebné množství inzertu se odvíjí od jeho velikosti a bylo vypočítáno s využitím online aplikace Ligation calculator (dostupné z http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). Složení ligační směsi je uvedeno v tabulce 15. Ligace za použití této ligázy probíhá 5 minut při 25 °C.

Tabulka 15: Složení ligační směsi

Komponenta	Objem (µl)
Inzert (83,33 ng)	Variabilní *
Vektor (50 ng)	Variabilní *
Quick T4 DNA Ligase	0,5
2x Quick Ligation Reaction Buffer	5
Voda	Doplněk do 10 µl
Celkový objem	**10**

* v závislosti na koncentraci roztoku DNA

3.10.6 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk E. coli

Transformace do *E. coli* NEB Turbo

Ligační směs byla transformována metodou tepelného šoku do chemokompetentních buněk *E. coli* NEB Turbo. Tyto komerčně dostupné speciálně upravené bakteriální buňky jsou typické vysokou transformační účinností a rychlým růstem kolonií.

Princip transformačního postupu je uveden v bodě 3.10.2. K 50 µl chemokompetentních buněk bylo přidáno 5 µl ligační směsi. Transformační protokol se lišil pouze v množství SOC média přidaného po teplotním šoku, a to 950 µl.

Ověření klonů nesoucích inzertní DNA bylo provedeno způsobem popsaným v kapitole 3.10.4, ale bez posledního kroku, tj. bez sekvenování.

Transformace do *E. coli* S17-1λpir

Plazmidový vektor pDM4 s ověřenou přítomností delečního fragmentu byl poté transformován do kompetentních buněk *E. coli* S17-1λpir. Transformace byla provedena opět metodou tepelného šoku.

Transformační postup (kapitola 3.10.2) se lišil v:

- K 50 µl chemokompetentních buněk *E. coli* S17-1λpir bylo po rozmražení přidáno 75 µl 0,1 M $CaCl_2$ a DNA v množství 50 ng.
- Teplotní šok byl proveden při 42 °C po dobu 90 sekund.
- Po teplotním šoku bylo k buňkám přidáno 900 µl SOC média.

Ověření klonů nesoucích inzertní DNA bylo provedeno způsobem popsaným v kapitole 3.10.4, ale bez posledního kroku, tj. bez sekvenování.

3.10.7 Příprava chemokompetentních buněk E. coli S17-1λpir

Bakteriální kultura byla kultivována v LB médiu při 37 °C do druhého dne. Z narostlé kultury bylo odebráno 400 µl, zaočkováno do 400 ml LB média a kultivováno do OD_{600} = 0,4-0,6. Narostlá kultura byla přemístěna na led, rozdělena do 50 ml vychlazených zkumavek a inkubována na ledu 15-30 minut. Poté byla kultura centrifugována 15 minut při 3500 rpm a 4 °C. Od usazených buněk bylo důkladně odstraněno médium, peleta byla resuspendována v cca 100 ml vychlazeného 0,1 M $MgCl_2$ a suspenze byla centrifugována 15 minut při 3500 rpm a 4 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v cca 100 ml vychlazeného 0,1 M $CaCl_2$, suspenze byla inkubována na ledu po dobu 20 minut a centrifugována 15 minut při 3500 rpm a 4 °C. K usazeným buňkám byly přidány 4 ml vychlazeného 0,1 M $CaCl_2$ s 14 % glycerolem. Buňky byly důkladně resuspendovány, rozděleny po 50 µl do vychlazených zkumavek a uchovávány při -80°C. Ověření transformační účinnosti viz kapitola 3.10.3.

3.10.8 Konjugace

Bakteriální kmen *E. coli* S17-1λpir byl použit jako donorový kmen pro konjugativní přenos plazmidové DNA nesoucí deleční konstrukt do recipientní *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200.

Příprava buněčných kultur (1. den)

E. coli S17-1λpir nesoucí plazmid pDM4 s delečním konstruktem byla zaočkována do 10 ml LB média s chloramfenikolem. Kultivace probíhala při 37 °C a za stálého třepání 200 rpm přes noc.

F. tularensis FSC200 byla přepasážována z McLeod plotny s vysetou zásobní kulturou na čerstvou McLeod plotnu a kultivována při 37 °C přes noc.

Příprava buněčných kultur (2. den)

Narostlá kultura *E. coli* byla přeočkována do 10 ml čerstvého LB média s chloramfenikolem na OD_{600} = 0,1. Kultivace probíhala při 37 °C a pomalém třepání 80 rpm do OD_{600} = 0,5- 0,6. Poté bylo z kultury odebráno 500 µl a centrifugováno 5 minut při 6000 rpm. Supernatant byl odstraněn.

Z narostlé kultury *F. tularensis* byla připravena suspenze v PBS o $OD_{600} \approx 1$. Ze suspenze bylo odebráno 500 µl a centrifugováno 2 minuty při 13000 rpm. Supernatant byl odstraněn.

K peletám *E. coli* a *F. tularensis* bylo přidáno 25 µl roztoku PBS+10mM $MgSO_4$. Peleta *F. tularensis* byla v tomto roztoku resuspendována, přenesena k peletě *E. coli* a buňky *E. coli* byly pouze jemně resuspendovány. 50 µl této buněčné směsi bylo kápnuto (neroztíráno) na LB plotnu bez antibiotika a ponecháno kultivovat přes noc při laboratorní teplotě.

Po konjugativním přenosu do *F. tularensis* se plazmid pDM4 není schopen replikovat a dochází k jeho začlenění do chromozomální DNA pomocí homologní rekombinace. První rekombinace nastává při konjugaci 2. den, k druhé rekombinaci dochází při růstu v prostředí sacharózy.

Kultivace transformantů (3. den)

Kultura narostlá na LB plotně byla resuspendována ve 150 µl roztoku PBS+10mM $MgSO_4$. Buněčná suspenze byla vyseta po 75 µl na dvě McLeod plotny obsahující antibiotika polymyxin B a chloramfenikol. Bakterie byly kultivovány při 37 °C po dobu 5-7 dní.

Polymyxin B je antibiotikum, k jehož účinkům je *F. tularensis* rezistentní a *E. coli* citlivá. Přidání tohoto antibiotika do kultivační půdy zabrání nežádoucímu růstu *E. coli*.

Chloramfenikol je použit jako selekční marker kódovaný genem, který je součástí použitého plazmidu pDM4. Kultivace na plotnách s přídavkem tohoto antibiotika tedy umožňuje selektivní růst *F. tularensis*, u kterých byl uskutečněn konjugativní přenos plazmidové DNA.

Ověření inkorporace plazmidu do *F. tularensis*

Kolonie narostlé na McLeod plotně s polymyxinem B a chloramfenikolem byly přeočkovány na čerstvou McLeod plotnu s chloramfenikolem (bez polymyxinu B) a kultivovány při 37 °C přes noc.

3.10.9 Sacharózová selekce

Kolonie *F. tularensis* narostlé na McLeod plotně s chloramfenikolem byly resuspendovány ve 2 ml PBS.

Pro každý testovaný klon byla připravena ředící řada tzv. desetinným ředěním. Původní suspenze byla postupně ředěna 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} a 10^{-4}. Nejprve bylo 50 µl původní suspenze přeneseno do zkumavky s 9-násobným objemem PBS (450 µl) a vortexováno. Z této zkumavky bylo odebráno 50 µl a přeneseno do další zkumavky s 9-násobným objemem PBS a vortexováno. Tento postup byl opakován až do ředění 10^{-4}. V závislosti na množství narostlé bakteriální kultury bylo poté ze zkumavek s ředěním 10^{-3} a 10^{-4}, nebo 10^{-2} a 10^{-3} vyseto po 100 µl na McLeod plotny s 5 % sacharózou. Kultivace probíhala při 37 °C po dobu 2 dní.

Selektivní růst v prostředí 5 % sacharózy je umožněn díky *sacB* genu, který je součástí plazmidu pDM4. *SacB* gen kóduje levansacharázu. Tento enzym katalyzuje hydrolýzu sacharózy přítomné v růstovém médiu za vzniku toxických levanů (Pelicic et al., 1996). Pro *F. tularensis* je exprese *sacB* genu v přítomnosti sacharózy smrtelná, proto se snaží plazmidovou DNA odstranit.

Jednotlivé kolonie narostlé na McLeod plotně se sacharózou byly sterilním párátkem přeočkovány na McLeod plotnu s chloramfenikolem a zároveň stejným párátkem na McLeod plotnu bez antibiotika (tzv. replica plating). Kultivace probíhala při 37 °C přes noc.

Kolonie *F. tularensis* bez plazmidové DNA nejsou schopné růst na plotně s chloramfenikolem. Pro další práci byly tedy použity pouze kolonie, které narostly na plotně bez antibiotika, ale nenarostly na plotně s antibiotikem.

3.10.10 Potvrzení rekombinantů

Při odstranění plazmidové DNA z chromozomální DNA může být vyštěpena původní plazmidová DNA včetně delečního konstruktu, nebo může být vyštěpena plazmidová DNA s genem zájmu. Přítomnost genetické modifikace lze potvrdit na základě PCR.

Templátová DNA byla z kolonií, jež narostly na McLeod plotně bez ATB, ale nenarostly na plotně s ATB, připravena odebráním části narostlé kolonie sterilním párátkem a resuspendováním v 10 µl vody. Poté byly vzorky vystaveny po dobu 10 minut teplotě 95 °C a krátce centrifugovány.

Pro potvrzení úspěšnosti homologní rekombinace byly s každým testovaným klonem provedeny dvě PCR, jedna s kombinací primerů FTS_0886_1F a FTS_0886_2R (při úspěšné rekombinaci produkt nevznikne), druhá s primery FTS_0886_F1 a FTS_0886_R1 (vznik produktu určité délky). Pro amplifikaci byl použit Quick-Load *Taq* 2X Master Mix (složení reakčních směsí a nastavení podmínek PCR viz kapitola 3.10.4). Výsledek PCR byl vyhodnocen elektroforeticky.

3.10.11 Příprava bakteriálních konzerv F. tularensis

Bakteriální konzervy byly připraveny z delečního kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* a v další části práce z *trans* komplementovaného kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB*.

F. tularensis byla přeočkována na čerstvou McLeod plotnu (pro *trans* komplementovaný kmen s kanamycinem) a kultivována při 37 °C přes noc.

Z narostlé bakteriální kultury *F. tularensis* byla připravena suspenze v 10 ml fyziologického roztoku a změřeno OD_{600}. Suspenze byla centrifugována 15 minut při 6700 rpm, 4 °C a supernatant byl odstraněn. Usazené buňky byly promyty v 10 ml fyziologického roztoku (centrifugace 15 minut, 6700 rpm, 4 °C). Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v zamražovacím roztoku (objem zvolen v závislosti na OD_{600} kultury tak, aby OD_{600} bakteriálních konzerv nebylo více než 2) a směs byla rozdělena do kryotub. Bakteriální konzervy byly uchovávány při -150 °C.

3.10.12 Příprava elektrokompetentních buněk F. tularensis FSC200/ΔhuB

F. tularensis FSC200/Δ*huB* byla vyseta ze zásobní konzervy na dvě McLeod plotny bez antibiotika a kultivována 24-48 hodin (podle nárůstu bakterií) při teplotě 37 °C. Z ploten byla bakteriální kultura přeočkována do 10 ml předehřátého Chamberlainova média a kultivována při 37 °C do druhého dne. Narostlá kultura byla centrifugována 15 minut při 6500 rpm a 24 °C. Po odstranění superantantu byla peleta resuspendována v předehřátém Chamberlainově médiu, buněčná suspenze byla zaočkována do 50 ml předehřátého Chamberlainova média na $OD_{600} \approx 0{,}1$ a kultivována do $OD_{600} = 0{,}3\text{-}0{,}6$.

Narostlá kultura byla centrifugována 15 minut ve vychlazené centrifuze při 7300 rpm. Od usazených buněk bylo důkladně odstraněno médium a buňky byly dvakrát promyty vychlazenou 0,5 M sacharózou při 7300 rpm. K usazeným promytým buňkám byl přidán 1 ml vychlazené 0,5 M sacharózy. Buňky byly důkladně resuspendovány, rozděleny po 200 µl do vychlazených zkumavek a uchovávány při -80 °C.

3.11 Komplementace in trans delečního mutanta F. tularensis subsp. holarctica kmen FSC200/ΔhuB

3.11.1 Syntéza genu huB

Gen *huB* byl syntetizován metodou PCR podle chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200.

Amplifikace byla provedena pomocí *Pfu* polymerázy s kombinací primerů pKK_0886_F a pKK_0886_R. Složení reakční směsi a podmínky pro amplifikaci jsou uvedeny v kapitole 3.10.1. Odlišností od výše uvedeného je jiná teplota pro nasedání primerů, a to 53 °C.

Produkt PCR byl přečištěn na 1 % GTG agarózovém gelu, z gelu vyizolován a spektrofotometricky byla stanovena jeho koncentrace a čistota. Přečištěný produkt byl použit pro klonování do TOPO-TA klonovacího systému pro sekvenování.

3.11.2 Klonování PCR produktu za využití TOPO-TA Cloning Kit a selekce pozitivních transformantů

Při klonování PCR produktu do pCR4-TOPO vektoru bylo postupováno shodně podle postupu v bodě 3.10.2.

Ověření klonů nesoucích inzertní DNA bylo provedeno podle metodiky popsané v kapitole 3.10.4. Odlišnosti od výše uvedeného:

- PCR na koloniích byla provedena s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R.
- Při nastavení podmínek PCR byla teplota pro nasedání primerů upravena na 53 °C.
- U izolované plazmidové DNA byla specificita ověřena pomocí restrikčního štěpení kombinací restriktáz *Nde*I a *Sac*I. Do restrikční reakce o objemu 10 µl bylo přidáno 7 µl DNA.
- K osekvenování inzertu byly použity univerzální primery M13 reverse a T7.

3.11.3 Ligace genu huB a fragmentu vektoru pKK289Km, transformace do kompetentních buněk E. coli

Sekvence genu *huB* byla vyštěpena z vektoru pCR4-TOPO pomocí restrikčních enzymů *Nde*I a *Sac*I. Kompatibilní konce plazmidového vektoru byly vytvořeny linearizací plazmidu pKK289KmGFP stejnými restrikčními enzymy, čímž došlo k vyštěpení genu pro GFP. Produkty štěpení byly přečištěny na 1 % GTG agarózovém gelu a fragmenty velikostně odpovídající sekvenci genu a linearizovanému plazmidu byly z gelu vyizolovány. Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky.

Ligace (viz kapitola 3.10.5) byla provedena v poměru molarity volných konců inzertu : vektoru = 3 : 1. Vstupní množství vektoru do reakce bylo 36 ng, množství inzertu 6,3 ng.

Ligační směs byla transformována metodou tepelného šoku do chemokompetentních buněk *E. coli* XL1 (viz kapitola 3.10.2). Ke 100 µl chemokompetentních buněk bylo přidáno 5 µl ligační směsi.

Ověření klonů nesoucích inzertní DNA bylo provedeno podle metodiky popsané v kapitole 3.10.4 s modifikacemi uvedenými v kapitole 3.11.2, ale bez posledního kroku, tj. bez sekvenování. Plazmidová DNA izolovaná z *E. coli* byla štěpena restrikčními enzymy *Nde*I, *Sac*I a dále enzymem *Hind*III.

3.11.4 Elektroporace plazmidu pKK289Km-huB do delečního kmene F. tularensis FSC200/ΔhuB

Elektrokompetentní buňky *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* byly rozmraženy na ledu a rozděleny do čtyř zkumavek po 100 µl. K buňkám byl přidán 1 µl, 2 µl a 3 µl plazmidové DNA a 0,8 µl prázdného plazmidu (pro kontrolu účinnosti transformace buněk). Směsi byly lehce promíchány, inkubovány 10 minut na ledu a přeneseny do 2 mm elektroporačních kyvet. Elektroporace probíhala za podmínek: 2,5 kV, 600 Ω, 25 µF. Poté bylo k buňkám ihned přidáno po 1 ml předehřátého Chamberlainova média, promícháno a přeneseno do 15 ml zkumavek. Buňky byly kultivovány 4 hodiny za stálého třepání při 37 °C. Poté byly kultury centrifugovány 3 minuty při 6000 rpm a RT, bylo odstraněno cca 700 µl supernatantu a ve zbylém byly pelety resuspendovány. Buněčné suspenze byly vysety na McLeod půdy s kanamycinem a kultivovány 5 dní při 37 °C.

Při ověřování klonů nesoucích inzertní DNA bylo v principu postupováno podle metodiky v kapitole 3.10.4. Templátová DNA do PCR kolonií byla připravena odebráním části narostlé kolonie sterilním párátkem a resuspendováním v 10 µl vody. Poté byly vzorky vystaveny po dobu 10 minut teplotě 95 °C a krátce centrifugovány. PCR byla provedena s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R. Pro znovuověření pozitivních kolonií byla plazmidová DNA izolovaná z *F. tularensis* štěpena restrikčními enzymy *Nde*I, *Sac*I a enzymem *Hind*III. Příprava bakteriálních konzerv je uvedena v kapitole 3.10.11.

3.12 Testování delečního a trans komplementovaného kmene v systémech in vitro a in vivo

K experimentům byly použity samice myší kmene BALB/c stáří 8-10 týdnů z chovu Velaz, s.r.o. Tento kmen patří mezi nejpoužívanější kmeny imbredních myší a je vhodný především pro imunologické studie.

3.12.1 Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů (BMMs)

BMMs jsou primární makrofágové buňky odvozené z kostně- dřeňových buněk *in vitro* v přítomnosti růstových faktorů. Růstový faktor stimulující kolonie makrofágů (M-CSF) je liniově specifický růstový faktor, který je zodpovědný za

proliferaci a diferenciaci myeloidních progenitorů do buněk makrofág/monocytové řady. M-CSF, v jehož přítomnosti byly kostně- dřeňové buňky kultivovány, je vylučován buněčnou linií L929 a je používán ve formě L929-kondiciovaného média. Za těchto podmínek kostně- dřeňové myeloidní progenitory proliferují a diferencují se do homogenní populace zralých BMMs (Weischenfeldt et Porse, 2008).

Izolace kostně- dřeňových buněk

Myši byly uspané v diethyléteru, připevněny k pracovní podložce a usmrceny střihem do krčních tepen. Břicho a zadní končetiny myší byly ostříknuty 70 % etanolem. V oblasti břicha byla nastřižena kůže a střih kůží byl veden směrem k zadním končetinám, ze kterých byla kůže odpreparována. V oblasti pánve byly končetiny opatrně odstřihnuty od těla tak, aby zůstala zachována celá stehenní kost včetně kloubní hlavice. Dále byla z končetin odstřižena „tlapka" s důrazem na zachování celé holenní kosti včetně kloubu. Vypreparované končetiny byly uchovávány v DMEM médiu. Další práce byly prováděny pouze v prostoru laminárního boxu.

Vypreparované končetiny byly vydezinfikovány ponořením na 1-3 minuty do 70 % etanolu (použit 6-jamkový panel- 1. jamka v panelu). Etanol byl opláchnut přemístěním končetin do DMEM média (2.- 5. jamka v panelu). Poté od sebe byly odděleny kosti stehenní a holenní, obě části končetin byly očištěny od svalové tkáně a byla odstřižena kost lýtková. Čisté kosti stehenní a holenní byly přemístěny do DMEM média v poslední jamce panelu.

Kostní dřeň byla získána odstřižením obou konců kostí těsně pod klouby a propláchnutím injekční jehlou (jehla 25- 28 G) z obou stran přibližně 2 ml média do 50 ml zkumavky. Buněčná suspenze byla propipetována, pro usazení větších kusů tkáně a dřeně se nechala cca 1 minutu stát a následně byla suspenze přenesena do nové 50 ml zkumavky a centrifugována 5 minut při 400 g a RT. Poté byl supernatant odstraněn a usazené buňky byly rozředěny v 10 ml BMMs média s přidanými antibiotiky.

Pomocí Bürkerovi komůrky byl spočítán počet buněk v 1 ml buněčné suspenze. 50 µl buněčné suspenze bylo důkladně promícháno s 50 µl barviva (0,5 % trypanová modř v PBS) a směs se přenesla do prostoru mezi podložním a krycím sklíčkem Bürkerovi komůrky. Pod mikroskopem byl stanoven počet buněk ve 25 čtverečcích a přepočten na počet buněk v 1 ml buněčné suspenze.

Kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů

Do bakteriálních Petriho misek o průměru 90 cm bylo napipetováno 15 ml–x ml BMMs média a přidány buňky (x ml) o množství $6x10^6$. Kultivace probíhala při 37 °C a 5 % CO_2. Po 4 dnech byla vyměněna polovina kultivačního média, kdy bylo odebráno 7,5 ml média a přidáno 7,5 ml čerstvého média se sérem. Makrofágy byly diferencované po týdenní kultivaci.

3.12.2 Proliferace F. tularensis v primárních kostně-dřeňových makrofázích (BMMs)

Primární kostně-dřeňové makrofágy byly infikovány delečním kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB, trans* komplementovaným kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* a divokým kmenem *F. tularensis* FSC200, který byl použit jako pozitivní kontrola.

Příprava bakteriálních kultur (1. den)

Bakteriální kultury byly připraveny masivním naočkováním na jednu McLeod plotnu od každé bakterie a kultivací 16-24 hodin při 37 °C.

Příprava buněk

Makrofágy na Petriho miskách byly zkontrolovány pod mikroskopem. Od adherovaných buněk bylo odsáto médium a následně byly promyty 10 ml předehřátého PBS. K promytým buňkám bylo přidáno studené PBS o objemu 4 ml na plotnu a buňky byly pomocí škrabky důkladně seškrabány. Suspenze byla propipetována a přenesena z Petriho misek do 50 ml zkumavky. Plotny byly poté omyty dalšími 4 ml studeného PBS a tekutina byla opět přidána do zkumavky. Suspenze byla centrifugována 5 minut při 300 g a RT. Supernatant byl odstraněn a usazené buňky byly resuspendovány v 1 ml DMEM+10 % FBS a doplněny DMEM+10 % FBS na objem 10 ml.

Pomocí Bürkerovi komůrky byl poté spočítán počet buněk v 1 ml buněčné suspenze.

Buňky byly nasazeny na 24-jamkové panely v množství $5x10^5$ buněk na jamku. Celkem byly použity 4 panely (4 intervaly pro sledování proliferace) a na každém panelu 3 jamky pro každý kmen. Do jamek byl napipetován 1 ml–x ml DMEM+10 % FBS a doprostřed jamek přidány buňky (x ml) o množství $5x10^5$. Obsah jamek byl promíchán pohybem panelů do tvaru čtverce a buňky byly ponechány adherovat do druhého dne při 37 °C a 5% CO_2.

Příprava bakteriálních kultur (2. den)

Z narostlých kultur delečního, *trans* komplementovaného a divokého kmene *F. tularensis* byly připraveny suspenze v PBS o OD_{600} = 1. Z připravených suspenzí bylo odebráno po 1 ml a centrifugováno 7 minut při 7000 rpm a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a bakteriální pelety resuspendovány v 1 ml kultivačního média DMEM+10 % FBS.

Pro kontrolu byly bakteriální suspenze vysety v ředění 10^{-7} po 50 µl na McLeod plotny (*trans* komplementovaný kmen na $McLeod_{KAN}$ plotny)(duplikáty).

Proliferace *F. tularensis* v primárních kostně-dřeňových makrofázích (BMMs)

Schopnost *F. tularensis* proliferovat v makrofázích byla sledována ve čtyřech časových intervalech, a to 1, 6, 24 a 48 hodin.

Od buněk nasazených na 24-jamkových panelech bylo odsáto kultivační médium tak, aby v každé jamce zůstalo 250 µl. Do třech jamek každého panelu byla k buňkám přidána bakteriální suspenze *F. tularensis* FSC200/Δ*huB*, do dalších třech jamek bakteriální suspenze *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* a do posledních třech suspenze *F. tularensis* FSC200. Multiplicita infekce (MOI) byla stanovena na 50, tj. 50 bakterií na jednu eukaryotickou buňku. Panely byly centrifugovány 5 minut při 400 g, RT (čas = 0) a inkubovány 30 minut při 37 °C a 5 % CO_2 v DMEM médiu+10 % FBS. Poté byly jamky 3x promyty předehřátým PBS. Po promytí byl k buňkám přidán 1 ml DMEM média s přidaným 10 % FBS a gentamicinem (5 µg/ml) a buňky byly inkubovány 30 minut při 37 °C a 5 % CO_2. Gentamicin způsobil usmrcení extracelulárních bakterií, tj. těch, které nebyly pohlceny makrofágy. Po inkubaci byly buňky opět 3x promyty předehřátým PBS. K buňkám byl přidán 1 ml DMEM média+10 % FBS a byly inkubovány při 37 °C a 5 % CO_2. Délka inkubace buněk se lišila pro jednotlivé časové intervaly.

Pro následné stanovení počtu intracelulárních bakterií byly makrofágy po ukončení inkubace lyzovány. Nejprve bylo od buněk odstraněno kultivační médium a byly 3x promyty předehřátým PBS pro interval 1 a 6 hodin, resp. 1x pro interval 24 hodin a 0x pro interval 48 hodin. Poté byly buňky 5 minut lyzovány vychlazeným 0,1 % deoxycholátem sodným v objemu 100 µl na jamku. V průběhu lýze byla suspenze opakovaně protahována špičkou pipety. K suspenzím bylo přidáno 900 µl PBS a byly připraveny ředící řady (Tab. 16).

Naředěné buněčné suspenze byly vysety po 50 µl na McLeod plotny (*trans* komplementovaný kmen na $McLeod_{KAN}$ plotny) a kultivovány při 37 °C do viditelného nárůstu bakterií. Na každou jamku panelu byly pro výsev použity dvě McLeod plotny (duplikáty).

Tabulka 16: Ředění buněčných suspenzí delečního, *trans* komplementovaného a divokého kmene *F. tularensis* pro odečet CFU

Čas odběru CFU	**Ředění *F. tularensis* FSC200**	**Ředění *F. tularesis* FSC200/Δ*huB***	**Ředění *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB***
1 hodina	10^{-4} a 10^{-5}	10^{-3} a 10^{-4}	10^{-4} a 10^{-5}
6 hodin	10^{-4} a 10^{-5}	10^{-3} a 10^{-4}	10^{-3} a 10^{-4}
24 hodin	10^{-6} a 10^{-7}	10^{-4} a 10^{-5}	10^{-5} a 10^{-6}
48 hodin	10^{-6} a 10^{-7}	10^{-5} a 10^{-6}	10^{-5} a 10^{-6}

3.12.3 Infekce myší typu BALB/c

Pokusné myši byly infikovány delečním kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB*, *trans* komplementovaným kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB*

a divokým kmenem *F. tularensis* FSC200. Dávka (Tab. 17) byla myším aplikována subkutánně do volné kůže v oblasti zadních končetin.

Tabulka 17: Aplikované dávky testovaných kmenů *F. tularensis*

Testovaný kmen *F. tularensis*	**Aplikovaná dávka o množství:**	**Počet infikovaných myší**
Deleční kmen	$3x10^2$ CFU/myš v 0,2 ml fyziologického roztoku	5 + 5
	$3x10^6$ CFU/myš v 0,2 ml fyziologického roztoku	5 + 5
Trans komplementovaný kmen	$3x10^2$ CFU/myš v 0,2 ml fyziologického roztoku	5
Divoký kmen (= pozitivní kontrola	$3x10^2$ CFU/myš v 0,2 ml fyziologického roztoku	5 + 5
— (= negativní kontrola)	0,2 ml fyziologického roztoku	6

Před infekcí myší byly připraveny bakteriální suspenze delečního, *trans* komplementovaného a divokého kmene *F. tularensis* v PBS o OD_{600} = 1. Tato hodnota OD odpovídá cca $3x10^9$ CFU/ml. Bakteriální suspenze byly poté naředěny do ředění 10^{-5}.

Suspenze $3x10^2$ CFU v 0,2 ml fyziologického roztoku byly připraveny odebráním 0,2 ml bakteriální suspenze z ředění 10^{-5} a smícháním s 3,8 ml fyziologického roztoku. Suspenze $3x10^6$ v 0,2 ml fyziologického roztoku byla připravena odebráním 0,2 ml suspenze z ředění 10^{-1} a smícháním s 3,8 ml fyziologického roztoku.

Skutečné množství bakterií (resp. CFU) v aplikovaných dávkách bylo určeno výsevem bakteriálních suspenzí na McLeod plotny (*trans* komplementovaný kmen na $McLeod_{KAN}$ plotny). Ze suspenzí $3x10^2$ CFU v 0,2 ml fyziologického roztoku bylo vyseto po 25 µl (duplikáty). Ze suspenze $3x10^6$ v 0,2 ml fyziologického roztoku byla připravena ředící řada do ředění 10^{-4}. Z ředění 10^{-4} bylo poté vyseto po 25 µl na dvě McLeod plotny.

Zdravotní stav a úhyn myší v jednotlivých skupinách byl sledován po dobu 21 dní.

3.12.4 Testování protektivního účinku

Přeživší myši byly 28. den po infekci otestovány na protekci vůči divokému kmeni *F. tularensis* FSC200. Při reinfekci byla myším aplikována dávka $3x10^2$ CFU/myš. Zdravotní stav a úhyn myší byl v jednotlivých skupinách opět sledován po dobu 21 dní.

3.12.5 Měření růstové křivky

Bakteriální kultury delečního kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB*, *trans* komplementovaného kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* a divokého kmene *F. tularensis* FSC200 byly připraveny přeočkováním z ploten s vysetými zásobními kulturami do 2,5 ml předehřátého Chamberlainova média na

OD ≈ 0,1 a kultivací při 37 °C za stálého třepání přes noc. Narostlé kultury byly naředěny čerstvým předehřátým Chamberlainovým médiem na OD = 0,1.

Růstová křivka byla měřena pomocí přístroje FluoStar Optima microplate reader. Vzorky byly nanášeny na 96 jamkovou mikrotitrační destičku s rovným dnem. Do jamek bylo pipetováno po 200 µl blanku nebo bakteriální suspenze. Zvolený objem byl experimentálně opakovanými měřeními zjištěn pracovníky Katedry molekulární patologie a biologie FVZ UO jako optimální pro růst *F. tularensis*. Od každého vzorku, tedy delečního, *trans* komplementovaného a divokého kmene *F. tularensis*, i blanku (Chamberlainovo médium) bylo pipetováno 5 replikátů. Jamky na destičce byly vybírány tak, aby krajní řady jamek zůstaly prázdné, protože v těchto místech dochází k největšímu odpařování. Prázdné jamky byly vyplněny 350 µl sterilní vody. Destička byla přikryta víčkem a ihned vložena do přístroje FluoStar Optima. Teplota v průběhu měření byla nastavena na 36,8 °C, celková doba měření na 24 hodin. Jeden cyklus trval 10 minut, z toho připadlo na měření přibližně 2 sekundy na jamku, poté 5 minut třepání a 3 minuty stání.

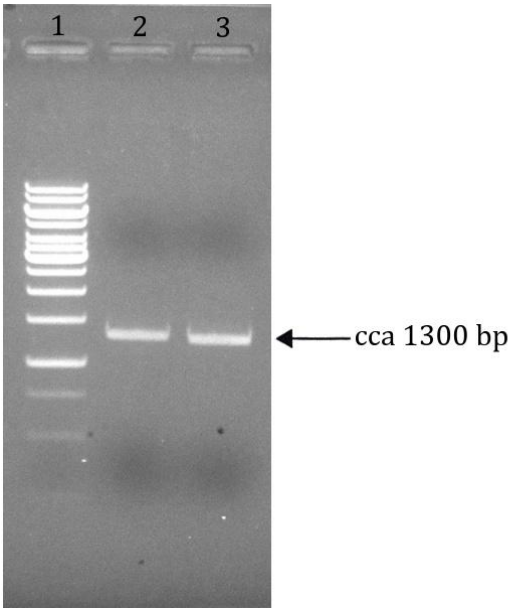
4 Výsledky

V této práci byl studován vliv potenciálního faktoru virulence HuB (histon-like protein B) na virulenci patogenní bakterie *Francisella tularensis*. Pro studium byl použit mírně virulentní kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Metodami cílené mutageneze jsme nejprve připravili kmen s deletovaným genem *huB*, kdy gen zájmu byl v chromozomální DNA *F. tularensis* nahrazen homologní rekombinací za deleční konstrukt. Vliv delece genu na virulenci bakterie byl poté testován v systémech *in vitro* a *in vivo*. V kontrastu s divokým kmenem byla porovnávána schopnost mutantního kmene proliferovat v primárních kostně-dřeňových makrofázích, *in vivo* pak byla sledována schopnost způsobit onemocnění a úhyn u testovaných myších jedinců. Abychom si potvrdili, že pozorované změny fenotypu jsou důsledkem delece genu *huB*, byl deleční kmen komplementován navrácením genu na vhodném plazmidovém vektoru a opět testován v *in vitro* a *in vivo* podmínkách.

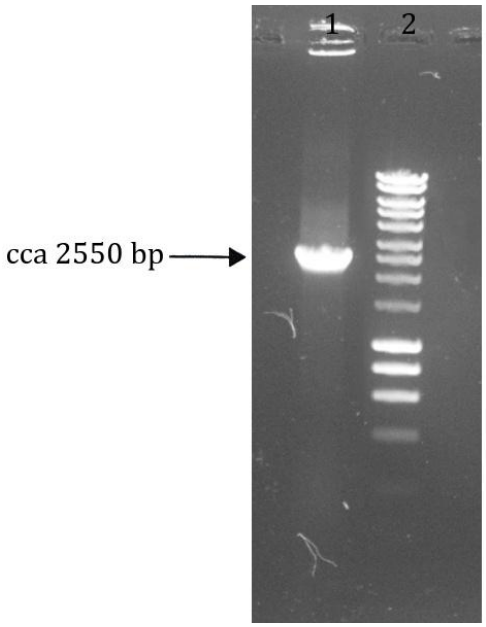
4.1 Příprava kmene F. tularensis s chromozomální delecí genu huB

4.1.1 Amplifikace delečního konstruktu

Konstrukt pro deleci genu *huB* byl syntetizován podle chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200 pomocí PCR. Primery použité pro amplifikaci byly navrženy tak, aby vnější primery (FTS_0886_A a FTS_0886_D) vkládaly na začátek a konec delečního konstruku restrikční místa pro enzymy *Xho*I a *Sac*I a vnitřní primery (FTS_0886_B a FTS_0886_C) nesly navzájem se překrývající sekvence nezbytné pro spojení úseků DNA amplifikovaných před a za genem *huB* v deleční konstrukt. Úspěšnost syntézy fragmentů „A-B“ a „C-D“ a následně amplifikace delečního konstruktu „A-D“ byla ověřena elektroforetickou separací v agarózovém gelu. Přibližná velikost fragmentů „A-B“ a „C-D“ je 1300 bp (Obr. 5). Deleční konstrukt má velikost cca 2550 bp (Obr. 6).



Obrázek 5: PCR produkty po elektroforetické separaci v 1 % GTG agarózovém gelu
1- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 2- fragment „A-B“, 3- fragment „C-D“



Obrázek 6: Produkt „overlapping“ PCR po elektroforetické separaci v 1 % GTG agarózovém gelu
1- fragment „A-D“, 2- HyperLadder I

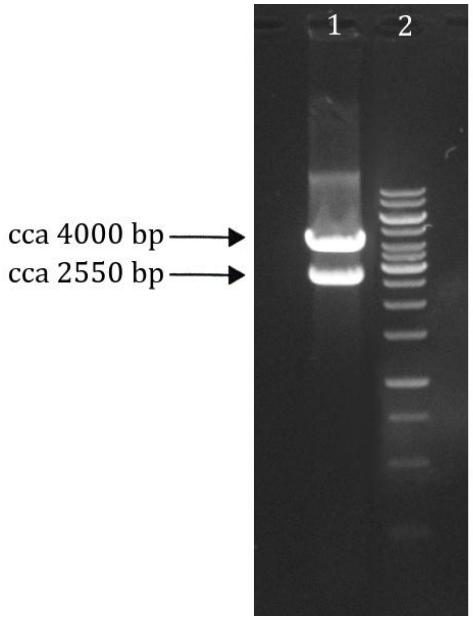
4.1.2 Příprava plazmidu pCR4-TOPO-ΔhuB

Bezchybnost sekvence delečního konstruktu bylo nutné ověřit osekvenováním. Za tímto účelem byl připravený konstrukt vložen do plazmidového vektoru pCR4-TOPO pro sekvenování.

Po ligaci inzertu a vektoru a následné transformaci do *E. coli* XL1 byla přítomnost delečního konstruktu v transformovaných bakteriích ověřena pomocí PCR na koloniích s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D (u pozitivních kolonií vzniká fragment délky cca 2550 bp) a restrikcí izolované plazmidové DNA enzymy

*Xho*I a *Sac*I (Obr. 7). Plazmidy z kolonií, u nichž PCR i restrikční štěpení proběhly v pořádku, byly poslány na sekvenaci.

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury (30 % glycerol).

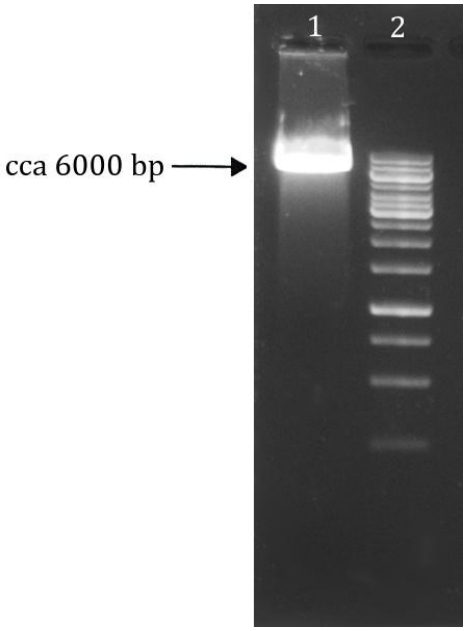


Obrázek 7: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pCR4-TOPO-Δ*huB* enzymy *Xho*I, *Sac*I
1- fragment 4000 bp odpovídá vektoru pCR4-TOPO, kratší fragment delečnímu konstruktu, 2- GeneRuler^{Tm} 1 kb DNA Ladder

4.1.3 Příprava plazmidu pDM4-ΔhuB

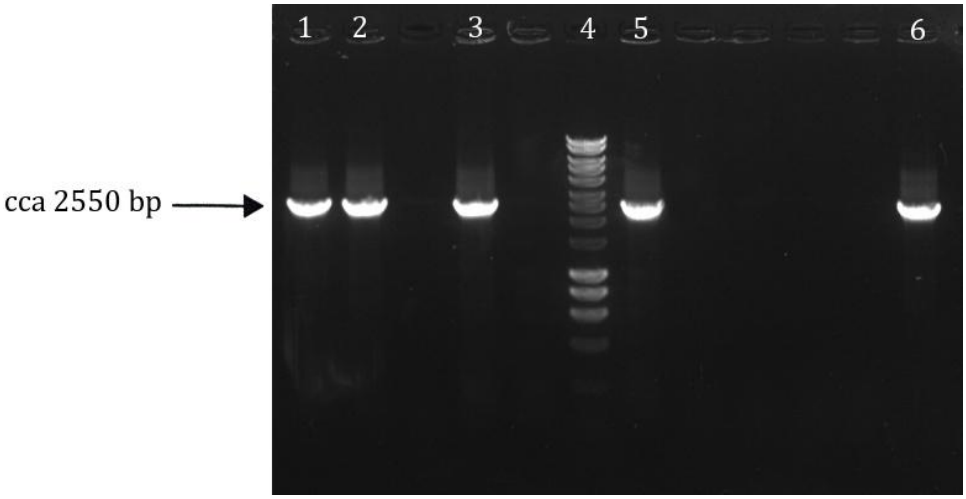
Ověřený deleční konstrukt byl pomocí restriktáz *Xho*I a *Sac*I z vektoru pCR4-TOPO vyštěpen a vložen do plazmidového vektoru pDM4 (rozštěpený stejnými restrikčními enzymy, Obr. 8). Fragmenty byly po elektroforetické separaci izolovány a byla stanovena jejich koncentrace. Ligační reakci byla prováděna v různých poměrech molarity volných konců inzertu : vektoru, a to 3:1, 4:1 a 5:1. Úspěšní jsme byli při dodržení poměru 4:1. Kromě Quick T4 DNA ligázy jsme pro ligaci zkoušeli použít i tradiční T4 DNA ligázu (NEB). Po transformaci do *E. coli* NEB Turbo byly klony nesoucí inzertní DNA ověřeny pomocí PCR na narostlých koloniích s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D (pozitivní kolonie- fragment cca 2550 bp) (Obr. 9) a následně restrikcí izolované plazmidové DNA (Obr. 10).

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury (30 % glycerol).



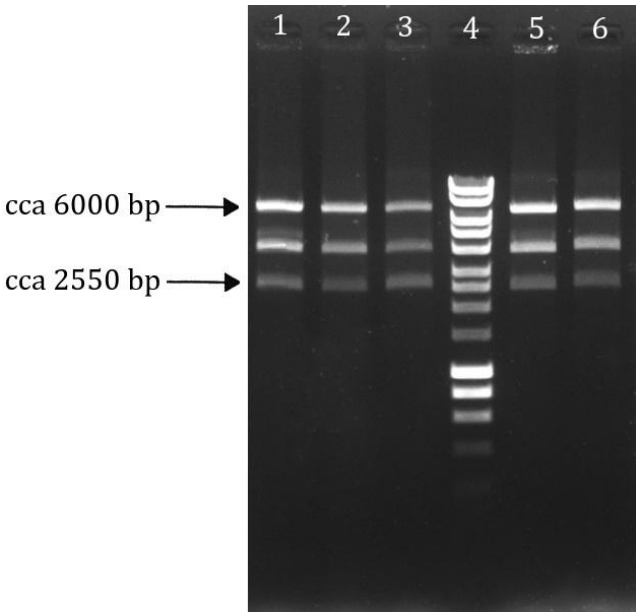
Obrázek 8: Linearizovaný plazmidový vektor pDM4 po štěpení restrikčními enzymy *Xho*I a *Sac*I

1- linearizovaný plazmid pDM4, přibližná velikost tohoto plazmidu je 6000 bp, 2- GeneRuler^{Tm} 1 kb DNA Ladder



Obrázek 9: PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D na koloniích *E. coli* NEB Turbo transformovaných vektorem pDM4-Δ*huB*

1, 2, 3, 5, 6- kolonie *E. coli* nesoucí deleční konstrukt, 4- HyperLadder I

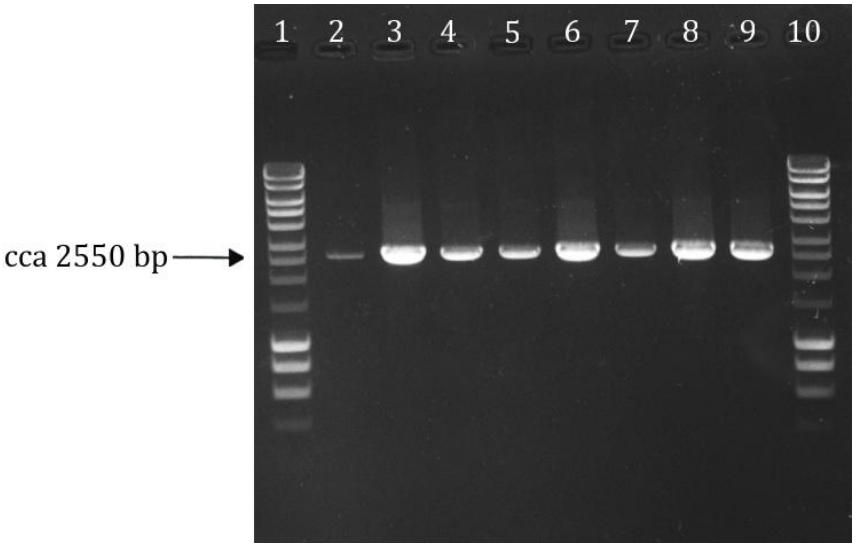


Obrázek 10: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pDM4-Δ*huB* enzymy *Xho*I, *Sac*I
1, 2, 3, 5, 6- testované kolonie, horní fragment (6000 bp) odpovídá vektoru pDM4, spodní (2550 bp) delečnímu konstruktu, prostřední je neštěpený plazmid (ccc forma), 2- HyperLadder I

Transformace pDM4-Δ*huB* do *E. coli* S17-1λpir

Plazmidový vektor pDM4-Δ*huB* byl z buněk *E. coli* NEB Turbo izolován a transformován do *E. coli* S17-1λpir. Úspěšnost transformačního procesu byla u vybraných narostlých kolonií testována pomocí PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D. U kolonií *E. coli* S17-1λpir, do nichž se podařilo plazmid pDM4-Δ*huB* vnést, je na agarózovém gelu viditelný fragment o velikosti cca 2550 bp (Obr. 11).

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury (30 % glycerol).



Obrázek 11: PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D na koloniích *E. coli* S17-1λpir transformovaných vektorem pDM4-Δ*huB*
1, 10- HyperLadder I; 2- 9: kolonie *E. coli* nesoucí deleční konstrukt

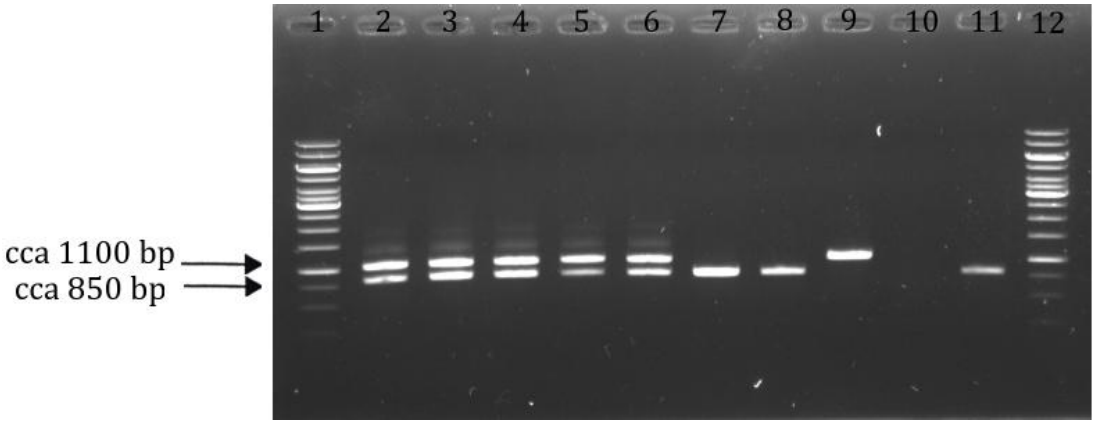
4.1.4 Konjugace a sacharózová selekce

Bakteriální kmen *E. coli* S17-1λpir pDM4-Δ*huB* byl použit jako donorový kmen pro konjugativní přenos plazmidové DNA do *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200.

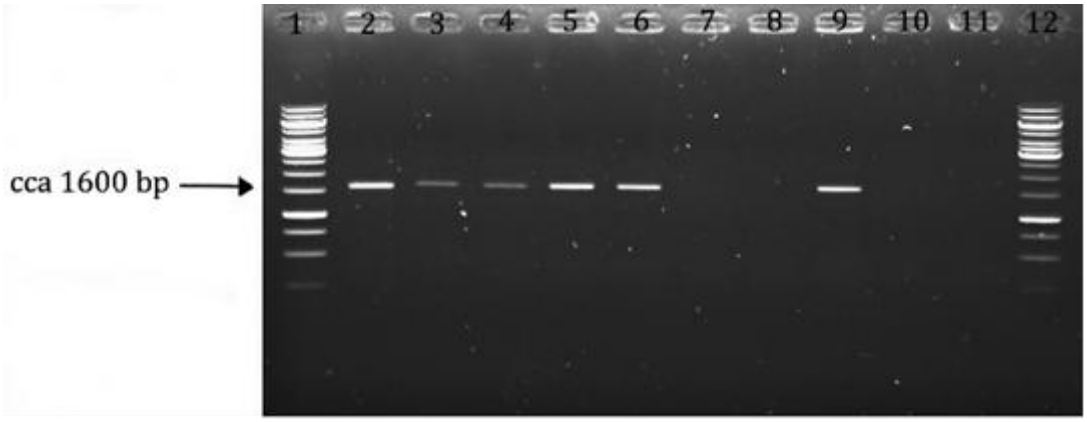
Plazmid pDM4 se není schopen v *F. tularensis* replikovat a dochází k jeho začlenění do chromozomu prostřednictvím homologní rekombinace. Pozitivní selekce dvojitých rekombinantů byla provedena díky genu *sacB* (kódován z plazmidu pDM4) v prostředí 5 % sacharózy. Odstranění plazmidové DNA z bakterií bylo následně ověřeno přeočkováním narostlých kolonií *F. tularensis* formou replica plating na McLeod plotny s chloramfenikolem a bez chloramfenikolu. Konečná přítomnost genetické modifikace byla potvrzena na základě PCR. Z výsledných snímků agarózového gelu (Obr. 12 a 13) je zřejmé, že homologní rekombinací se podařilo gen *huB* z chromozomální DNA odstranit u kolonií ozn. 7, 8 a 11. Některé kolonie (ozn. 2-6) se pak jevily jako směsné kultury divokého a delečního kmene, kdy na gelu byly patrné fragmenty o délce specifické pro oba kmeny.

Mutantní kolonie narostly na McLeod plotnách se sacharózou až po delší době kultivace, cca po 8- 9 dnech. Kolonie narostlé v prvních přibližně 5 dnech byly pomocí PCR vždy povrzeny jako divoké typy.

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury.



Obrázek 12: PCR na koloniích *F. tularensis* s použitím kombinace primerů FTS_0886_F1 a FTS_0886_R1. U divokého kmene vzniká amplifikací fragment délky cca 1100 bp, v případě kmene s úspěšnou delecí genu *huB* fragment délky cca 850 bp.
1, 12- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2- 11: testované kolonie *F. tularensis* (vyhodnocení: kolonie ozn. 2- 6 směsné kultury divokého a delečního kmene; 7,8 a 11- deleční kmen; 9- divoký kmen)

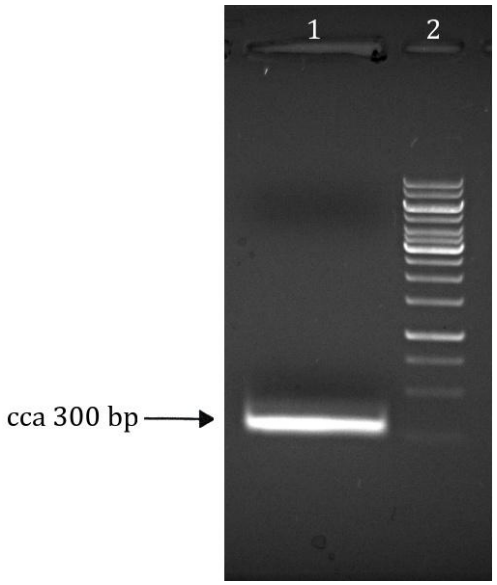


Obrázek 13: PCR na koloniích *F. tularensis* s použitím kombinace primerů FTS_0886_1F a FTS_0886_2R. U divokého kmene vzniká amplifikací fragment délky cca 1600 bp, v případě kmene s úspěšnou delecí genu *huB* fragment nevznikne (primer 2R nasedá v oblasti genu *huB*).
1, 12- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2- 11: testované kolonie *F. tularensis* (vyhodnocení: kolonie ozn. 7,8 a 11- deleční kmen)

4.2 Komplementace in trans delečního mutanta F. tularensis subsp. holarctica kmen FSC200/ΔhuB

4.2.1 Amplifikace genu huB

Gen *huB* byl syntetizován metodou PCR podle chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200. Použité primery (pKK_0886_R a pKK_0886_R) umisťují na začátek a konec genu restrikční místa pro enzymy *Nde*I a *Sac*I. Úspěšnost syntézy genu byla ověřena elektroforetickou separací v agarózovém gelu (Obr. 14). Velikost genu *huB* je 273 bp.

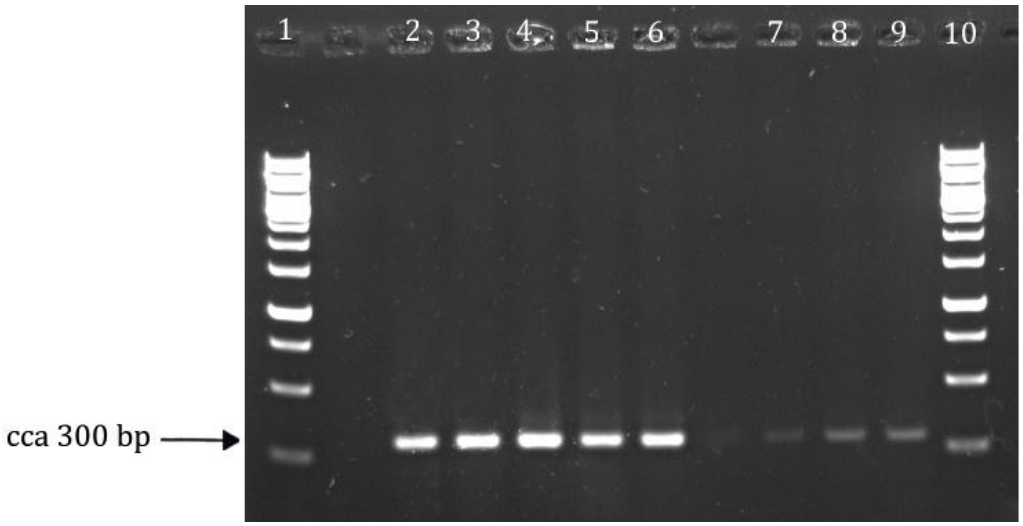


Obrázek 14: Produkt PCR po elektroforetické separaci v 1 % GTG agarózovém gelu
1- amplifikovaný gen *huB*, 2- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

4.2.2 Příprava plazmidu pCR4-TOPO-huB

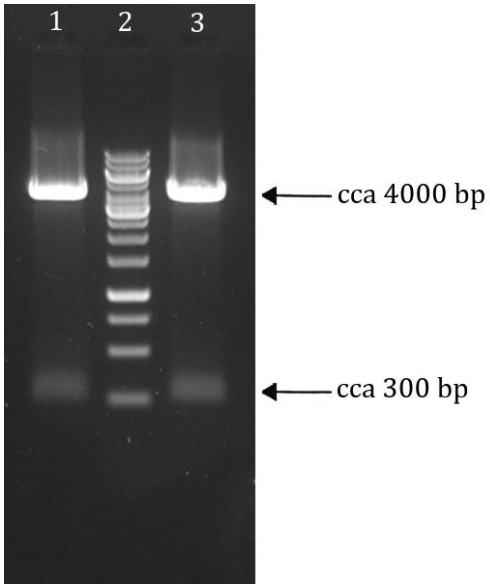
Produkt PCR byl vložen do plazmidového vektoru pCR4-TOPO pro sekvenování a transformován do *E. coli* XL1. Přítomnost PCR produktu (gen *huB*) v transformovaných bakteriích byla ověřena pomocí PCR na koloniích (Obr. 15) s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R (u pozitivních kolonií je amplifikován fragment délky cca 300 bp) a následně restrikcí izolované plazmidové DNA enzymy *Nde*I a *Sac*I (Obr. 16). Zaklonovaný inzert byl poté osekvenován.

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury (30 % glycerol).



Obrázek 15: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R na koloniích *E. coli* XL1 transformovaných vektorem pCR4-TOPO-*huB*

1, 10- GeneRuler^{Tm} 1 kb DNA Ladder; 2-9: kolonie *E. coli* nesoucí zaklonovaný inzert



Obrázek 16: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pCR4-TOPO-*huB* enzymy *Nde*I, *Sac*I

1, 3- fragment 4000 bp odpovídá vektoru pCR4-TOPO, kratší fragment genu *huB*; 2- GeneRuler^{Tm} 1kb DNA Ladder

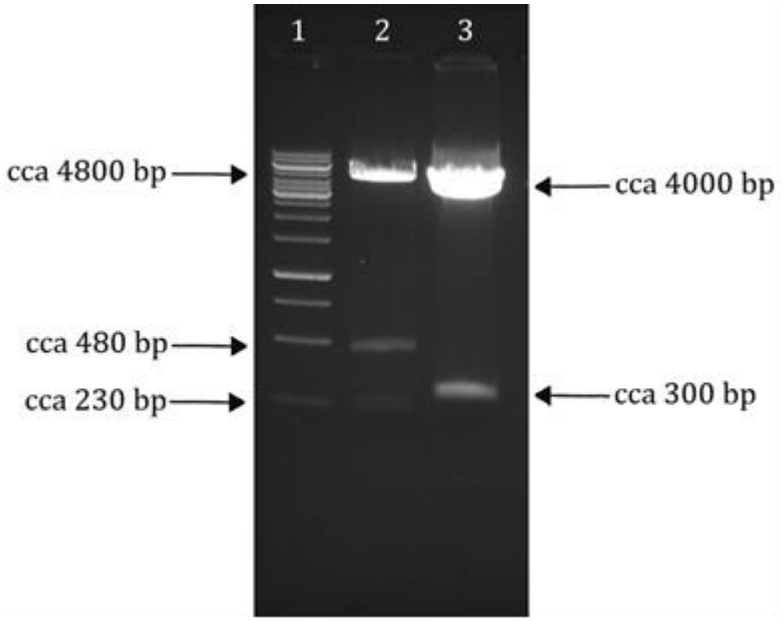
4.2.3 Příprava plazmidu pKK289Km-huB

Shuttle vektor pKK289KmGFP se schopností replikace v *E. coli* i *F. tularensis* byl použit jako nástroj pro *trans* komplementaci delečního kmene *F. tularensis*.

Sekvenací ověřený gen *huB* vyštěpený z vektoru pCR4-TOPO (Obr. 17) byl vložen do vektoru pKK289Km na místo *gfp*. Gen pro GFP byl odstraněn při rozštěpení vektoru enzymy *Nde*I a *Sac*I (Obr. 17). Ligace byla provedena v poměru molarity volných konců inzertu : vektoru = 3:1 a ligační směs byla transformována do *E. coli* XL1. Přítomnost genu *huB* v transformovaných bakteriích byla v prvním kroku ověřena pomocí PCR na narostlých koloniích s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R (u pozitivních kolonií vzniká fragment délky cca 300 bp). Po elektroforetickém vyhodnocení nebyly ovšem tyto fragmenty na gelu (Obr. 18) dobře rozlišitelné. Z důvodu ověření výsledků byla PCR se shodnými primery provedena u vybraných kolonií i na izolované plazmidové DNA (Obr. 19).

Podobný problém nastal také při štěpení plazmidové DNA restrikčními enzymy *Nde*I a *Sac*I, kdy na snímku gelu nebyly fragmenty velikostně odpovídající inzertu viditelné. Proto byla plazmidová DNA podrobena restrikčnímu štěpení enzymem *Hind*III (NEB) (Obr. 20). Tato restriktáza má tři restrikční místa v plazmidovém vektoru a jedno v inzertu. Počet a velikost fragmentů vzniklých štěpením se tedy liší pro samotný vektor pKK289KmGFP a vektor s vloženým genem *huB*.

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury (30 % glycerol).

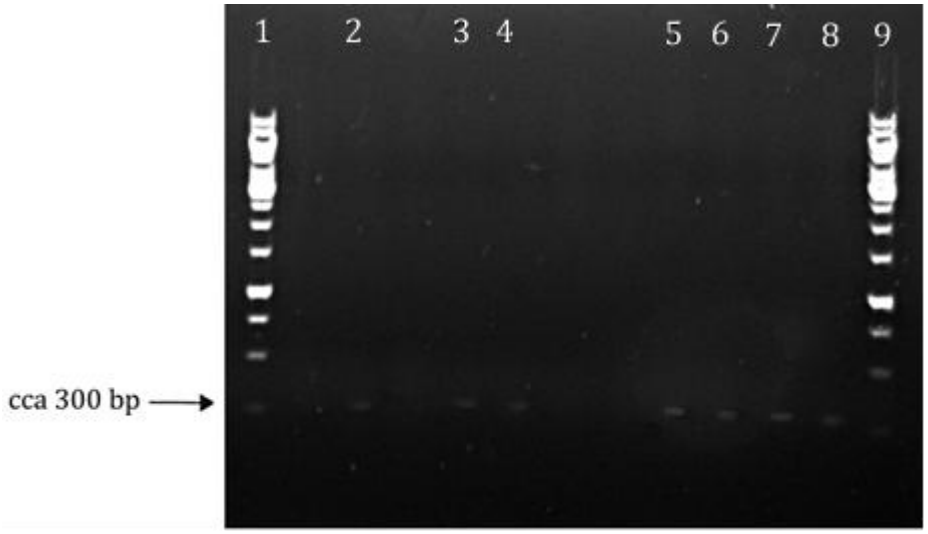


Obrázek 17: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289KmGFP a vektoru pCR4-TOPO-*huB* enzymy *Nde*I, *Sac*I

1- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

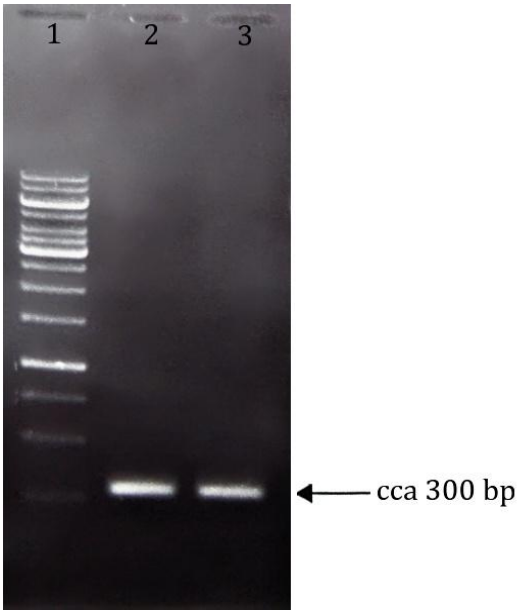
2- Restrikční štěpení plazmidu pKK289KmGFP- přibližná velikost tohoto plazmidu je 5500 bp, po štěpení enzymy *Nde*I, *Sac*I cca 4800 bp (tj. pKK289Km bez GFP). Spodní bandy odpovídají fragmentům genu *gfp* (uvnitř sekvence genu *gfp* je rozpoznávací místo pro *Nde*I restriktázu).

3- Restrikční štěpení plazmidového vektoru pCR4-TOPO-*huB*- fragment 4000 bp odpovídá vektoru pCR4-TOPO, kratší fragment genu *huB*



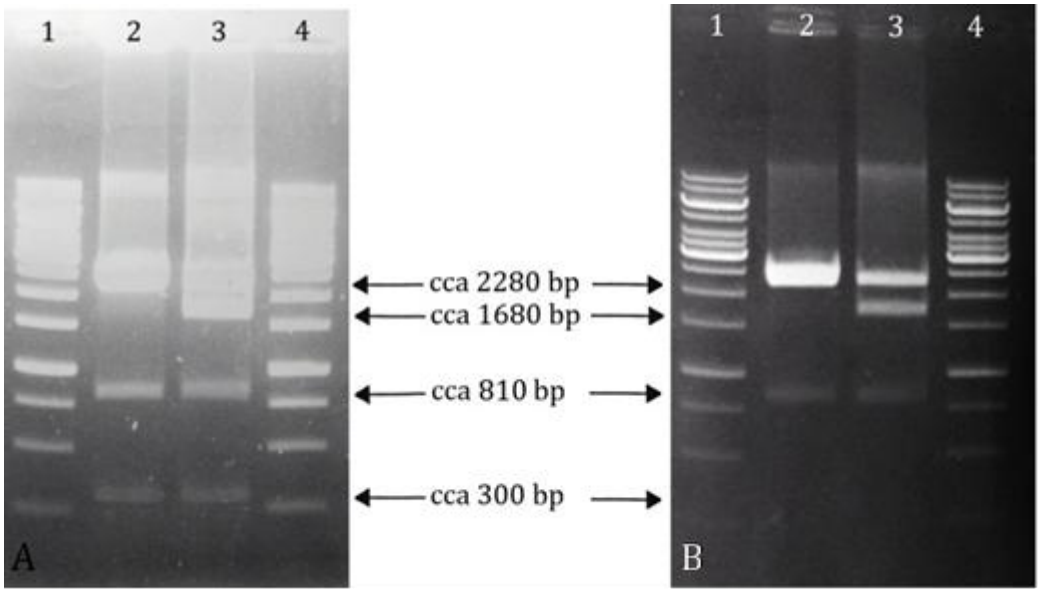
Obrázek 18: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R na koloniích *E. coli* XL1 transformovaných vektorem pKK289Km-*huB*

1, 9- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2-8: kolonie *E. coli* nesoucí zaklonovaný inzert



Obrázek 19: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R na izolované plazmidové DNA z vybraných kolonií *E. coli* XL1 transformovaných vektorem pKK289Km-*huB* (na Obr. 18 označeny 5, 7)

1- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2, 3- plazmidy nesoucí zaklonovaný inzert



Obrázek 20: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289Km-*huB* enzymem *Hind*III (A- delší expozice, B- kratší expozice)

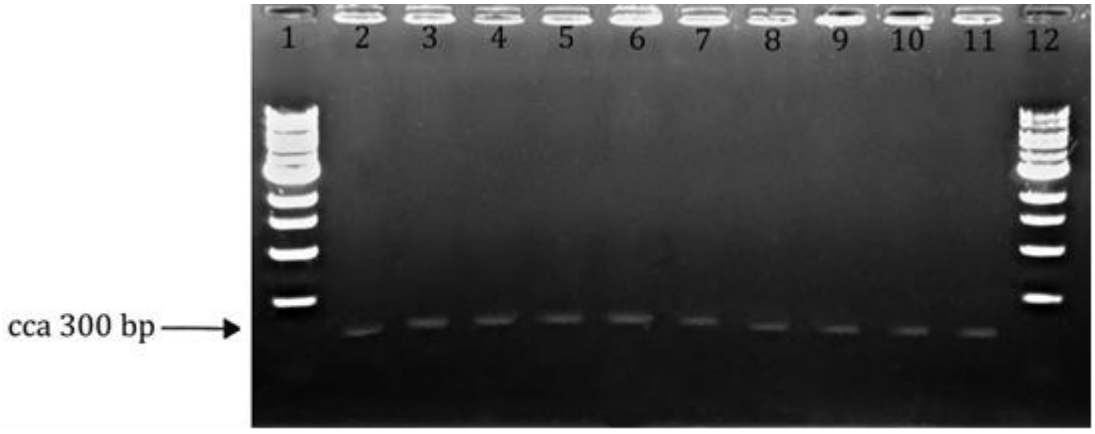
1, 4- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder;

2, 3- štěpená plazmidová DNA- plazmidový vektor pKK289Km-*huB* je enzymem *Hind*III štěpen na čtyři fragmenty velikostně cca 2280 bp, 1680 bp, 810 bp a 300 bp, samotný vektor pKK289KmGFP na tři fragmenty přibližné velikosti 2280 bp, 1680 bp a 1540 bp. Správně se naštěpila plazmidová DNA označená číslem 3.

4.2.4 Elektroporace plazmidu pKK289Km-huB do delečního kmene F. tularensis FSC200/ΔhuB

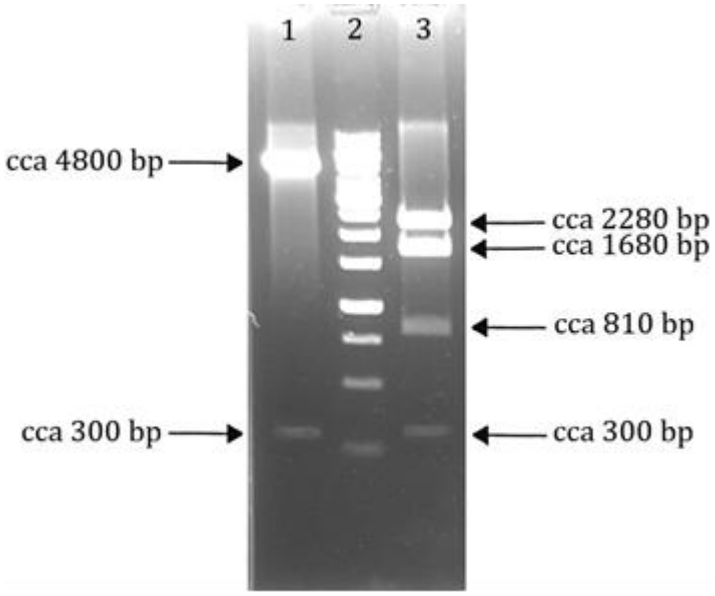
Získaný plamid pKK289Km-*huB* byl použit pro *trans* komplementaci delečního kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* pomocí elektroporace. Úspěšnost elektroporace byla u vybraných narostlých kolonií ověřena PCR na koloniích s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R (Obr. 21). Při této kombinaci primerů je u pozitivních kolonií amplifikován fragment délky cca 300 bp. Pro znovuověření pozitivních kolonií byla provedena kontrolní restrikce izolované plazmidové DNA z kolonií *F. tularensis* enzymy *Nde*I a *Sac*I a enzymem *Hind*III (Obr. 22).

Pozitivní klon byl uchován zamražením zásobní kultury a testován v *in vitro* a *in vivo* systémech spolu s delečním kmenem FSC200/Δ*huB* a divokým kmenem FSC200.



Obrázek 21: PCR na koloniích *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* transformovaných vektorem pKK289Km-*huB*

1,12- GeneRuler^{Tm} 1 kb DNA Ladder; 2- 11: kolonie nesoucí plazmidový vektor pKK289Km-*huB*



Obrázek 22: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289Km-*huB* izolovaného z *F. tularensis* enzymy *Nde*I, *Sac*I a enzymem *Hind*III

1- štěpení restrikčními enzymy *Nde*I a *Sac*I- fragment 4800 bp odpovídá vektoru pKK289Km, kratší fragment genu *huB*

2- GeneRuler^{Tm} 1 kb DNA Ladder

3- štěpení restrikčním enzymem *Hind*III- vektor pKK289Km s vloženým genem *huB* se štěpí na čtyři fragmenty velikosti cca 2280 bp, 1680 bp, 810 bp a 300 bp

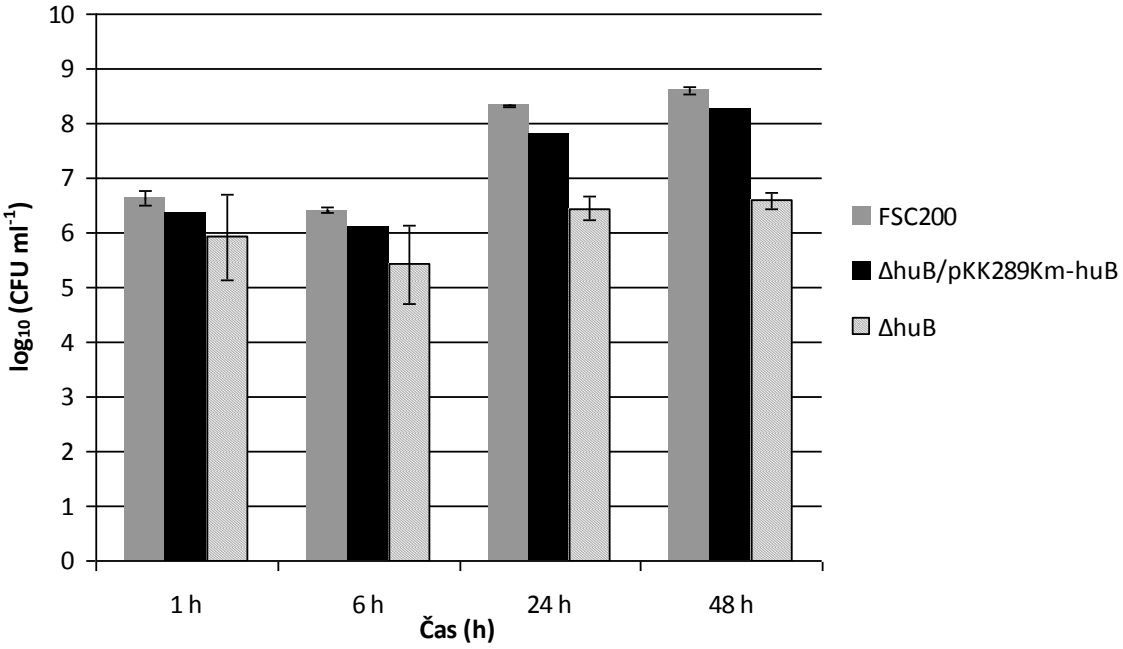
4.3 Proliferace F. tularensis v primárních kostně-dřeňových makrofázích (BMMs)

Pro posouzení schopnosti delečního mutanta vstupovat a replikovat se v makrofázích byly použity primární kostně-dřeňové buňky izolované z myší kmene BALB/c. Test proliferace byl proveden s delečním kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB*, *trans* komplementovaným kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* a divokým kmenem *F. tularensis* FSC200 (pozitivní kontrola).

Experiment byl proveden s divokým a delečním kmenem dvakrát, s komplementovaným jednou, vždy v triplikátu.

V průběhu prvního pokusu jsme po odečtu CFU z McLeod ploten s vysetými bakteriálními suspenzemi delečního mutanta zjistili, že skutečné množství bakterií se v suspenzi o OD_{600} = 1 pohybuje o řád níže, než jsme předpokládali. Experimentálně (výsevem z ředění 10^{-5}, 10^{-6} a 10^{-7} bakteriální suspenze o OD_{600} = 1 a odečtem CFU) jsme stanovili, že bakteriální suspenze delečního mutanta o OD_{600} = 1 odpovídá cca $2x10^8$ CFU/ml, nikoliv $3x10^9$ CFU/ml, což bylo zohledněno při druhé sérii pokusů v podmínkách *in vitro* i *in vivo*.

V rámci provedeného testování (Obr. 23) jsme mezi mutantním a divokým kmenem nezjistili výrazný rozdíl ve schopnosti vstupovat do makrofágů. Získané výsledky ovšem ukázaly, že intracelulární proliferace kmene s delecí genu pro histone-like protein B se zřetelně liší od proliferace divokého i *trans* komplementovaného kmene. Komplementací delečního kmene pak byla schopnost proliferace v BMMs prokazatelně obnovena.



Obrázek 23: Intracelulární proliferace kmenů *F. tularensis*
U delečního kmene *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* je patrná snížená schopnost proliferace v BMMs. *Trans* komplementací delečního kmene vektorem pKK289Km-*huB* byl růst uvnitř makrofágů obnoven. Divoký kmen *F. tularensis* FSC200 je zahrnut jako pozitivní kontrola.

4.4 Infekce myší typu BALB/c

Vliv mutace na virulenci *F. tularensis* byl dále testován v systému *in vivo*. Při tomto testu byly myši typu BALB/c infikovány subkutánně delečním kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB*, *trans* komplementovaným kmenem *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* + pKK289Km-*huB* a divokým kmenem *F. tularensis* FSC200 (pozitivní kontrola).

Při prvním pokusu byl testován divoký a deleční kmen. Divoký kmen v infekční dávce $3x10^2$ CFU/myš (skutečný počet CFU určený výsevem: $7,68x10^2$) způsobil 100 % úmrtnost testovaných myší 6. den po infekci. Oproti tomu žádná myš neuhynula po infekci stejnou dávkou ($3x10^2$ CFU/myš) delečního kmene, a ani po infekci dávkou 10 000x vyšší, tj. $3x10^6$ CFU/myš. Po odečtu CFU z McLeod ploten s vysetými bakteriálními suspenzemi delečního mutanta jsme ovšem zjistili, stejně jako při testech proliferace, že skutečné množství bakterií v aplikovaných dávkách se pohybovalo o řád níže, než jsme předpokládali, a to $7,6x10^1$ a $4,8x10^5$. Zjištění, že bakteriální suspenze delečního mutanta o OD_{600} = 1 odpovídá cca $2x10^8$ CFU/ml, nikoliv $3x10^9$ CFU/ml (viz kapitola 4.3), jsme zohlednili při druhém pokusu.

Přeživší myši z prvního pokusu byly 28. den po infekci otestovány na protekci vůči divokému kmeni. Při reinfekci byla myším aplikována dávka $3x10^2$ CFU/myš (skutečný počet CFU: $3,16x10^2$). Ve skupině myší infikované delečním kmenem o dávce $4,8x10^5$ CFU/myš přežilo reinfekci divokým kmenem 100 % jedinců. Ve skupině infikované dávkou $7,6x10^1$ CFU/myš uhynula jedna myš 10. den po reinfekci.

Ve druhém pokusu byl testován divoký, deleční a komplementovaný kmen. Divoký i komplementovaný kmen v infekční dávce $3x10^2$ CFU/myš (skutečný počet CFU: $1,24x10^2$, resp. $1,68x10^2$) způsobily 100 % úhyn testovaných myší v obou skupinách 6. den po infekci. Zatímco po infekci delečním kmenem v dávce $3x10^2$ a $3x10^6$ CFU/myš (skutečný počet: $3,48x10^2$, resp. $3,56\ x10^6$) neuhynula myš žádná.

Přeživší myši byly opět 28. den po infekci reinfikovány divokým kmenem v dávce $3x10^2$ CFU/myš (skutečný počet CFU: $7,76x10^2$). I přes vyšší skutečnou aplikovanou dávku reinfekci přežilo 100 % myší ze skupiny infikované delečním kmenem o dávce $3x10^6$ i $3x10^2$ CFU/myš.

Jako negativní kontrola byla při testování zahrnuta skupina 6 myší, kterým byl subkutánně vpraven do těla samotný fyziologický roztok. U těchto myší nebyly v průběhu 21 dní zaznamenány žádné zdravotní problémy. Po reinfekci divokým kmenem uhynuly 6. den.

Plná protekce proti infekci divokým kmenem byla tedy zajištěna po imunizaci dávkou delečního kmene $3x10^6$ i $3x10^2$ CFU/myš.

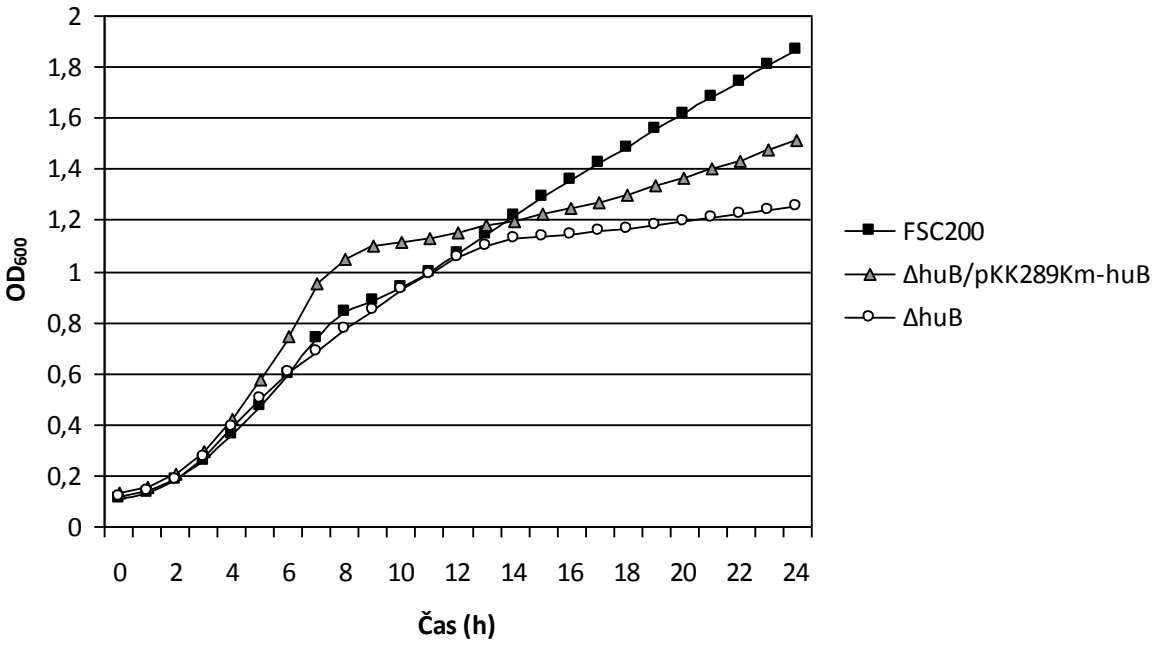
4.5 Měření růstové křivky

V průběhu práce jsme při kultivacích Δ*huB* kmene pozorovali, že v tekutém médiu kultury dosahují zpravidla nižších hodnot optické denzity v porovnání s divokým kmenem a na pevných půdách kolonie narůstají až po více dnech kultivace.

Proto jsme testování doplnili o porovnání schopnosti růstu delečního kmene s růstem divokého a *trans* komplementovaného kmene v Chamberlainově médiu při 37 °C. Růstové křivky bakteriálních kultur byly měřeny pomocí přístroje

FluoStar Optima microplate reader. Měření bylo provedeno s divokým a delečním kmenem třikrát, s komplementovaným dvakrát, vždy v pěti replikátech.

Z výsledných růstových křivek (Obr. 24) je patrné, že přibližně do 13 hodiny kmeny rostly velmi podobně. Deleční kmen poté vstupuje do stacionární fáze, kdežto divoký i komplementovaný kmen pokračují dále v růstu. Tímto výsledkem jsme si potvrdili během práce pozorovaný jev. Rozdíl v růstových křivkách divokého a komplementovaného kmene naznačuje, že fenotyp divokého kmene nebyl genetickou komplementací plně obnoven.



Obrázek 24: Vliv delece genu *huB* na růst *Francisella tularensis*

5 Diskuze

Francisella tularensis je vysoce infekční patogenní bakterií, přesto značná část virulenčních mechanismů není zcela objasněna. V současnosti nejlépe charakterizované faktory virulence kóduje oblast *Francisella* genomu označovaná jako ostrov patogenity. V této oblasti leží například geny intracelulárního růstového lokusu *iglABCD* a geny *pdpABCD*, jež se ukázaly jako nezbytné pro *F. tularensis* z hlediska intracelulárního růstu a virulence (Nano et al., 2004). Postupně jsou v souvislosti s intenzivním studiem tohoto mikroorganismu objevovány nové faktory spojené s virulencí. Za možného kandidáta na virulenční faktor je považován, mimo jinými, protein nesoucí označení histone-like protein forma B (HuB) kódovaný genem na lokusu FTS_0886. Tento protein byl identifikován v rámci proteomické analýzy (Lenco et al., 2009), ve které byly sledovány změny *Francisella* proteomu pod vlivem různých stresových podmínek. Za účelem posouzení hypotézy možné role tohoto proteinu v patogenezi tularémie byl v rámci této diplomové práce připraven a charakterizován mutantní kmen s delecí genu pro HuB.

HuB *F. tularensis* patří do široké rodiny histonům podobných proteinů vyskytujících se u bakterií. Tato rodina představuje skupinu malých, bazických a hojně zastoupených proteinů vázajících se na DNA. HU jsou vysoce konzervativní z hlediska výskytu i struktury napříč celou bakteriální říší (Pettijohn, 1988; Grove, 2011). Na základě studií provedených s různými druhy bakterií je známo, že HU se váží na nukleovou kyselinu nespecifickým způsobem s patrným upřednostňováním DNA se strukturálními narušeními a s preferencí AT bohatých úseků (Kumar et al., 2010; Prieto et al., 2012). Jsou to dimerní proteiny tvořené jedním či dvěma typy podjednotek. Heterodimerní stav HU je zřejmě omezený pouze na enterobakterie, zatímco v mnoha jiných bakteriích je HU v podobě homodimeru (Grove, 2011). Homolog kódovaný *F. tularensis* existuje v aktivní formě jako homodimer tvořený podjednotkami kódovanými genem *huB* (NCBI, 2014).

Výsledky studií mnoha autorů značí významnou roli HU ve fyziologii patogenních i nepatogenních druhů bakterií. HU mají jednak strukturní úlohu účastněním se na utváření struktury nukleoidu. Svým navázáním na nukleovou kyselinu mohou způsobovat její ohýbání (Aki et Adhia, 1997; Anuchin et al., 2011). Často se účastní buněčných procesů, jako je replikace, transkripce, rekombinace či opravy DNA (Azam et Ishihama, 1999). Dobře charakterizované jsou funkce HU *E. coli*. Zde bylo prokázáno, že reguluje genovou expresi velkého počtu genů, přičemž mnoho z těchto genů je zapojených do bakteriálních adaptací na změny environmentálního prostředí i genů potřebných k odpovědím na stres (Balandina et al., 2001; Oberto et al., 2009). Stejně tak je pro adaptaci bakterií ke stresovým podmínkám důležitý HupB mykobakterií (Lee et al., 1998). Výsledky Mangan et al. (2011) ukazují, že HU *Salmonella typhimurium* je globálním regulátorem, který

koordinuje expresi genů zapojených v centrálním metabolismu a virulenci a celkově přispívá k úspěchu *S. typhimurium* jako patogenu. Podobně u *Streptococcus intermedius* Liu et al. (2008) prokázal, že *Si*-HLP ovlivňuje úroveň transkripce několika genů včetně faktorů spojených s virulencí.

Význam HuB pro bakterii *F. tularensis* nebyl dosud zkoumán. Za účelem porozumění vlivu HuB na virulenci této patogenní bakterie byl v rámci této diplomové práce připraven mutantní kmen *F. tularensis* subsp*. holarctica* FSC200/Δ*huB* postrádající gen pro histone-like protein B*.* Při konstrukci tohoto kmene byl gen zájmu v chromozomální DNA *F. tularensis* nahrazen homologní rekombinací za deleční konstrukt.

Dále byl připraven komplementovaný kmen. Komplementace mutantního kmene byla provedena z důvodu potvrzení si, že případné změny ve fenotypu mutantního kmene jsou zapříčiněny delecí genu pro histon-like protein B. Původně plánovanou *cis* komplementaci, tedy navrácení genu zájmu do chromozomální DNA, se nám nepodařilo ani přes opakovanou snahu provést. Přistoupili jsme proto k náhradnímu řešení, a to navrácení genu zájmu na plazmidovém vektoru neboli *trans* komplementaci. Za tímto účelem byl použit shuttle vektor pKK289kmGFP se schopností replikace v *E. coli* i *F. tularensis*. Gen pro histon- like protein B amplifikovaný podle chromozomální DNA *F. tularensis* byl po osekvenování vložen do zvoleného plazmidového vektoru namísto genu pro protein GFP a připravený vektor pKK289km-*huB* byl elektroporován do delečního kmene *F. tularensis*.

Připravené bakteriální kmeny byly testovány v podmínkách *in vitro* a *in vivo* se zřetelem na zjištění změn ve virulenci bakterie. Vzhledem k tomu, že *F. tularensis* je intracelulárním patogenem, je pro ni z hlediska virulence nepostradatelná schopnost vstoupení, přežití a proliferace v buňkách hostitele (Chong et Celli, 2010). V kontrastu s divokým kmenem jsme nejprve porovnávali, jak velký přínos má HuB pro intracelulární přežívání *F. tularensis* za využití primárních kostně-dřeňových makrofágů (BMMs) izolovaných z myší kmene BALB/c. Výsledky testů ukázaly, že delece genu *huB* neměla v porovnání s divokým kmenem výrazný vliv na schopnost Δ*huB* kmene vstupovat do makrofágů. Delece tohoto genu však vedla ke snížení úrovně proliferace, kdy je tento stav patrný po 24 i 48 hodinách od infekce. Snížená proliferace uvnitř makrofágů byla pozorována také např. u dvojitých mutantů *ΔhupAB S. typhimurium* (Mangan et al., 2012).

V podmínkách *in vivo* byl k testování použit myší infekční model za využití myší kmene BALB/c. Subkutánně infikované myši divokým a komplementovaným kmenem dávkou $3x10^2$ CFU/myš podlehly infekci ve všech testovaných skupinách 6. den po infekci. Mutantní kmen nebyl schopen vyvolat onemocnění myší v dávce $3x10^2$, ani v dávce $3x10^6$ CFU/myš. Vyřazení genu pro HuB se tedy v *in vitro* i *in vivo* modelu tularémie projevilo výrazným oslabením testovaného mutantního kmene.

Mutantní kmen byl také schopen indukovat ochranou imunitu a chránit myši proti divokému *Francisella* kmeni FSC200. Plná protekce proti infekci divokým

kmenem byla zajištěna po imunizaci dávkou delečního kmene $3x10^6$ i $3x10^2$ CFU/myš. V souvislosti s reinfekcí je zajímavé, že při prvním pokusu byly reinfikovány divokým kmenem myši, jež předtím prodělaly infekci způsobenou delečním kmenem ve skutečné dávce pouze $7,6x10^1$. I tato o řád nižší dávka dokázala ochránit čtyři z pěti testovaných jedinců. Abychom však zjistili, zda vakcinace myší delečním kmenem v dávce 10^1 CFU/myš poskytuje pouze částečnou ochranu či zda úhyn myši byl způsoben jinými okolnostmi, bylo by třeba celý experiment několikrát zopakovat a statisticky vyhodnotit.

Zdá se, že HuB je nezbytný pro normální růst *F. tularensis*. Delece genu *huB* se u mutantního kmene projevila defektem růstu jak na pevných, tak i v tekutých kultivačních půdách. V porovnání s divokým kmenem, u něhož lze dobře rozlišitelné kolonie na pevných půdách spatřit po přibližně pěti dnech kultivace, viditelné kolonie mutantního kmene se začínaly utvářet zpravidla až po 8-9 denní kultivaci. Při kultivaci v tekutých půdách hodnota OD = 1 bakteriální suspenze Δ*huB* kmene neodpovídala hodnotě $3x10^9$ CFU/ml, která je běžná pro divoký kmen, ale pohybovala se o řád níže. Tato pozorování byla potvrzena změřením růstové křivky, která u mutantního kmene ukázala zpočátku srovnatelný růst s divokým kmenem, ale dřívější vstup do stacionární fáze.

Tato zjištění týkající se zhoršeného růstu jsou v souladu s několika pracemi, ve kterých bylo prokázáno, že inaktivace genu pro HU způsobuje růstové změny. Takovýmto příkladem je HupB mykobakterií, který je považovaný za podstatný pro mykobakteriální růst (Sassetti et al., 2003). Nezbytný pro normální růst a vývoj se ukázal také HBsu *Bacillus subtilis* (Micka et Marahiel, 1992). U *Streptococcus intermedius* se Liu et al. (2008) nezdařilo zkonstruovat kmen s nefunkčním genem *Si-hlp*, z čehož bylo odvozeno, že *Si*-HLP je nezbytný pro životaschopnost bakterií. Indukovaná transkripce antisense *Si-hlp* vedla k inhibici růstu *S. intermedius*. U bakterií kódujících dvě podjednotky HU jsou změny růstového profilu pozorovány především u dvojitých mutantů. V práci Prieto et al. (2012) se lišila od divokého kmene růstová křivka dvojitých mutantů *ΔhupAB E. coli*, ale nikoliv růstová křivka *ΔhupA* či *ΔhupB* kmene. Určité růstové změny pozoroval i Mangan et al. (2011) u dvojitých mutantů *Salmonella typhimurium*. Tito mutanti se lišili růstovým profilem od divokého kmene v počátečních fázích kultivace, kdy vykazovali výrazně sníženou rychlost růstu. Mutanti pouze v jedné podjednotce měli růstový profil podobný divokému kmeni. Zajímavé je, že mnoho bakteriálních genomů kóduje pouze jednu podjednotku HU, kdy konzervativnější podjednotkou napříč bakteriemi je HupB, ale tato podjednotka zřejmě hraje u bakterií kódujících dvě podjednotky, jako je *E. coli* (Prieto et al., 2012) či *Salmonella enteritica* (Mangan et al., 2011), v kontrole genové exprese menší roli.

Spolu s delečním kmenem byl v této práci ve shodných *in vitro* a *in vivo* podmínkách testován také komplementovaný kmen. Provedené testy ukázaly, že komplementací nedošlo k úplnému navrácení fenotypu divokého kmene, což jsme ovšem ani neočekávali. Například i Zogaj et Klose (2010) uvádí, že úplná komplementace chromozomální mutace navrácením genu zájmu na plazmidu je

u *Francisella* kmenů velmi obtížná. V tomto směru je pak mnohem účinnější původně zamýšlená *cis* komplementace. Námi provedenou *trans* komplementací nebyl fenotyp divokého kmene zcela obnoven, ale obnovení bylo jasně prokazatelné.

Celkově výsledky této práce značí výrazné oslabení delečního kmene a lze se domnívat, že HuB hraje podstatnou roli ve schopnosti růstu a virulence *Francisella tularensis*.

Další práci s tímto potvrzeným faktorem virulence by bylo vhodné zaměřit na mechanismy účinku HuB u *F. tularensis*, o kterých do této doby není nic známo. Bylo by možné vycházet z předpokladu, že u většiny studovaných bakterií se HU projevuje jako faktor zasahující do genové exprese mnoha genů. V této souvislosti by tedy bylo potřebné odhalit HU regulon *F. tularensis*. Možností by mohlo být vystavení bakterií stresovým podmínkám (obsah železa, teplota), které nastávají během interakce s hostitelem, a stanovit, u kterých proteinů dochází ke změnám exprese za daných podmínek. Odhalení mechanismů účinku HuB a jeho zapojení do virulence *F. tularensis* bude předmětem jiné práce.

6 Závěr

V rámci diplomové práce byl studován vliv potenciálního faktoru virulence HuB (histon-like protein B) na virulenci patogenní bakterie *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200. Použitím metod cílené mutageneze byl připraven kmen *F. tularensis* s delecí genu pro histone-like protein B (Δ*huB*), u něhož byl homologní rekombinací nahrazen v chromozomální DNA gen zájmu za deleční konstrukt.

Vliv delece genu na virulenci bakterie byl testován v systémech *in vitro* a *in vivo* a porovnáván s vlastnostmi původního rodičovského kmene. *In vitro* testy u Δ*huB* kmene ukázaly zřetelné snížení úrovně proliferace v primárních kostně-dřeňových makrofázích, ale nebyl zaznamenán výrazný rozdíl ve schopnosti vstupovat do makrofágů. *In vivo* infekce myší BALB/c Δ*huB* kmenem prokázaly v porovnání s divokým kmenem značné snížení virulence. Všichni testovaní jedinci přežili subkutánně aplikovanou dávku delečního kmene $3x10^2$ a $3x10^6$ CFU/myš. Byl také prokázán protektivní účinek u myší infikovaných delečním kmenem v obou dávkách a následně reinfikovaných divokým kmenem. Testování Δ*huB* kmene bylo dále doplněno o růstové křivky, kdy byl zjištěn určitý defekt růstu.

Pro potvrzení, že pozorované změny fenotypu delečního kmene jsou v důsledku delece genu *huB*, byla provedena komplementace tohoto kmene *in trans*. Kompelementací došlo ke zřetelnému obnovení virulence odpovídajícímu úrovni divokého kmene, což definitivně prokázalo roli HuB ve virulenci *F. tularensis*.

Seznam použité literatury

1. ABD H., JOHANSSON T., GOLOVLIOV I., SANDSTRÖM G., FORSMAN M., 2003. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Applied and environmental microbiology. 69(1), 600-606.

2. AKI T, ADHYA S., 1997. Repressor induced site-specific binding of HU for transcriptional regulation. The EMBO journal. 16, 3666-3674.

3. ANUCHIN A. M., GONCHARENKO A. V., DEMIDENOK O. I, KAPRELYANTS A. S., 2011. Histone-like proteins of bacteria (review). Applied biochemistry and microbiology. 47(6), 580-585.

4. AZAM T. A., ISHIHAMA H., 1999. Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity. The Journal of biological chemistry. 274(46), 33105–33113.

5. BALANDINA A., CLARET L., HENGGE-ARONIS R., ROUVIERE-YANIV J., 2001. The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates *rpoS* translation. Molecular microbiology. 39(4), 1069-1079.

6. BARABOTE R. D., XIE G., BRETTIN T. S., HINRICHS S. H., FEY P. D., JAY J. J., ENGLE J. L., GODBOLE S. D., NORONHA J. M., SCHEUERMANN R. H., ZHOU L. W., LION CH., DEMPSEY M. P., 2009. Complete genome sequence of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* FTNF002-00. PLoS One. 4(9), e7041. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone. 0007041.

7. BARRY E. M., COLE L. E., SANTIAGO A. E., 2009. Vaccines against tularemia. Human vaccines. 5(12), 832-838.

8. BEDNÁŘ M., SOUČEK A., VÁVRA J., 1994. Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Praha: Triton. 226 s. ISBN 80-901521-4-7.

9. BÖNQUIST L., LINDGREN H., GOLOVLIOV I., GUINA T., SJÖSTEDT A., 2008. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. Infection and immunity. 76(8), 3502-3510.

10. BROTCKE A., MONACK D. M., 2008. Identification of *fevR*, a novel regulator of virulence gene expression in *Francisella novicida*. Infection and immunity. 76(8), 3473–3480.

11. BUCHAN B. W., MCCAFFREY R. L., LINDEMANN S. R., ALLEN L-A. H., JONES B. D., 2009. Identification of *migR*, a regulatory element of the *Francisella tularensis* live vaccine strain *iglABCD* virulence operon required for normal replication and trafficking in macrophages. Infection and immunity. 77(6), 2517–2529.

12. CDC, 2015. Bioterrorism Agents/Diseases. In: Centers for Disease Control and Prevention [online]. 6. 2. 2015 [cit. 14. 3. 2015]. Dostupné z: http://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp.

13. CLARET L., ROUVIERE-YANIV J., 1997. Variation in HU composition during growth of *Escherichia coli*: the heterodimer is required for long term survival. Journal of molecular biology. 273(1), 93-104.

14. DAME R. T., GOOSEN N., 2002. HU: promoting or counteracting DNA compaction? FEBS letters. 529(2-3), 151-156.

15. 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., TONAT K., 2001. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 285(21), 2763-2773.

16. DRLICA K., ROUVIERE-YANIV J., 1987. Histonelike proteins of bacteria. Microbiological reviews. 51(3), 301-319.

17. ELLIS J., OYSTON P. C. F., GREEN M., TITBALL R. W., 2002. Tularemia. Clinical microbiology reviews. 15(4), 631–646.

18. FARLOW J., SMITH K. L., WONG J., ABRAMS M., LYTLE M., KEIM P., 2001. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. Journal of clinical microbiology. 39(9), 3186-3192.

19. FOLEY J. E., NIETO N. C., 2010. Tularemia. Veterinary microbiology. 140, 332–338.

20. GRIFFIN K. F., OYSTON P. C., TITBALL R. W., 2007. *Francisella tularensis* vaccines. FEMS immunology and medical microbiology. 49(3), 315-323.

21. GROVE A., 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. Current issues in molecular biology. 13(1), 1-12.

22. GUNN J. S., ERNST R. K., 2007. The structure and function of *Francisella* lipopolysaccharide. Annals of the New York Academy of Sciences. 1105, 202-218.

23. GUPTA M., SAJID A., SHARMA K., GHOSH S., ARORA G., SINGH R., NAGARAJA V., TANDON V., SINGH Y., 2014. HupB, a nucleoid-associated protein of *Mycobacterium tuberculosis*, is modified by serine/threonine protein kinases *in vivo*. Journal of bacteriology. 196(14), 2646–2657.

24. HAZLETT K. R. O., CIRILLO K. A., 2009. Environmental adaptation of *Francisella tularensis*. Microbes and infection. 11(10-11), 828–834.

25. HOLLIS D. G., WEAVER R. E., STEIGERWALD A. G., WENGER J. D., MOSS C. V., BRENNER D. J., 1989. *Francisella philomiragia* comb. *nov*. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. Journal of clinical microbiology. 27(7), 1601-1608.

26. HUBÁLEK Z., HALOUZKA J., 1997. Mosquitoes (Diptera: Culicidae), in contrast to ticks (Acari: Ixodidae), do not carry *Francisella tularensis* in a natural focus of tularemia in the Czech Republic. Journal of medical entomology. 34(6), 660-663.

27. HUBÁLEK Z., SIXL W., HALOUZKA J., 1998. *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks from the Czech Republic and Austria. Wiener klinische Wochenschrift. 110(24), 909-910.

28. HUISMAN O., FAELEN M., GIRARD D., JAFFÉ A., TOUSSAINT A., ROUVIÈRE-YANIV J., 1989. Multiple defects in *Escherichia coli* mutants lacking HU protein. Journal of bacteriology. 171(7), 3704–3712.

29. HWANG D. S., KORNBERG A., 1992. Opening of the replication origin of *Escherichia coli* by DnaA protein with protein HU or IHF. The Journal of biological chemistry. 267(32), 23083–23086.

30. CHAKRABORTY S., MONFETT M., MAIER T. M., BENACH J. L., FRANK D. W., THANASSI D. G., 2008. Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of *pilF* and *pilT* in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. Infection and immunity. 76(7), 2852–2861.

31. CHAMBERLAIN R. E., 1965. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. Applied microbiology. 13(2), 232–235.

32. CHECROUN C., WEHRLY T. D., FISCHER E. R., HAYES S. F., CELLI J., 2006. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 103(39), 14578-14583.

33. CHONG A., CELLI J., 2010. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. Frontiers in microbiology. 1, 138. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2010.00138.

34. INVITROGEN, 2012. TOPO TA cloning kit for sequencing: five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products for sequencing. 30 s.

35. JOHANSSON A., BERGLUND L., GOTHEFORS L., SJÖSTEDT A., TÄRNVIK A., 2000. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. The Pediatric Infectious disease journal. 19(5), 449-453.

36. KANO Y, IMAMOTO F., 1990. Requirement of integration host factor (IHF) for growth of *Escherichia coli* deficient in HU protein. Gene. 89(1), 133-137.

37. KINGRY L. C., PETERSEN J. M., 2014. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida.* Frontiers in cellular and infection microbiology. 4, 35. Dostupné z: doi: 10.3389/fcimb.2014.00035.

38. KUMAR S., SARDESAI A. A., BASU D., MUNIYAPPA K., HASNAIN S. E., 2010. DNA clasping by mycobacterial HU: the C-terminal region of HupB mediates increased specificity of DNA binding. PLoS One. 5(9), e12551. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0012551.

39. LEE B. H., MURUGASU-OEI B., DICK T., 1998. Upregulation of a histone-like protein in dormant *Mycobacterium smegmatis.* Molecular & general genetics. 260, 475-479.

40. LENCO J., LINK M., TAMBOR V., ZAKOVÁ J., CERVENY L., STULIK J., 2009. iTRAQ quantitative analysis of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* live vaccine strain and *Francisella tularensis* ssp*. tularensis* SCHU S4 response to different temperatures and stationary phases of growth. Proteomics. 9(10), 2875-2882.

41. LI S., WATERS R., 1998. *Escherichia coli* strains lacking protein HU are UV sensitive due to a role for HU in homologous recombination. Journal of bacteriology. 180(15), 3750–3756.

42. LIU D., YUMOTO H., MURAKAMI K., HIROTA K., ONO T., NAGAMUNE H., KAYAMA S., MATSUO T., MIYAKE Y., 2008. The essentiality and involvement of *Streptococcus intermedius* histone-like DNA-binding protein in bacterial viability and normal growth. Molecular microbiology. 68(5),1268-1282.

43. MACELA A. A KOL., 2002. Vysoce riziková biologická agens: Úvod do managementu biologických událostí. Praha: Státní úřad pro jadernou bezpečnost: Azin CZ, s.r.o. 137 s. ISBN 80-246-0789-3.

44. MANGAN M. W., LUCCHINI S., Ó CRÓINÍN T., FITZGERALD S., HINTON J. C., DORMAN C.J., 2011. Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. 157, 1075-1087.

45. MANN B. J., ARK N. M., 2009. Rationally designed tularemia vaccines. Expert review of vaccines. 8(7), 877-885.

46. MCCOY G. W., CHAPIN C. W., 1912. Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularense*. The Journal of infectious diseases. 10(1), 61-72.

47. MCLENDON M. K., APICELLA M. A., ALLEN L-A. H., 2006. *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. Annual review of microbiology. 60, 167–185.

48. MICKA B., MARAHIEL M. A., 1992. The DNA-binding protein HBsu is essential for normal growth and development in *Bacillus subtilis*. Biochimie. 74(7-8), 641-650.

49. MILTON D. L., O'TOOLE R., HÖRSTEDT P., WOLF-WATZ H., 1996. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum.* Journal of bacteriology. 178(5), 1310-1319.

50. MOHAPATRA N. P., SONI S., BELL B. L., WARREN R., ERNST R. K., MUSZYNSKI A., CARLSON R. W., GUNN J. S., 2007. Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes. Infection and immunity. 75(7), 3305–3314.

51. NANO E. F., ZHANG N., COWLEY S. C., KLOSE K. E., CHEUNG K. K. M., ROBERTS M. J., LUDU J. S., LETENDRE G. W., MEIEROVICS A. I., STEPHENS G., ELKINS K. L., 2004. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. Journal of bacteriology. 186(19), 6430–6436.

52. NCBI, 2014. HupB DNA-binding protein HU-beta [*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200]. In: National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 16. 2. 2015]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/14009179.

53. OBERTO J., NABTI S., JOOSTE V., MIGNOT H., ROUVIERE-YANIV J., 2009. The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. PLoS One. 4(2): e4367. Dostupné z: doi: 10.1371/journal.pone.0004367.

54. OYSTON P. C. F., 2008. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. Journal of medical microbiology. 57, 921-930.

55. PECHOUS R. D., MCCARTHY T. R., ZAHRT T. C., 2009. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. Microbiology and molecular biology reviews. 73(4), 684–711.

56. PELICIC V., REYRAT J. M., GICQUEL B., 1996. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. Journal of bacteriology. 178(4), 1197-1199.

57. PETTIJOHN D. E., 1988. Histone-like proteins and bacterial chromosome structure. The Journal of biological chemistry. 263(26), 12793-12796.

58. PRIETO A. I., KAHRAMANOGLOU CH., ALI R. M., FRASER G. M., SESHASAYEE A. S. N., LUSCOMBE N. M., 2012. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. Nucleic acids research. 40(8), 3524–3537.

59. SANTIC M., AL-KHODOR S., ABU KWAIK Y., 2010. Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. Cellular microbiology. 12(2), 129-139.

60. SASSETTI CH. M., BOYD D. H., RUBIN E. J., 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Molecular microbiology. 48(1), 77-84.

61. SHEN H., CHEN W., CONLAN J. W., 2004. Mice sublethally infected with *Francisella novicida* U112 develop only marginal protective immunity against systemic or aerosol challenge with virulent type A or B strains of *F. tularensis*. Microbial pathogenesis. 37(2), 107-110.

62. SIMON R., PRIEFER U., PÜHLER A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Nature biotechnology. 1, 784-791.

63. SJÖSTEDT A., 2006. Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. Microbes and infection. 8(2), 561-567.

64. STEINER D. J., FURUYA Y., METZGER D. W., 2014. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. Infection and drug resistance. 7, 239-251.

65. SUTERA V., LEVERT M., BURMEISTER W. P., SCHNEIDER D., MAURIN M., 2014. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 69(1), 101-110.

66. SVENSSON K., LARSSON P., JOHANSSON D., BYSTRÖM M., FORSMAN M., JOHANSSON A., 2005. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. Journal of bacteriology. 187(11), 3903-3908.

67. THE JOURNAL OF UNDERGRADUATE BIOLOGICAL STUDIES, 2010. *Francisella tularensis*. In: Pathogen profile dictionary [online]. [cit. 3. 4. 2015]. Dostupné z: http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/tularensis.htm.

68. TITBALL R. W., SJÖSTEDT A., 2003. *Francisella tularensis*: an overview. ASM News. 69(11), 558-563.

69. TWINE S., BYSTRÖM M., CHEN W., FORSMAN M., GOLOVLIOV I., JOHANSSON A., KELLY J., LINDGREN H., SVENSSON K., ZINGMARK C., CONLAN W., SJÖSTEDT 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. Infection and immunity. 73(12), 8345-8352.

70. WEISCHENFELDT J., PORSE B., 2008. Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications. In: Cold Spring Harbor protocols [online]. [cit. 3. 2. 2015]. Dostupné z: http://cshprotocols.cshlp.org/content/2008/12/pdb.prot5080.full.pdf+html.

71. WHERRY W. B., LAMB B. H., 1914. Infection of man with *Bacterium tularense*. The Journal of infectious diseases. 15(2), 331-340.

72. ZOGAJ X. ET KLOSE K. E., 2010. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. Frontiers in microbiology. 1, 142. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2010.00142.

Seznam obrázků

Obr. 1: Evoluční schéma *F. tularensis* ... 13
Obr. 2: *Francisella tularensis* na různých typech médií ... 15
Obr. 3: Intracelulární cyklus rodu *Francisella* v makrofázích ... 22
Obr. 4: Struktura *Anabaena* HU v komplexu s DNA ... 26
Obr. 5: PCR produkty po elektroforetické separaci ... 57
Obr. 6: Produkt „overlapping" PCR po elektroforetické separaci ... 57
Obr. 7: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pCR4-TOPO-Δ*huB* ... 58
Obr. 8: Linearizovaný plazmidový vektor pDM4 ... 59
Obr. 9: PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D ... 59
Obr. 10: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pDM4-Δ*huB* ... 60
Obr. 11: PCR s primery FTS_0886_A a FTS_0886_D ... 60
Obr. 12: PCR na koloniích *F. tularensis* ... 61
Obr. 13: PCR na koloniích *F. tularensis* ... 62
Obr. 14: Produkt PCR po elektroforetické separaci ... 62
Obr. 15: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R ... 63
Obr. 16: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pCR4-TOPO-*huB* ... 63
Obr 17: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289KmGFP a vektoru pCR4-TOPO-*huB* ... 64
Obr. 18: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R ... 65
Obr. 19: PCR s primery pKK_0886_F a pKK_0886_R ... 65
Obr. 20: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289Km-*huB* ... 66
Obr. 21: PCR na koloniích *F. tularensis* FSC200/Δ*huB* transformovaných vektorem pKK289Km-*huB* ... 67
Obr. 22: Restrikční štěpení plazmidového vektoru pKK289Km-*huB* ... 67
Obr. 23: Intracelulární proliferace kmenů *F. tularensis* ... 68
Obr. 24: Vliv delece genu *huB* na růst *Francisella tularensis* ... 70

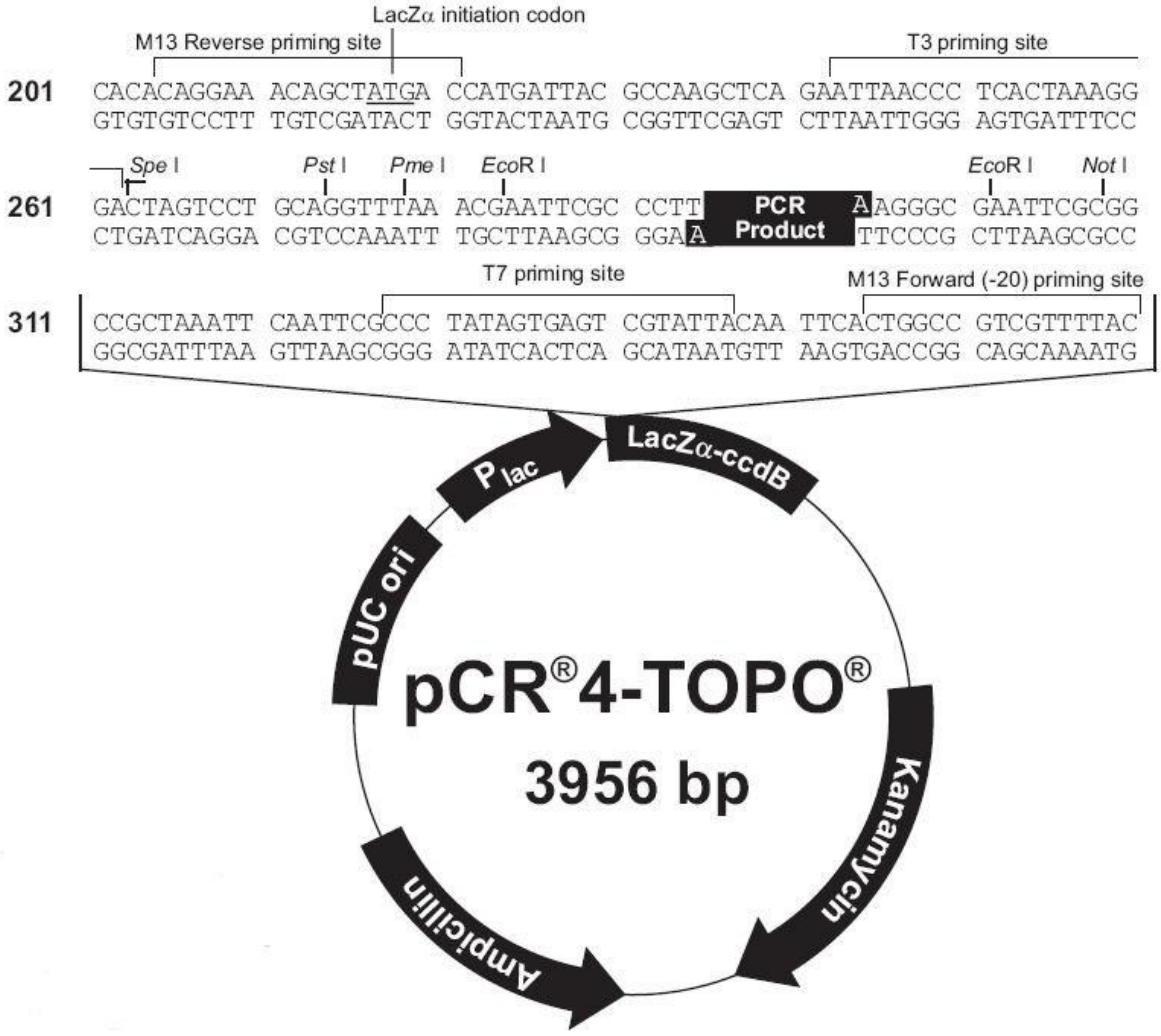
Seznam tabulek

Tab. 1: Virulence biotypů *F. tularensis* ... 13
Tab. 2: Přehled obecných charakteristik genomů kompletně osekvenovaných kmenů *F. tularensis* ... 14
Tab. 3: Chemikálie pro přípravu jednotlivých roztoků Chamberlainova média ... 35
Tab. 4: Doplňky roztoků Chamberlainova média ... 35
Tab. 5: Rozpoznávací sekvence a místa štěpení použitých enzymů ... 38
Tab. 6: Reakční směs pro restrikční štěpení DNA ... 39
Tab. 7: Navržené primery pro PCR amplifikace ... 40
Tab. 8: Složení PCR směsi za použití *Pfu* polymerázy ... 40
Tab. 9: Nastavení podmínek PCR za použití *Pfu* polymerázy ... 41
Tab. 10: Složení reakční směsi pro přidání 3'-A přesahů ... 42

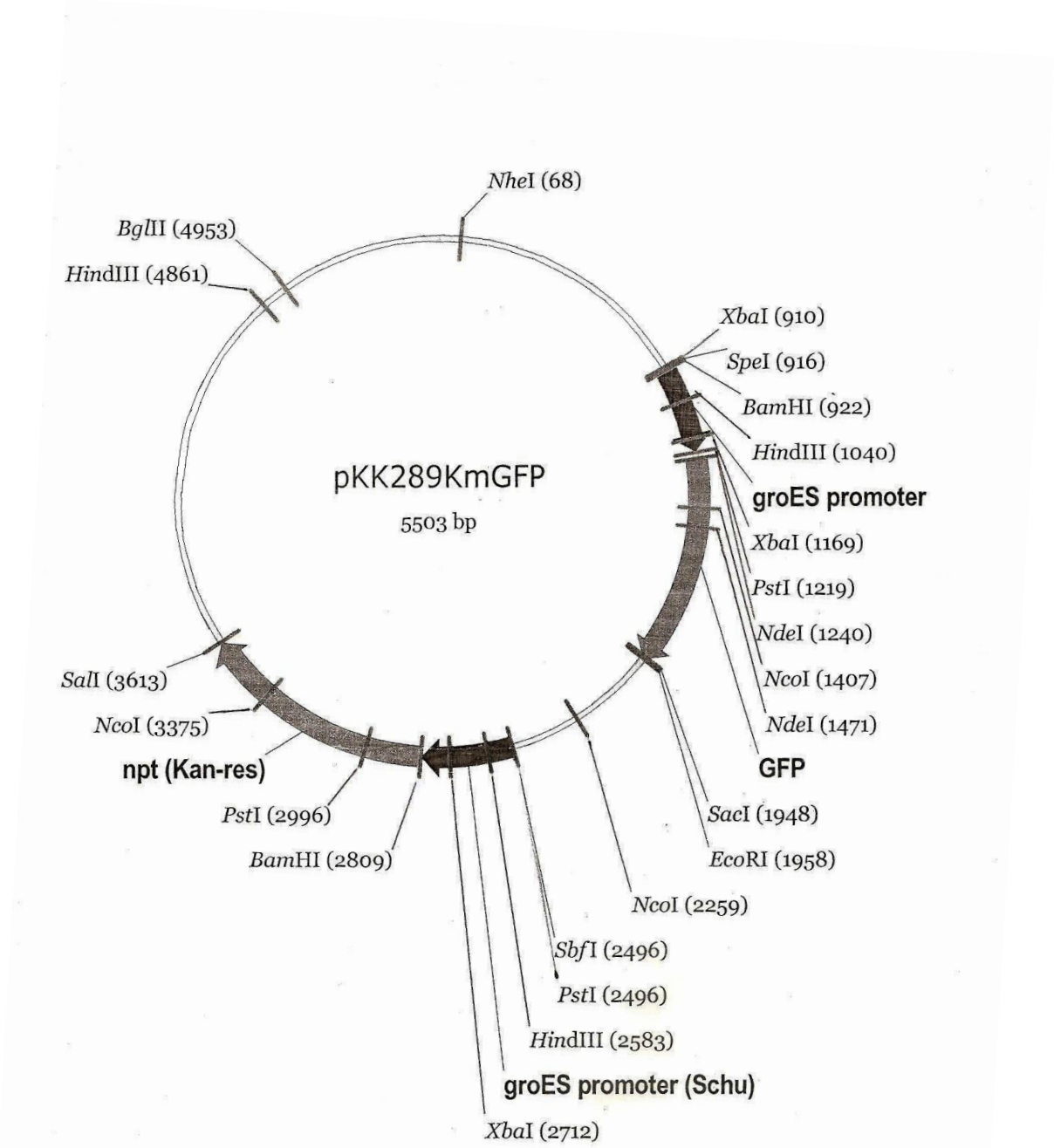
Tab. 11: Reakční směs pro TOPO TA klonování 42
Tab. 12: Složení PCR směsi za použití Quick-Load *Taq* 2X Master Mix 43
Tab. 13: Nastavení podmínek PCR za použití Quick-Load *Taq* 2X Master Mix..... 43
Tab. 14: Sekvence univerzálních sekvenačních primerů 44
Tab. 15: Složení ligační směsi 44
Tab. 16: Ředění buněčných suspenzí delečního, *trans* komplementovaného a divokého kmene *F. tularensis* pro odečet CFU..... 53
Tab. 17: Aplikované dávky testovaných kmenů *F. tularensis*..... 54

Přílohy

Příloha č. 1



Příloha 1: Mapa plazmidu pCR4-TOPO (Invitrogen, 2012)



Příloha 2: Mapa plazmidu pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008)