

Univerzita Hradec Králové  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra biologie

**Studium potencionálních faktorů virulence  
bakterie *Francisella tularensis***

Diplomová práce

Autor: Bc. Pavla Stojková  
Studijní program: N 1501 Biologie  
Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Vedoucí práce: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.  
Oponent: RNDr. Alena Fučíková, Ph.D.

Hradec Králové

červen 2015

**Univerzita Hradec Králové**  
Přírodovědecká fakulta

**Zadání diplomové práce**

<b>Autor:</b>	<b>Bc. Pavla Stojková</b>
Studijní program:	N 1501 Biologie
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Název práce:	Studium potencionálních faktorů virulence bakterie <i>Francisella tularensis</i>
Název práce v AJ:	Study of <i>Francisella tularensis</i> potential virulence factors
Cíl a metody práce:	Práce je zaměřena na studium mírně virulentního evropského kmene <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200. Cílem práce je konstrukce mutantních kmenů pomocí delece vybraných genů této patogenní bakterie. Mutantní kmeny budou následně testovány v <i>in vitro</i> a <i>in vivo</i> systémech za účelem sledování vlivu mutace potencionálních virulenčních faktorů na intracelulární růst a virulenci bakterie.
Garantující pracoviště:	Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany
Vedoucí práce:	RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.
Oponent:	RNDr. Alena Fučíková, Ph.D.
Datum zadání práce:	20.11.2013
Datum odevzdání práce:	

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne

podpis:

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat zejména vedoucí mé diplomové práce **RNDr. Petře Špidlové, Ph.D.** za její podporu a mnoho cenných rad a připomínek při vedení diplomové práce. Dále patří dík všem pracovníkům Katedry molekulární patologie a biologie FVZ UO, kteří mi umožnili pracovat v laboratořích tohoto pracoviště. Také bych chtěla poděkovat vedoucímu Katedry biologie PřF UHK Doc. RNDr. Františku Malířovi, Ph.D. a odbornému asistentovi Ing. Vladimíru Dvořákovi, Ph.D. za podporu a umožnění externího zpracování diplomové práce.

Anotace práce:

**STOJKOVÁ, P. *Studium potencionálních faktorů virulence bakterie Francisella tularensis*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí diplomové práce Špidlová Petra.**

Práce je zaměřena na studium potencionálních faktorů virulence v mírně virulentním evropském kmeni *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Kandidátní geny pro cílenou mutagenezi byly vybrány na základě proteomických studií provedených na Ústavu molekulární patologie FVZ UO. Mutantní kmeny, připravené v rámci této práce, budou v budoucnu testovány v systémech *in vitro* a *in vivo* za účelem sledování vlivu mutace na virulenci bakterie.

**Klíčová slova**

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, virulence, FSC200, mutageneze

## Annotation

**STOJKOVÁ, P. *Study of Francisella tularensis potential virulence factors* . Hradec Králové, 2015. Diploma thesis at Faculty of Biology University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Špidlová Petra.**

The thesis is focused on the study of potential virulence factors in a mild virulent European strain *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. The candidate genes for the targeted mutagenesis were chosen on the basis of proteomic studies performed at Institute of Molecular Pathology at University of Defence, Faculty of Military Health Sciences. Hereafter, the mutant strains 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.

## Keywords

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, virulence, FSC200, mutagenesis

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Úvod a cíle práce</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Teoretická část</b> .....	<b>15</b>
2.1. Charakteristika <i>Francisella tularensis</i> .....	15
2.1.1. Bakteriální struktura .....	15
2.1.2. Ekologie.....	16
2.1.3. Taxonomie .....	16
2.2. Virulence <i>Francisella tularensis</i> .....	17
2.2.1. Lipopolysacharid .....	18
2.2.2. Intracelulární replikace.....	18
2.2.3. Regulace apoptózy.....	20
2.2.4. Ostrov patogenity .....	20
2.3. Imunita .....	22
2.3.1. Vrozená imunita .....	22
2.3.2. Adaptivní imunita .....	23
2.4. <i>F. tularensis</i> jako biologická zbraň .....	24
2.5. Tularémie.....	24
2.5.1. Klinické projevy nákazy.....	25
2.5.2. Léčba .....	26
2.6. Genetické manipulace .....	26
2.7. Diagnostika .....	28
2.8. Vakcína.....	29
2.9. Sledované kandidátní geny virulence .....	30
2.9.1. Glutamát-dehydrogenáza.....	30
2.9.2. Exopolyfosfatáza .....	32
<b>3. Experimentální část</b> .....	<b>34</b>
3.1. Materiál .....	34
3.2. Metody .....	40
3.2.1. Návrh primerů .....	40
3.2.2. Gelová elektroforéza .....	41

3.2.3.	Kultivace bakteriálních kultur <i>F. tularensis</i> a <i>E. coli</i> .....	42
3.2.4.	Příprava zásobních zmražených kultur .....	42
3.2.5.	Izolace chromozomální DNA .....	42
3.2.6.	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA .....	43
3.2.7.	Restrikční štěpení .....	43
3.2.8.	PCR reakce .....	45
3.2.9.	Klonování .....	47
3.2.10.	Izolace DNA z agarózového gelu .....	49
3.2.11.	Příprava chemokompetentních buněk .....	50
3.2.12.	Izolace plazmidové DNA .....	50
3.2.13.	Konjugace <i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ pir s <i>F. tularensis</i> FSC200 .....	51
3.2.14.	Sacharózová selekce .....	52
3.2.15.	Infekce myši typu BALB/c .....	53
3.2.16.	Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů .....	53
3.2.17.	Proliferace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 a mutantních kmenů v primárních kostně dřeňových makrofázích .....	54
3.2.18.	Měření růstové křivky .....	56
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>57</b>
4.1.	Izolace chromozomální DNA .....	58
4.2.	Amplifikace fragmentů AB a CD .....	58
4.3.	Amplifikace AD fragmentů .....	59
4.4.	TOPO klonování .....	60
4.5.	Příprava vektoru ADpDM4 a transformace ADpDM4 do <i>E. coli</i> NEB Turbo ..	61
4.6.	Transformace ADpDM4 do <i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ pir .....	63
4.7.	Konjugace a ověření mutantních kmenů <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200. ....	64
4.8.	Růstová křivka .....	67
4.9.	Infekce myši typu BALB/c bakteriemi <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 a mutantními kmeny .....	69
4.10.	Proliferace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 a mutantních kmenů v BMMs .....	70
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>77</b>



<b>Seznam použité literatury.....</b>	<b>78</b>
<b>Přílohy .....</b>	<b>99</b>
Seznam obrázků .....	99
Seznam tabulek .....	99
Seznam grafů .....	100

## Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
ADpDM4	Plazmidový vektor pDM4 nesoucí AD fragment
ATP	Adenosintrifosfát
BALB/c	Bílé laboratorní myši typu c (H. J. Bagg, Albine Laboratory-bred strain of mouse)
BMMs	Bone Marrow-Derived Macrophages
BSA	Bovine Serum Albumin
CD4 <sup>+</sup>	Povrchové glykoproteiny T-lymfocytů
CD8 <sup>+</sup>	Povrchové glykoproteiny T-lymfocytů
CFU	Počet bakterií tvořící kolonii (Colony Forming Unit)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Imuno-enzymatická metoda pro detekci antigenů (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)
<i>F. tularensis</i>	<i>Francisella tularensis</i>
FCV	Membránový útvar ( <i>Francisella</i> containing Vacuole)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FPI	Ostrov patogenity bakterie <i>F. tularensis</i> ( <i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
FSC198	Kmen <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>
FSC200	Kmen <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> ( <i>Francisella</i> Collection Strain)
FTL	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> , kmen LVS
FTN	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> (nověji <i>Francisella novicida</i> )
FTT	<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany
GDH	Glutamát dehydrogenáza
GOGAT	Glutamát syntáza
GS	Glutamin syntetáza

HeLa buňky	Lidské nádorové buňky pocházející od Henrietty Lacks
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanosulfonová kyselina (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
CHAB agar	Krevní čokoládový agar pro kultivaci <i>F. tularensis</i> (Cysteine Heart Agar with Chocolatized Blood)
IFN- $\gamma$	Interferon gama
kb	Kilobáze
kDa	Kilodalton
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
KDO	Keto-deoxyoctulosonát
LB	Luria Bertani
LC3	Signální protein pro autofágii (Light Chain 3)
LPS	Lipopolysacharid
LVS	Živý vakcinační kmen (Live Vaccine Strain)
MD-2	Povrchový protein receptorů TLR4
MHC II	Hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)
MOI	Hodnota MOI udává počet bakterií na 1 buňku (multiplicity of infection)
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamidadeninukleotidfosfát oxidovaná forma
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát redukováná forma
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH <sub>3</sub>	Amoniak
NK	Buňky imunitního systému (Natural Killers)
OD	Optická denzita
OSU18	Kmen <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
<i>Pfu</i>	Enzym z <i>Pyrococcus furiosus</i>
PGE2	Protizánětlivý cytokinin (Prostaglandin E2)
Pi	Fosfát
PPX	Exopolyfosfatáza

pUC	Plazmid (Plasmid of University of California)
RNA	Ribonuklová kyselina
<i>SacI</i>	Enzym z <i>Streptomyces achromogenes</i>
SCHU S4	Kmen <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i>
SOC	Růstové médium pro bakterie (Super Optimal broth with Catabolite repression (SOB médium s přídáním glukózy))
TAE	Elektroforetický pufr obsahující Tris, kyselinu octovou (Acetic acid) a EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)
<i>Taq</i>	Enzym z <i>Thermus aquaticus</i>
TGF- $\beta$	Protizánětlivý cytokinin (Transforming Growth Factor beta)
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	Faktor nádorové nekrózy (Tumor Necrosis Factor alpha)
U112	Kmen <i>F. novicida</i>
USA	Spojené státy americké (United States of America)
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
<i>XhoI</i>	Enzym z <i>Xanthomonas holcicola</i>

# 1. Úvod a cíle práce

Patogenní bakterie představují vysoké riziko šíření nebezpečných infekčních chorob. V rámci genetického zbrojení organismů získávají bakterie stále větší rezistenci na antibiotika a dochází tak k jejich zvýšené životaschopnosti v životním prostředí. V současné době probíhají intenzivní výzkumy těchto patogenů se snahou identifikovat virulenční faktory a vyvinout tak vakcínu či léčebné prostředky na nemoci jimi způsobenými. Výzkumy jsou také podpořeny faktem, že lze některé z těchto infekčních organismů použít jako biologickou zbraň k cílené nákaze většího množství lidí, což je potvrzeno i historickou skutečností. Vzhledem k současnému rozvoji infrastruktury, četnosti dopravních prostředků a volnému pohybu lidí napříč světadíly, představuje použití biologických zbraní extrémní riziko vzniku pandemie.

*F. tularensis* je patogenní gram-negativní bakterie, která způsobuje onemocnění zvané tularémie. Cílovým hostitelem jsou zvířata, ale může nakazit i člověka. Vzhledem k její vysoké schopnosti infikovat cílový organismus, snadnému šíření a četnému rezervoáru v přírodě představuje potencionální biologickou zbraň (Darling et al., 2002). Mechanismy, které tato bakterie vyvinula pro svoji prosperitu, představují hlavní příčinu její patogeneze. Schopnost intracelulární replikace, odolávání imunitnímu systému hostitele a sekrece specifických proteinů patří mezi hlavní předmět zájmu při výzkumu mechanismů virulence této bakterie.

Tularémie je závažné zoonotické onemocnění. Vyskytuje se v různých formách, v závislosti na vstupu infekce do organismu. Pro vypuknutí onemocnění postačí méně jak 10 bakterií, což je srovnatelné s tuberkulózou, kdy postačí taktéž méně jak 10 bakterií *Mycobacterium tuberculosis* (Riley, 1957). Tularémie může mít fatální následky v případě nezahájení léčby antibiotiky, a to až ve 30 - 60 % případů (Saslaw et al., 1961).

Metody molekulární genetiky a proteomiky umožňují detekovat a analyzovat potencionální virulenční faktory. Tyto poznatky mohou vést v budoucnosti k vytvoření vakcíny a léčebných prostředků proti tularémii. Bylo zjištěno, že geny, které kódují virulenční proteiny, se nacházejí v tzv. ostrovu patogenity (Nano et al., 2004). Studium mutantních kmenů, u kterých byly inaktivovány geny z ostrova patogenity, bylo prokázáno, že jsou nezbytné pro intracelulární růst (Gray et al., 2002; Golovliov et al., 2003; Nano et al., 2004). Metoda inaktivace genů je využívána pro studium dalších genů, které by mohly být nezbytné pro růst nebo virulenci *F. tularensis*. Kandidátní geny virulence jsou identifikovány na základě proteomických analýz, které detekovaly např. zvýšenou sekreci určitých proteinů při infekci hostitelské buňky.

Cílem této diplomové práce je studium potencionálních faktorů virulence *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Metodou inaktivace kandidátních genů, které byly vybrány na základě proteomických studií provedených na Ústavu molekulární patologie (nyní Katedra molekulární patologie a biologie) FVZ UO, byla zjišťována nezbytnost těchto genů pro růst bakterie. Dalším cílem práce bylo sledování vlivu mutace na virulenci bakterie pomocí testování mutantních kmenů v *in vitro* a *in vivo* systémech. Poznatky získané v této práci přispívají k celkovému studiu virulence

bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a mohou být v budoucnu využity k dalšímu studiu této patogenní bakterie.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Charakteristika *Francisella tularensis*

*Francisella tularensis* je gram-negativní, aerobní, fakultativně intracelulární bakterie, která je původcem onemocnění zvaného tularémie (McCoy et Chapin, 1912). Je to bakterie tyčinkovitého tvaru, která netvoří spory. Je velká 0,4-0,6 µm na šířku a 0,8-1 µm na délku. Je kultivačně náročná, vyžaduje přítomnost železa a sloučenin obsahujících -SH skupiny (např. cystein nebo thioglykolát sodný) (Macela, 2003). Dnes se kultury *F. tularensis* kultivují v komerčně připravených médiích, obsahujících pepton, glukózu a ovčí nebo koňskou krev. Vhodné médium může představovat i čokoládový agar, neboť také obsahuje cystein. *Francisella* je laboratorně citlivá na podmínky. Var ničí buňky téměř okamžitě, desinfekce účinkují do 30 minut, alkohol do 5 minut. Chlór a UV záření usmrcují buňky okamžitě. Ve vodě (4 °C) dokáže *Francisella* přežít až 4 měsíce (Libich, 1981).

#### 2.1.1. Bakteriální struktura

Buněčná stěna gram-negativních bakterií se skládá z vrstvy peptidoglykanů a vnější membrány. Vnější membrána je složená z fosfolipidů a lipopolysacharidové vrstvy (Malý, 2005). Lipopolysacharid (LPS) se sestává z centrálního polysacharidu, O-antigenu a lipidu A. Peptidoglykanová vrstva je spojena pomocí lipoproteinů s vnější membránou (McLendon et al., 2006). O-antigen *F. tularensis* subsp. *tularensis* a *F. tularensis* subsp. *holarctica* je totožný, na rozdíl od O-antigenu *F. novicida* (Prior et al., 2003). Lipopolysacharid (nazýván také endotoxin), jak již bylo řečeno, je hlavní složkou vnější membrány gram-negativních bakterií. Interakce komplexu LPS s povrchovým proteinem MD-2 receptorů TLR4 (toll-like receptor 4), které se nacházejí na povrchu makrofágů, zajišťuje spuštění protizánětlivé reakce prostřednictvím cytokinů (Raetz et Witfield, 2002).

Pili na povrchu prokaryotních buněk jsou krátké filamentární struktury skládající se z proteinů (Malý, 2005). Na povrchu *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4 byly detekovány pili typu IV a pomocí mikroskopie se ukázalo, že se tyto struktury podobají strukturám, které se nacházejí na povrchu *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Tyto pili slouží k uchycení k hostitelské buňce, výměně DNA, trhavému pohybu a tvorbě biofilmu. Hromadí se důkazy z mnoha studií naznačujících, že pili typu IV jsou nutné pro patogenitu *F. tularensis*. Nicméně molekulární mechanismy, kterými tyto složky ovlivňují virulenci, zůstávají z velké části neznámé (Salomonsson et al., 2009).

Divoké kmeny *F. tularensis* a kmen LVS (u druhů *F. novicida* a *philomiragia* nebyla přítomnost kapsuly prokázána) mají na svém povrchu exopolysacharidovou kapsulu. Kapsula slouží k ochraně bakterie před účinky komplementu (součást nespecifické humorální imunitní odpovědi) (Sandstrom et al., 1988). V roce 1970 bylo pomocí biochemických studií zjištěno, že kapsula kmene SCHU S4 obsahuje karbohydráty (manóza, ramnóza, a dva nedefinovatelné dideoxy cukry). Bylo zjištěno,

že bakterie s odstraněnou kapsulou ztratily svoji virulenci (Hood, 1977). Role kapsuly ve virulenci bakterie je stále předmětem výzkumu.

### 2.1.2. Ekologie

Přírodní rezervoár *F. tularensis* není znám tak dobře jako u jiných patogenů. Tento zoonotický patogen byl objeven u řady teplokrevných i studenokrevných živočichů, jako jsou například savci, hmyz, členovci a vodní prvoci (Oyston et al., 2004). *F. tularensis* subsp. *tularensis*, poprvé popsána v Severní Americe, byla objevena hlavně u zajícovitých a hlodavců. Mezi další napadané druhy patří hmyzožravci, šelmy, kopytníci, vačnatci, ptáci, obojživelníci a ryby. Ve vodním cyklu hrají důležitou roli bobří, ondatry, hraboši a druhy ze skupiny *Protozoa* (Abd et al., 2003). Zástupci ze skupiny členovců, jako jsou například klíš'ata, kousající mouchy a komáři, představují dlouhodobý rezervoár této nemoci a působí jako přenašeče (Bell, 1977).

Hlavním přenašečem poddruhu *tularensis* jsou klíš'ata a kousající mouchy. Poddruh *holarctica* je rozšířen na celé severní polokouli a má větší zastoupení ve vodním cyklu bakterie. Hlavním přenašečem poddruhu *holarctica* jsou komáři, v druhé řadě také klíš'ata a kousající mouchy (Abd et al., 2003). Druh *novicida* je spíše vzácný, může se nacházet ve vodě a je oportunistickým patogenem člověka (Oyston et al., 2004). Bakterie, jak již bylo zmíněno, může přežít ve vodě, ale hlavním prostředím pro její přežití a replikaci je intracelulární prostředí, kde napadá fagocytující buňky a je schopna se v nich množit (Chong et al., 2008). Přežívání *F. tularensis* subsp. *holarctica* ve vodě bylo prokázáno nálezem v *Acanthamoeba castelanii* (Abd et al., 2003), nicméně přežívání této bakterie ve vodě může být způsobeno i v návaznosti na komáry, jež jsou přenašeči tohoto patogenu.

Ve střední Evropě představují klíš'ata *Dermacentor reticulans* a *Ixodes ricinus* velmi významné přenašeče. V České Republice bylo zjištěno, že až 2,8 % *D. reticulans* obsahuje bakterii *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Hubálek et al., 1998).

### 2.1.3. Taxonomie

*Francisella tularensis* byla objevena v roce 1911 v rámci vypuknutí moru u syslů, kdy tento patogen nově popsal McCoy a Chapin (McCoy et Chapin, 1912). Tato bakterie se může v přírodě vyskytovat dlouhou dobu, se schopností infikovat člověka (McLendon et al., 2006).

McCoy a Chapin (1912) izolovali novou bakterii, která dostala jméno po Kalifornském okresu Tulare - *Bacterium tularense*. Nicméně, v roce 1919 izoloval Edward Francis tuto bakterii z krve těžce nemocných pacientů a provedl značné studie, kdy pozoroval patologické změny u morčat a králíků. Francis získal kulturu bakterií a vyvinul diagnostické metody pro detekci tularémie (Francis, 1922). Na počest Edwarda Francise byla *Bacterium tularense* přejmenována na *Francisella tularensis* (Dorofe'ev, 1947). *Francisella tularensis* byla původně zahrnuta v rodu *Bacterium*, později v rodu *Pasteurela* a následně v rodu *Brucella* (Owen, 1974).



Nedávné detailní analýzy *Yersinia philomiragia* odhalily, že struktura a postavení mastných kyselin je typické pro rod *Francisella*. Navíc struktura DNA kmene *Yersinia philomiragia* vykazuje velkou podobnost s DNA rodu *Francisella*. Proto byla tato bakterie přejmenována a zahrnuta do rodu *Francisella* jako *Francisella philomiragia* (Hollis et al., 1989). Nejvíce příbuzným druhem je *Wolbachia persica*, která je endosymbiotickou bakterií klíšťat.

*Francisella* je jediný rod z čeledi *Francisellaceae* a zahrnuje tři subtypy: *F. tularensis*, *F. novicida* a *F. philomiragia*. Dále existují tři úzce příbuzné poddruhy *F. tularensis*, jejichž genom je vysoce konzervovaný, avšak liší se svou virulencí. Jedná se o poddruh *tularensis* (typ A), *holarctica* (typ B) a *mediasiatica* (Larsson et al., 2009). Infikovat člověka mají schopnost poddruhy *tularensis*, *holarctica* a *mediasiatica*, avšak letální případy jsou známy u *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. Druh *novicida* může způsobovat infekci pouze u imunitně oslabených druhů (Titball et al., 2003). Od roku 1911, kdy byla bakterie objevena v Kalifornii, byla nalezena i v dalších zemích, jako je například Švédsko, Finsko, Česká Republika, Slovensko, Rusko, Kazachstán, Uzbekistán a Japonsko. *F. tularensis* subsp. *tularensis* je rozšířena hlavně v Severní Americe a Mexiku, poddruh *holarctica* je lokalizován v Evropě, Kazachstánu, Severní Americe a na Blízkém Východě, poddruh *mediasiatica* se nachází hlavně ve Střední Asii a druh *novicida* v Severní Americe a Austrálii (Oyston et al., 2004).

Na základě projektu sekvenování genomu *Francisella tularensis* byly popsány různé genomy bakteriálních kmenů *F. tularensis*, mezi něž patří např. kmen SCHUS4 (*F. tularensis* subsp. *tularensis*), LVS (*F. tularensis* subsp. *holarctica*), OSU18 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) FSC200 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*), FSC198 (*F. tularensis* subsp. *tularensis*), a také *F. novicida* U112 (Larsson et al., 2005). Kmen FSC200 byl izolován v Evropě, zatímco kmen OSU18 byl izolován ve Spojených Státech Amerických. Mezi těmito kmeny byla zjištěna odlišnost genomu pouze 0,08 %, zatímco mezi kmeny LVS a SCHUS4 byla odlišnost genomu 0,7 %. Na základě identifikace polymorfismů v genomu bakterie bylo izolováno již 40 různých kmenů. Třináct kmenů podruhu *holarctica* (typ B), 26 kmenů podruhu *tularensis* (typ A) a 1 kmen *F. novicida* (Pandya et al., 2009)

## 2.2. Virulence *Francisella tularensis*

*F. tularensis* je považována za velmi nebezpečný patogen, neboť vyvinula mechanismy jak účinně infikovat hostitelský organismus a zároveň odolávat jeho imunitnímu systému. Významným virulenčním mechanismem je intracelulární replikace uvnitř fagocytujících buněk, dále pak specifická stavba buněčné stěny obsahující LPS a v neposlední řadě virulenční proteiny, které jsou zakódovány v tzv. ostrovu patogenity. Míra virulence bakterie je také závislá na schopnosti ovlivňovat imunitní systém a blokovat jeho funkci. Zmíněné mechanismy virulence budou popsány v následujících kapitolách.

K dalším virulenčním faktorům patří prokazatelně kapsula bakterie, jež se skládá hlavně z lipidů (Hood, 1977). Výzkumy, kde byly vytvořené mutantní kmeny bez kapsuly dokazují, že byly tyto kmeny avirulentní (Sandström et al., 1988).

### 2.2.1. Lipopolysacharid

Lipopolysacharid je molekula, která je přítomna v bakteriální stěně všech gram-negativních bakterií. Jak již bylo řečeno, skládá se z lipidu A, oligosacharidového jádra a O-antigenu (též O-polysacharid) (Raetz et Whitfield, 2002). V porovnání s jinými gram-negativními bakteriemi byly nalezeny značné rozdíly ve stavbě LPS. Struktura lipidu A se značně liší v přítomnosti fosfátových skupin, které ovlivňují celkový náboj struktury. Absence těchto negativně nabitých částic významně ovlivňuje (má pozitivní vliv) odolnost bakterie na antimikrobiální peptidy vylučované hostitelem (Schilling et al., 2007). Dalším rozdílem ve struktuře lipidu A od ostatních gram-negativních bakterií je délka a počet acylových řetězců v molekule. Lipid A v LPS rodu *Francisella* má čtyři dlouhé acylové řetězce, na rozdíl od ostatních gram-negativních bakterií, které mají šest krátkých acylových řetězců (Okan et Kasper, 2013).

Lipid A je k oligosacharidovému jádru vázán pomocí jednotek KDO (keto-deoxyoctulosonate). *Francisella* má pouze jednu jednotku KDO, na rozdíl od jiných gram-negativních bakterií, které jich mají více, nejčastěji dvě. Přítomnost pouze jedné KDO byla prokázána také u jiných patogenních bakterií, jako je například *Bordetella pertussis* (Isobe et al., 1999) nebo *Haemophilus influenzae* (Brabetz et al., 2000). Ve skutečnosti bylo zjištěno, že má *Francisella* dvousložkový hydrolytický KDO systém (zajištěno expresí genů *kdhA* a *kdhB*), tzn., že vytvoří dvě KDO jednotky a jedna je poté rozštěpena. Stejný systém byl prokázán u patogenů *Helicobacter pylori* a *Legionella pneumophilla* (Chalabaev et al., 2010). Mutantní kmen *kdhAB* rodu *Francisella* nebyl schopen štěpit druhou jednotku KDO a ve výsledku byla jeho proliferace v myších oslabena (Okan et al., 2013).

O-antigen hraje velkou roli ve schopnosti odolávání proti séru hostitele. Bylo prokázáno, že mutantní kmeny *F. tularensis* v genu *wzy* (O-antigen polymeráza), které postrádají O-antigen, jsou velice citlivé na účinky séra (Raynaud et al., 2007).

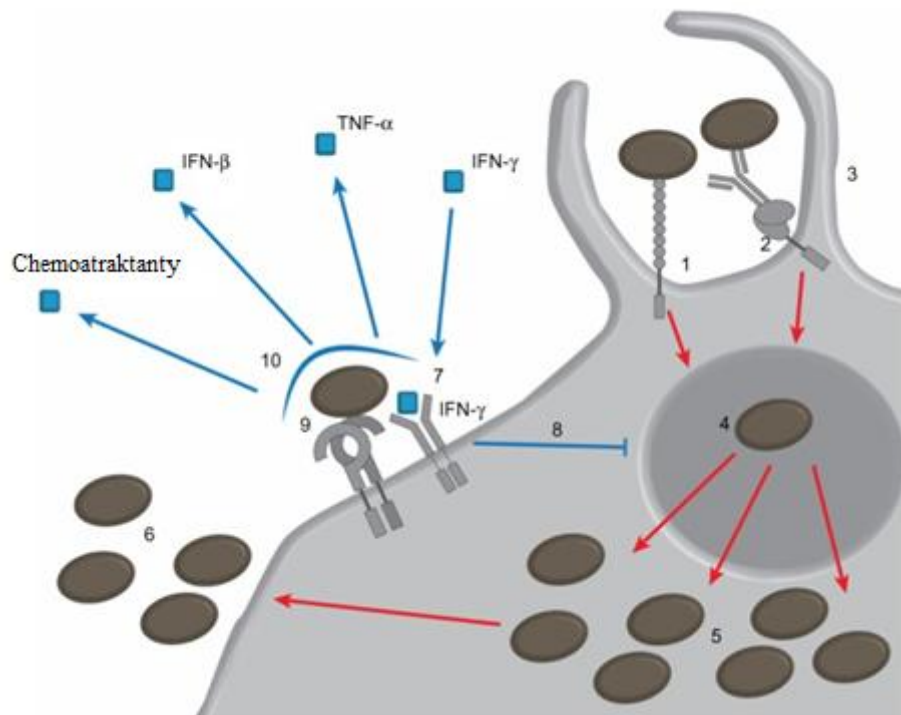
V souvislosti s LPS a jeho významností ve virulenci bakterie hraje podstatnou roli *valA* gen, který kóduje ABC přenašeč. Tento přenašeč zastává hlavní roli v transportu LPS do vnější membrány (McDonald et al., 1997). Po inaktivaci tohoto genu u *F. novicida* došlo k neschopnosti růstu bakterie uvnitř makrofágů a zároveň byla zaznamenána vyšší citlivost k séru (Mdluli et al., 1994).

### 2.2.2. Intracelulární replikace

*Francisella tularensis* je intracelulární patogen. Že je tato bakterie schopná se množit uvnitř buněk dokládá studie z roku 1941, kdy bylo infikováno touto bakterií kuřecí embryo (Buddingh et Womack, 1941). Později byla tato skutečnost testována na HeLa buňkách (Shepard, 1959). Poté byly pro tyto výzkumy používány makrofágy (Fortier et al., 1995). Pro vstup bakterie do buňky může být využito různých povrchových receptorů, jako jsou například manózoové receptory, Fc receptory či další doplňkové receptory (Clemens et al., 2005). *F. tularensis* přežívá fagocytózu díky mechanismům, které zabraňují dozrávání fagosomu, který by se za normálních okolností spojil s lysosomem a nežádoucí částice by byly rozloženy. Tyto mechanismy spočívají hlavně v

zabránění acidifikace fagosomu. Následně je schopna bakterie fagosom opustit a uniknout do cytoplazmy makrofágů (Clemens et al., 2004). V cytoplasmě je *Francisella* schopna se opět replikovat. Replikační proces je ukončen vyvoláním apoptózy makrofágu a unikem bakterie do extracelulárního prostoru, kde je schopna infikovat další makrofágy (Obr. 1) (Lai et al., 2001).

Část cytoplazmatických bakterií se uzavře do membránového útvaru, tzv. FCV (*Francisella*-containing vacuole). Na povrchu této membrány se nacházejí specifické bílkoviny LC3, což jsou signální proteiny pro proces autofágie. Autofágie je vnitrobuněčný proces, jehož cílem je udržet buněčnou homeostázu. Tento proces je součástí obranných mechanismů hostitelské buňky proti nežádoucím strukturám, jako jsou patogeny. Vakuoly s *Francisellou* (FCV) jsou uzavřeny do membránových váčků, tzv. autofagosomů. Tyto autofagosomy interagují s lysosomy, které by měly zajišťovat zničení nežádoucích částic (Levine et al., 2011). Prostřednictvím autofágie se některé bakterie *F. tularensis* dostávají do autofagosomů, nicméně nedochází k jejich zničení (Checroun et al., 2006). Poslední studie naznačují, že díky tomuto procesu získává bakterie potřebné látky (energii) pro svůj intracelulární růst (Steele, 2013).



Obrázek 1: Schéma intracelulárního růstu *F. tularensis* v makrofágu (Steiner et al., 2014)

*F. tularensis* (hnědě) se váže na buněčný povrch prostřednictvím manózoového receptoru (1) nebo Fc receptoru (2). Bakterie se do buňky dostává prostřednictvím fagocytózy (3) a úspěšně přežívá díky bránění zrání fagosomu (4). Poté, co *Francisella* unikne do cytosolu buňky, úspěšně proliferuje (5). Bakterie vyvolá apoptózu makrofágu a dostává se do extracelulárního prostředí (6). Pokud je buňka vystavena expozici IFN- $\gamma$  (7), může dojít k omezení intracelulární replikace bakterie (8). Stimulace Toll-like receptorů a stimulace IFN- $\gamma$  (9) může vést k sekreci zánětlivých cytokinů a chemoatraktantů (10).

Dodnes byla vytvořena celá řada mutantních kmenů, u kterých byla testována virulence a schopnost intracelulární replikace. Inaktivace některých genů, zejména pak z ostrova patogenity, prokázala jejich nezbytnost pro intracelulární replikaci, ale mutantní kmeny s inaktivovanými geny mohou být i důkazem toho, že geny kódující důležité enzymatické dráhy intracelulární replikaci neovlivňují.

Intracelulární replikaci také ovlivňují kyselé fosfatázy (AcpABC) tím, že napomáhají fagosomálnímu úniku (Dai et al., 2012).

Pro intracelulární růst bakterie je nezbytné železo (Fortier et al., 1995). Experimentálně bylo zjištěno, že koncentrace železa v růstovém médiu významně ovlivňuje expresi genů nacházejících se v ostrovu patogenity (Nano et Schmerk, 2007). Nicméně, vysoký obsah železa může paradoxně zapříčinit vyšší náchylnost k intracelulárnímu zneškodňování pomocí reaktivních forem kyslíku (Lindgren et al., 2011).

### 2.2.3. Regulace apoptózy

Díky apoptóze hostitelské buňky se *Francisella* dostává do mimobuněčného prostoru, kde napadá další makrofágy, případně jiné fagocytující buňky. Apoptóza buňky je vyvolána pomocí proteáz, které specificky štěpí peptidovou vazbu. Tyto látky, kaspázy, jsou součástí apoptotických drah, vedoucích k buněčné smrti (Shi, 2002). Bylo prokázáno, že buněčná smrt makrofágů, infikovaných *F. tularensis*, je zprostředkována mitochondriální apoptotickou drahou. Na základě apoptotických signálů dochází k uvolňování cytochromu C z mitochondrií do cytosolu, což vede k aktivaci celé řady kaspáz. Bylo prokázáno, že apoptóza buněk infikovaných *F. tularensis*, byla zprostředkována kaspázou 3 a kaspázou 9. Schopnost bakterie vyvolat buněčnou smrt spočívá v její schopnosti aktivovat tyto apoptotické kaspázy (Lai et Sjöstedt, 2003).

### 2.2.4. Ostrov patogenity

Významné místo v genomu bakterie pro intracelulární růst a virulenci je tzv. ostrov patogenity (FPI), oblast, která kóduje sekreční systémy. Je to oblast zhruba 30 kb velká a geny v této oblasti jsou považovány za virulenční. Ostrov patogenity u rodu *Francisella* byl poprvé popsán v roce 2004. Obsahuje 17 otevřených čtecích rámců o různé velikosti. *Francisella* je rod bakterie, která patří k AT bohatým organismům (adenin a tymin). Ostrov patogenity je charakterizován především ještě vyšším obsahem adeninu a tyminu, než obsahuje zbytek genomu (Nano et al., 2004). U poddruhu *tularensis* a *holarctica* byly nalezeny dvě identické kopie ostrova patogenity, na rozdíl od druhu *novicida*, kde byl nalezen pouze jeden ostrov patogenity, přičemž 97 % nukleotidů bylo totožných s nukleotidy předchozích poddruhů (Gray et al., 2002).

V ostrovu patogenity se nacházejí operony *igl* a *pdp*. Regulátorem transkripce těchto genů je MglA protein, což bylo potvrzeno studiem mutantních kmenů (Lauriano et al., 2004).

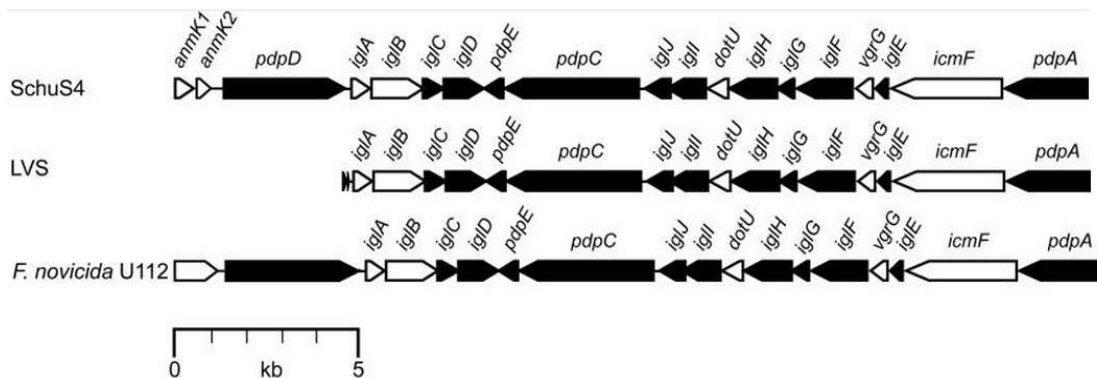
Několik genů uvnitř ostrova patogenity, jako jsou geny *vgrG*, *dotU*, *iglA*, *iglB* a *pdpB* se vyznačují homologií ke genům u jiných bakterií, které jsou součástí sekrečního

systemu typu VI (Bruin et al., 2011). Sekreční systém typu VI je nejrozšířenější sekreční systém bakterií a je kódován velkým množstvím genových klastrů, které jsou nezbytné pro virulenci bakterií (Bröms et al., 2012).

Funkce proteinů, které jsou kódované geny nacházejícími se v ostrovu patogenity, je prokazatelně spojená s intracelulárním únikem z makrofágů. Tento fakt potvrzují výzkumy mutantních kmenů, kde byly inaktivovány geny *iglA*, *iglB* (Gray et al., 2002), *iglC* (Golovliov et al., 2003) nebo *pdpA* (Nano et al., 2004). Delece těchto genů zapříčinila neschopnost růstu bakterie v makrofázích. Protein IglC byl identifikován v souvislosti s virulencí a intracelulárním růstem bakterie jako první. Je to protein o velikosti 23 kDa (Golovliov et al., 1997) a bylo u něj zjištěno, že způsobuje přerušení signální dráhy u receptorů TLR4 infikovaných makrofágů a znemožňuje tak adekvátní imunitní reakci (Telepnev et al., 2003). Dalšími geny, které jsou prokazatelně zapojeny do virulence bakterie, jsou *pdpA* a *iglA* (Nano et al., 2004). Stejně tak potřebný je gen *minD*, jehož inaktivace způsobila ztrátu integrity buněčné stěny (Anthony et al., 1994).

Rozdíly ve virulenci kmenů typu A a typu B mohou být zapříčiněny přítomností genu *pdpD*, který se vyskytuje u *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), ale u *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B) nikoliv (Nano et al., 2004) (Obr. 2).

Vzhledem k přítomnosti virulečních genů ve dvou kopiích (SCHU S4, LVS), může nastat situace, kdy inaktivace pouze jedné kopie genu nebude dostačující pro vytvoření avirulentního kmene. Bylo prokázáno, že pro plnou virulenci genů *iglA*, *iglB* a *iglC* jsou zapotřebí obě kopie příslušných genů (Su et al., 2007). V Tab. 1 je uveden přehled genů z ostrova patogenity v jednotlivých kmenech *F. tularensis*.



Obrázek 2: Schematické rozložení genů FPI kmenů SCHU S4, LVS a U112, převzato z Bröms et al., 2010

Rozdíly v genech v FPI jsou hlavně v *anmK* a *pdpD*. Gen *anmK* může být v kmenu SCHU S4 vyjádřen jako dvě samostatné jednotky (*anmK1*, *anmK2*), na rozdíl od kmenu U112 (*novicida*). Gen *pdpD* se nenachází v kmenu LVS, nicméně jsou zde přítomny dvě krátké sekvence, které vykazují homologii s částí genu *pdpD* kmenu SCHU S4 (FTL 0109, FTL 0110 na prvním lokusu a FTL 1155, FTL 1156 na druhém lokusu).

Geny FPI v jednotlivých kmenech					Název genu
SCHU S4		LVS		U112	
lokus 1	lokus 2	lokus 1	lokus 2	lokus 1	
FTT1699	FTT1344	FTL_0126	FTL_1172	FTN_1309	<i>pdpA</i>
FTT1700	FTT1345	FTL_0125	FTL_1171	FTN_1310	<i>pdpB/icmF</i>
FTT1701	FTT1346	FTL_0124	FTL_1170	FTN_1311	<i>iglE</i>
FTT1702	FTT1347	FTL_0123	FTL_1169	FTN_1312	<i>vgrG</i>
FTT1703	FTT1348	FTL_0122	FTL_1168	FTN_1313	<i>iglF/clpV</i>
FTT1704	FTT1349	FTL_0121	FTL_1167	FTN_1314	<i>iglG</i>
FTT1705	FTT1350	FTL_0120	FTL_1166	FTN_1315	<i>iglH</i>
FTT1706	FTT1351	FTL_0119	FTL_1165	FTN_1316	<i>dotU</i>
FTT1707	FTT1352	FTL_0118	FTL_1164	FTN_1317	<i>iglI</i>
FTT1708	FTT1353	FTL_0117	FTL_1163	FTN_1318	<i>iglJ</i>
FTT1709	FTT1354	FTL_0116	FTL_1162	FTN_1319	<i>pdpC</i>
FTT1710	FTT1355	FTL_0115	FTL_1161	FTN_1320	<i>pdpE/hcp</i>
FTT1711	FTT1356	FTL_0114	FTL_1160	FTN_1321	<i>iglD</i>
FTT1712	FTT1357	FTL_0113	FTL_1159	FTN_1322	<i>iglC</i>
FTT1713	FTT1358	FTL_0112	FTL_1158	FTN_1323	<i>iglB</i>
FTT1714	FTT1359	FTL_0111	FTL_1157	FTN_1324	<i>iglA</i>
FTT1715	FTT1360	FTL_0110, FTL_0109	FTL_1156, FTL_1155	FTN_1325	<i>pdpD</i>
FTT1716	FTT1361	–	–	FTN_1326	<i>anmK</i>

Tabulka 1: Jednotlivé geny z FPI konkrétních kmenů *F. tularensis* (Bröms et al., 2010)

## 2.3. Imunita

### 2.3.1. Vrozená imunita

Buňky imunitního systému přirozeně produkují látky chemické povahy po zaznamenání přítomnosti cizorodých složek v organismu. *Francisella* je vnitrobuněčný patogen a mezi jeho důležité vlastnosti patří schopnost uniknout z fagosomu makrofágů do cytosolu a dokonce i do mimobuněčného prostoru, kde dokáže infikovat další makrofágy. Významný vliv na schopnost úniku z fagosomu má interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). Interferon gamma je glykoprotein produkovaný imunitním systémem, zejména NK buňkami (natural killers). Výsledky výzkumů ukazují, že po aplikaci IFN- $\gamma$  není bakterie schopna uniknout z fagosomu (99 %) (Lindgren et al., 2004). Silným stimulatorem pro produkci IFN- $\gamma$  je interleukin IL-12. IFN- $\gamma$  aktivuje makrofágy a indukuje tvorbu enzymů, které podporují syntézu oxidu dusnatého v makrofázích (Anthony et al., 1992). Dále bylo také prokázáno, že alveolární makrofágy, ošetřené

IFN- $\gamma$ , produkují tumor nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ ), což je látka ze skupiny cytokinů s protizánětlivými účinky (Polsinelli et al., 1994)

Makrofágy některých zvířat produkují oxid dusnatý pro snížení infekce intracelulárními patogeny (Cowley et al., 1996). Bylo prokázáno, že se oxid dusnatý podílí na ničení buněk *F. tularensis* v alveolárních makrofázích. Alveolární makrofágy aktivované pomocí IFN- $\gamma$  byly schopné zničit *F. tularensis* (Polsinelli et al., 1994).

Imunitní systém posílá do boje s *F. tularensis* i další fagocytující buňky, jako jsou například neutrofilů. Nedostatek neutrofilů, které byly uměle odstraněny, zapříčinil vyšší citlivost myši na infekci kmenem LVS, který byl myším aplikován pod kůži či do dutiny břišní (Sjöstedt et al., 1994). Naopak jiná studie uvádí, že pokles počtu neutrofilních granulocytů nemá vliv na zhoršení průběhu infekce, pokud byl tento kmen (LVS) aplikován myším formou aerosolu (Conlan et al., 2002).

### 2.3.2. Adaptivní imunita

Adaptivní imunitu zprostředkovávají hlavně B- a T-lymfocyty. Adaptivní imunitu (též získaná imunita) získá organismus zpravidla při prvotní infekci patogenem, při níž si vytvoří "paměťové stopy" a při opakované infekci dokáže tyto paměťové stopy využít pro rychlejší produkci protilátek. Velkou roli v řízení buněčné imunity zastávají **dendritické buňky**, které produkují cytokiny. Cytokiny řídí aktivaci **T-lymfocytů** a imunitní odpověď, která následuje (Bosio et Dow, 2005). Důležitým cytokinem je interleukin 12 (IL-12), jenž je důležitým prvkem v syntéze IFN- $\gamma$  (Elkins et al., 2002). *Francisella* blokuje aktivaci T-lymfocytů tím, že podporuje degradaci hlavního histokompatibilního komplexu II (MHC II) nacházejícího se na povrchu makrofágů (Jones et al., 2012). *Francisella* dokáže usměrnit dendritické buňky tak, že produkují interleukin 10 (IL-10), jenž inhibuje vznik zánětlivé reakce (O'Farrell et al., 1998). Klíčovými T-lymfocyty v bakteriální intracelulární infekci jsou CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty (Cowley et al., 2005).

Ačkoliv hostitelské **B-lymfocyty** produkují protilátky proti značnému počtu bakteriálních antigenů, většina protilátek cíleně působí proti LPS bakterií (Cowley et Elkins, 2011). V jedné studii bylo prokázáno, že myši imunizované pomocí LPS byly odolné proti následující infekci LVS kmenem. Na druhou stranu ale nebyly chráněny proti kmenu SCHU S4 (Fulop et al., 2001). Významnými proteiny, jejichž produkce ze strany hostitele je při infekci *Francisella* zvýšena, jsou IgG, IgM a IgA (Rhinehart-Jones et al., 1994).

*Francisella tularensis* je nebezpečným patogenem, protože má vyvinuté mechanismy, jak odolávat imunitnímu systému svého hostitele. Mezi tyto mechanismy patří již zmíněný intracelulární únik z fagosomů a produkce specifické složky LPS. Dále disponuje speciálními mechanismy, které ovlivňují aktivaci imunitní odpovědi organismu (Asare et Kwaik, 2010). *Francisella* vylučuje sekrečním systémem proteinové látky, které potlačují uvolnění cytokinů a znemožňují tak adekvátní imunitní reakci. Jak již bylo například řečeno, mutantní kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS/ $\Delta$ *iglC* nebyl schopen potlačit imunitní reakci infikovaného organismu a tudíž byl protein IglC prohlášen za jeden z faktorů virulence *F. tularensis* (Lai et al., 2004).

Kromě produkce proteinů, které snižují aktivitu imunitního systému, dokáže *Francisella* produkovat látky, které podporují tvorbu protizánětlivých cytokinů. Zvýšená exprese byla detekována u protizánětlivých cytokinů typu IL-4, IL-13 a TGF- $\beta$  (Bosio et Dow, 2005). Dále byla zjištěna zvýšená exprese protizánětlivého cytokinu PGE2, který snižuje expresi MHC II (Jones et al., 2012). Signální dráhy těchto mechanismů jsou předmětem intenzivního výzkumu.

## 2.4. *F. tularensis* jako biologická zbraň

*Francisella tularensis* je považována za potenciální biologickou zbraň. Díky vysoké schopnosti infikovat živé organismy, snadnému šíření a její početnosti v přírodě, představuje vysoké riziko nákazy a je proto řazena do kategorie A nebezpečných agens (Darling et al., 2002) spolu s *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Variola major*, *Clostridium botulinum* a *Ebola virus*. Infekce způsobená bakterií *F. tularensis*, kdy postačí méně jak 25 bakteriálních buněk (jiní autoři (Ellis et al., 2002) uvádějí méně než 10 bakterií) pro vypuknutí tularémie, je srovnatelná s infekcí *Mycobacterium tuberculosis*, kdy pro vypuknutí tuberkulózy postačí pouhých 10 bakterií (Riley, 1957). Pro srovnání, pro vypuknutí plicní formy nákazy antraxem je nutno inhalovat 8 000 až 50 000 bakterií (WHO, 1970).

Použití *F. tularensis* jako biologické zbraně bylo prokázáno v čínsko-japonské válce, 1932 - 1945, kdy probíhaly intenzivní výzkumy úmyslného způsobení tularémie u člověka (Harris, 1992). Výzkumy na vývoj biologických zbraní, které obsahují *F. tularensis*, probíhaly také v bývalém Sovětském svazu a USA. Údajně byla *F. tularensis* použita během druhé světové války Rudou armádou v bojích na Východní frontě (Alibek, 1999). V roce 1946 proběhla v Sovětském svazu vakcinace oslabeným kmenem *F. tularensis*, který byl v roce 1956 převezen do US Army Medical Research Institute of Infectious Disease, kde byl laboratorně testován a následně pojmenován jako kmen LVS (Live Vaccine Strain) (Eigelsbach et Downs, 1961). Prezident Spojených států, v roce 1972, podepsal Úmluvu o biologických zbraních a toxinech. Tímto krokem se Spojené státy zavázaly k nepoužívání a nehromadění biologických zbraní. Program vývoje biologických zbraní v bývalém Sovětském svazu byl údajně podporován do roku 1990, kdy byly vyvinuty kmeny *F. tularensis*, které jsou rezistentní k antibiotikům (Dennis et al., 2001).

## 2.5. Tularémie

Tularémie je zoonotické onemocnění způsobené gram-negativní bakterií *Francisella tularensis*. Je to jedna z nejvíce infekčních bakterií, která napadá jak zvířata, tak člověka. Pro vypuknutí onemocnění postačí méně než 10 bakterií (Ellis et al., 2002). Jiní autoři uvádějí 25 bakterií (Riley, 1957). Poprvé byla nemoc popsána v roce 1911 u syslů (McCoy et Chapin, 1912). O dva roky později byla tato nemoc popsána u dvou lidí ve státě Ohio, kteří byli v kontaktu s divokými králíky (Wherry et Lamb, 1914). Tato nemoc byla také popsána jako „králičí horečka“ (Ohara, 1925). Tularémie postihuje hlavně severní polokouli Země. Případy tularémie na americkém kontinentu



jsou hlášeny z Kanady, USA (kromě Havaje) a Mexika (Boyce, 1975). V Japonsku byla tularémie zaznamenána na severovýchodě hlavních ostrovů (Ohara et al., 1996). Tularémie je rozšířena i na euroasijském kontinentu. Nejvíce případů je zaznamenáno ve státech bývalého Sovětského svazu a v severních státech. Zajímavostí je, že Velká Británie nezaznamenala infekci touto nemocí (Pollitzer, 1967). Ve Švédsku bylo za období 1973-1985 hlášeno přes 500 případů (Mörner, 1992), na Slovensku 126 případů v období 1985-1994 (Gurycová, 1997). Epidemie ve Španělsku, v roce 1997, postihla 559 osob (Perez-Castrillon, 2001). V roce 2000 vypukla epidemie v Kosovu a nemocí bylo postiženo 327 lidí (Reintjes et al., 2002). V roce 2002 byl zaznamenán první případ nákazy na jižní polokouli (Austrálie), kdy se muž nakazil *F. novicida* (Whipp et al., 2003). Největší epidemie vypukla v letech 1966-1967 ve Švédsku, kdy bylo nakaženo více než 600 zemědělců (Dahlstrand et al., 1971). V neléčených případech může mít tularémie v 30 - 60 % fatální následky (Saslaw et al., 1961).

### 2.5.1. Klinické projevy nákazy

Po inkubační době, která je obvykle 3-5 dní, nastupuje náhlá nemoc, která se vyznačuje horečkou, zimnicí, nevolností, bolestmi v krku a bolestmi hlavy (Christenson, 1984). Ostatní klinické příznaky přicházejí později. Tularémie se vyskytuje v několika klinických formách, které závisejí na způsobu vstupu infekce do organismu. Nejběžnější formou je **ulceroglandulární forma**, která nastává v důsledku kousnutí přenašečem (členovci), jenž byl parazitem nakaženého zvířete (Ohara et al., 1998). V USA a Střední Evropě dochází k nákaze hlavně prostřednictvím klíšťat (Hubálek et al., 1997), v Severní Evropě pak prostřednictvím komárů (Eliasson et al., 2002). K nákaze může také dojít pouhým kontaktem s nakaženým zvířetem. Tato forma tularémie je dominantní na evropském kontinentě. Zahrnuje více než 90 % případů a bývá způsobena hlavně *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Tärnvik et Berglund, 2003). Tato forma nákazy se projevuje vznikem lézí v místě vstupu infekce do těla a následným zvětšením mízních uzlin (Feldman et al., 2001). Vředy jsou většinou nenápadné a vyléčí se během týdne. Mohou být zaměňovány za kousnutí od komára, či klíštěte. Poté, co se bakterie dostane do lymfatického systému a mízních uzlin, může být rozšířena i do dalších orgánů, jako jsou například játra, ledviny, slezina, plíce, střevo, centrální nervový systém a kosterní svalstvo. Zotavení z této formy nemoci může trvat velice dlouho, ale zpravidla nemívá fatální důsledky (mortalita u této formy je méně než 3 %) Akutní forma, která je způsobena *F. tularensis* subsp. *tularensis*, tyfoidální tularémie, je typická tím, že nedochází ke zvětšování mízních uzlin ani ke vzniku viditelných vředů. Dochází k šíření bakterií krví (septikémie) a může mít fatální důsledky až v 30 - 60 % případů (Evans et al., 1985).

Další forma tularémie je tzv. **okuloglandulární forma**, kdy dochází ke kontaminaci oční sliznice. Přenos infekce může nastat pomocí prstů pacienta, kdy dochází k přenosu bakterie z infikovaného místa do očí. Kontaminace oční sliznice může nastat i v případě vystavení oční sliznice vzdušné expozici (Evans et al., 1985). Tato forma postihuje 1-4 % případů. Ačkoliv je tato forma neobvyklá, způsobuje velice nepříjemné potíže, mezi něž patří zánět spojivkového vaku, otoky očních víček,

fotofobie a hnisavé výtoky (Evans et al. 1985). Tato forma tularémie bývá také označována jako Parinaudův syndrom (Bailey, 1999).

**Orofaryngeální forma** tularémie vzniká v důsledku požití kontaminované vody či potravy. Mezi příznaky této nákazy patří velká bolest v krku, zvětšené mandle a oteklé krční lymfatické uzliny. Touto formou tularémie bylo nakaženo mnoho lidí při epidemii v Kosovu v roce 2000 (Feldman et al., 2001).

Pravděpodobně nejzávažnější formou tularémie je **plicní forma**, která může nastat po inhalaci bakterií nebo jako závažná komplikace v ostatních formách nákazy (Gill et Cunha, 1997). K inhalaci bakterií může dojít při práci s kontaminovaným senem, či při jiné zemědělské aktivitě, nebo například při sekání kontaminované trávy, kdy kontaminaci nejčastěji zapříčiňují uhynulí nakažení hlodavci (Feldman, 2001). Příznaky nemoci mohou být různé. Často připomínají některé jiné dýchací onemocnění. Plicní onemocnění *F. tularensis* subsp. *holarctica* (typ B) není fatální, na rozdíl od nákazy *F. tularensis* subsp. *tularensis* (typ A), která způsobuje těžké plicní onemocnění. Vyznačuje se vysokou horečkou, zimnicí, nevolností a záchvaty kašláním (Evans et al., 1985). V případě nezačínání léčby může být až 30 % případů s fatálními důsledky (Dienst, 1963).

## 2.5.2. Léčba

Léčba tularémie spočívala po desetiletí v podávání aminoglykosidů a tetracyklinů (Enderlin et al., 1994). Od roku 1974, kdy byl do oběhu zaveden streptomycin, byly aminoglykosidy používány pouze pro těžké případy nákazy (Alford et al., 1972). Streptomycin a gentamicin jsou antibiotika preferovaná pro léčbu tularémie díky jejich baktericidní aktivitě a významnému snížení pravděpodobnosti navrácení onemocnění (Dennis et al., 2001). Z hlediska ototoxicity bylo používání streptomycinu omezeno. Použití tetracyklinů pro léčbu je rizikové, neboť může dojít k opakovanému rozšíření nemoci (Enderlin et al., 1994). Současné studie ukazují, že nejvhodnějším léčebným prostředkem je ciprofloxacin (a možná i jiné chinolony) (Tärnvik et Berglund, 2003). Minimální inhibiční koncentrace těchto látek je 0,01-0,1 mg/l pro kmeny *F. tularensis* subsp. *tularensis* a *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Johansson et al., 2002). Ciprofloxacin je také vhodný pro děti a těhotné ženy (Johansson et al., 2000). Bylo ovšem zaznamenáno i několik případů, kdy ciprofloxacin neúčinkoval uspokojivě (Chocarro et al., 2000).

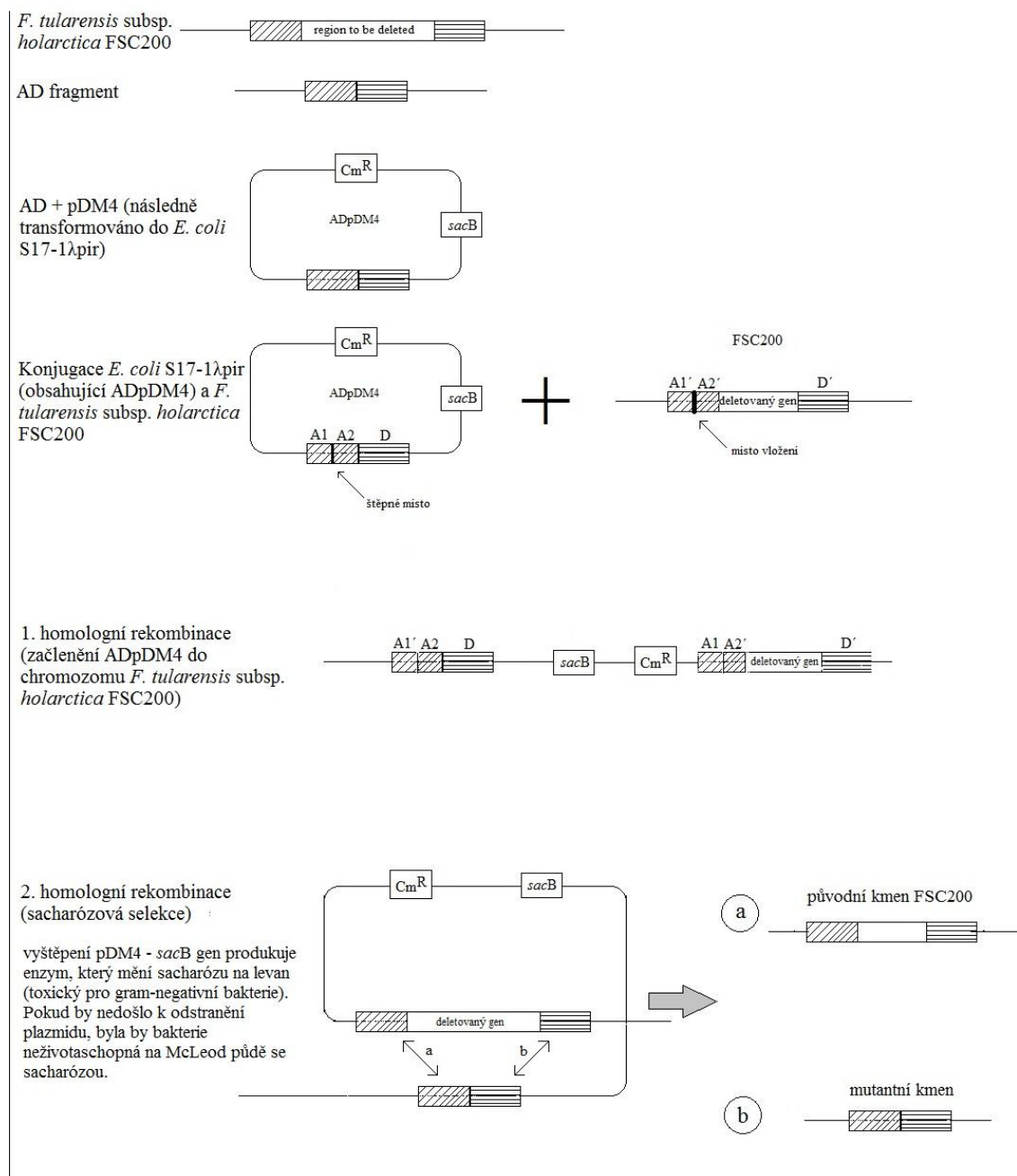
## 2.6. Genetické manipulace

Pro získání více informací o virulenci *F. tularensis* se často využívají mutantní kmeny, u kterých byly metodami molekulární biologie inaktivovány určité geny. Tímto postupem lze odhalit esenciální geny nezbytné pro růst a proliferaci *F. tularensis*.

Exogenní DNA může být pomocí konjugace, kryotransformace a elektroporace zavedena do buněk *F. tularensis* (Golovliov et al., 2003). **Kryotransformace** je proces, při kterém je pro vytvoření pórů využíván suchý led nebo kapalný dusík. **Elektroporace** je metoda založená na vystavení buněk vysokému napětí (2,5 kV), při

kterém dojde ke zvětšení již zmíněných pórů (Zogaj et Klose, 2010). V této práci je pro genetickou manipulaci *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 využita metoda konjugace.

Při procesu **konjugace** dochází k přenosu plazmidové DNA mezi konjugujícími bakteriemi a děje se tak pomocí pilusů. Plazmidová DNA se zabudovává do chromozomu příjemce (Griffiths et al., 2000).



Obrázek 3: Schéma vzniku delečních mutantních kmenů *F. tularensis*

V této práci byl jako dárcce exogenní DNA použit speciální kmen *E. coli* S17-1λpir, který nesl požadovanou DNA (deleční konstrukt) na plazmidu pDM4. Tento

plazmid není schopen se replikovat v *F. tularensis* a proto muselo dojít k jeho začlenění na chromozom pomocí homologní rekombinace (při vložení plazmidu do buněk *F. tularensis* by došlo k jeho zániku hned při prvním dělení buňky). Plazmid pDM4 obsahuje rezistenci na chloramfenikol (selekční gen), *sacB* gen, jenž kóduje enzym, který mění sacharózu na toxický levan a *ori* sekvenci nezbytnou pro replikaci (Milton et al., 1996).

Jelikož při konjugaci dochází k zabudování celého plazmidu na chromozom, bylo pro vytvoření mutantních kmenů potřeba vyvinout metodu, při které by došlo k odstranění plazmidu z genomu, ale exogenní DNA, která byla do něj vložena, zůstala přítomna. Golovliov et al. v roce 2003 popsal metodu, která toto splňuje, jako dvojitou homologní rekombinaci.

K první homologní rekombinaci dochází při konjugaci, kdy je dárcovský plazmid zabudován do chromozomu *F. tularensis*. K druhé homologní rekombinaci dochází při sacharózové selekci, kdy je plazmid pDM4 vyštěpen díky přítomnosti *sacB* genu (viz struktura plazmidu pDM4). Pravděpodobnost vzniku rekombinantních kmenů (obsahujících exogenní DNA a neobsahující zbytek plazmidu) je 50 %. Schéma vzniku delečních mutantních kmenů popisuje Obr. 3.

## 2.7. Diagnostika

Detekce *F. tularensis* je možná několika různými metodami, mezi něž patří kultivace, sérologické vyšetření, ELISA, PCR metody a sekvenace 16S rDNA.

Pro **kultivaci** a potvrzení přítomnosti, případnou izolaci, *F. tularensis* je v amerických laboratořích běžně používán CHAB agar (čokoládový krevní agar s cysteinem). *F. tularensis* roste pomalu při 37 °C a při 28 °C téměř neroste, na rozdíl od jiných bakterií, jako je například *Yersinia pestis*. Kolonie bývají zpravidla 2-4 mm velké, zelenobílé, kulaté, s hladkým povrchem a mírně mukózní (Ellis et al., 2002). Pro kultivaci lze použít i jiné kultivační médium (GCII agar, Müller-Hinton agar aj.), ale morfologie kolonií není tak zřetelná, jako při použití CHAB agaru (WHO, 2007). Pro kultivaci v tekutém médiu je často využíváno Müller-Hintonovo médium. Kultivace trvá obvykle 3-7 dní pokud se vzorek třepe, až 10 dní v případě statické kultivace. Pokud je do média přidán cystein, naroste kultura během 24 hodin (Ellis et al., 2002). Široce využívaným médiem pro kultivaci je Chamberlainovo médium. Avšak toto médium není používáno pro rutinní diagnózu (Chamberlain, 1965).

**Sérologické vyšetření** je nejobyčejnější způsob používaný pro detekci tularémie. Nicméně, lze jej použít až dva týdny od uplynutí začátku nemoci (Bevanger et al., 1994). Aglutinační metodou se prokazují protilátky hlavně proti IgM, IgA a IgG (Brown et al., 1980). Hojně je také využívána metoda **ELISA**, pomocí níž se detekuje přítomnost LPS vnější membrány buněk *F. tularensis* (Bevanger et al., 1994).

**PCR** metoda je nástrojem pro detekci specifických genů *F. tularensis* v případě, že vzorek nelze kultivovat. Pomocí této metody se nejčastěji detekují geny *fopA* a *tul4*, které kódují proteiny vnější membrány buňky (Fulop et al., 1996). PCR metoda byla také využívána pro zjištění konkrétního poddruhu *F. tularensis*. Tato metoda byla založená na porovnávání velikostí jednotlivých amplifikovaných produktů

(Broekhuijsen et al., 2003). Později byly pro tyto účely používány nové metody, mezi něž patří polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Thomas et al., 2003), pulsní gelová elektroforéza (Garcia Del Blanco et al., 2002) a multilokusová analýza (Farlow et al., 2001).

Další možností, jak diagnostikovat *F. tularensis* je zjištění sekvence ribosomální DNA (**16S rDNA**). Tato metoda se využívá zejména u pomalu rostoucích, neobvyklých a kultivačně náročných bakterií (Hall et al., 2003). Sekvenování 16S rDNA je aplikováno hlavně v oblastech, kde *F. tularensis* nebyla doposud detekována. Bylo například použito k potvrzení prvního nálezu této bakterie na jižní polokouli (Whipp et al., 2003).

## 2.8. Vakcína

Vzhledem k virulenci této bakterie a k potencionálnímu použití jako biologické zbraně, probíhá od roku 1940 intenzivní výzkum vývoje vakcíny proti tularémii. V letech 1933-1941 proběhlo první očkování několika tisíc obyvatel státu Ohio vakcínou Foshay, která nese jméno dle vědeckého pracovníka, jenž tuto vakcínu připravil. Pozdější výzkumy ale prokázaly, že tato vakcína má pouze nízký stupeň ochrany před vysoce virulentními kmeny *F. tularensis* (Foshay et al., 1942). Později, v roce 1950, byl opakovaným pasážováním vyvinut v bývalém Sovětském svazu živý vakcinační kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* (LVS - live vaccine strain) (Tigertt, 1962). Tento kmen byl v roce 1956 převezen do USA, kde byl schválen FDA jako nový prostředek pro boj s tularémií (Conlan et Oyston, 2007). Očkování živým vakcinačním kmenem bylo aplikováno na pracovníky U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, ale vzhledem k nejasnosti původu tohoto kmene byl LVS institucí FDA vyjmut ze seznamu povolených prostředků k léčbě (Burke, 1977). I přesto, že kmen LVS není povolen jako očkovací látka proti tularémii, byl tento objev úspěchem a navazují na něj další pokusy vyvinout účinný oslabený kmen, který by mohl fungovat jako účinné očkování. Později bylo proto vytvořeno mnoho mutantních kmenů se specifickým genomem, které byly testovány na virulenci a porovnávány s kmenem LVS (Bakshi et al., 2006).

Očkování oslabenými kmeny může probíhat inhalační formou nebo formou parenterální. Výzkumy ukazují, že inhalační forma očkování poskytuje lepší ochranu proti plicní formě tularémie, než parenterální podání (Conlan et al., 2005).

Na základě srovnávání genomu jednotlivých kmenů bylo prokázáno, že u kmene LVS došlo k inaktivaci genů *pilA* (Forslund et al., 2006) a FTT0918 (Twine et al., 2005). Vliv inaktivace těchto genů na snížení virulence byl prokázán i navrácením těchto genů zpět do genomu kmene LVS, který se tak stal opět virulentním (Salomonsson et al., 2009).

Identifikována byla některá klíčová místa v genomu, jako je například lokus *igl* (intracellular growth locus), který je nezbytný pro intracelulární virulenci (Gray et al., 2002). Cílená delece genu *iglC* byla provedena úspěšně (Golovliov et al., 2003). Pozitivní výsledky tohoto výzkumu vedly k dalšímu využívání této techniky s cílem najít další geny, které by mohly být nezbytné pro virulenci a intracelulární fungování *F. tularensis*. Technika inaktivace byla využita u řady dalších genů. U kmene LVS se

jedná o *katG* (Lingren et al., 2007), *bla1*, *bla2* (LoVullo et al., 2006), *sodB* (Bakshi et al., 2006), *tolC* a *ftlC* (Gil et al., 2006), *purMCD* (Pechous et al., 2006), *fslA* (Sullivan et al., 2006). Tato technika byla také použita u několika genů poddruhu *tularensis*, jako je například *katG* (Lingren et al., 2007), *bla1*, *bla2* (LoVullo et al., 2006), *wbtDEF* (Thomas et al., 2007), *iglC* a FTT0918 (Twine et al., 2005).

Je třeba však mít na paměti i možnost, že inaktivace určitého genu v jednom druhu nemusí mít stejné účinky jako u jiného druhu. Inaktivace genu *pilC* u *F. tularensis* subsp. *holarctica* neměla výrazný vliv na virulenci, na rozdíl od *F. novicida*, kdy byla virulence zvýšena (Hager et al., 2006).

Potencionální oslabené kmeny *F. tularensis* jsou testovány jako možné očkovací látky na myších, je však ale nutné říci, že citlivost těchto pokusných organismů je na *F. tularensis* je mnohem vyšší než u člověka (Fortier et al., 1991). Stejně tak i morčata a králíci jsou citlivější na tuto infekci než lidé (Lyons et Wu, 2007).

Předmětem výzkumu je také vývoj neživé vakcíny. Tyto výzkumy se zabývají hlavně proteinovými složkami, které by vyvolaly adekvátní imunitní reakci a působily zároveň jako očkovací látky. V jedné studii byl k imunizaci myši použit protein FopA, což mělo za následek vyvolání silné imunitní reakce, ale nebyla prokázána stála imunita (Fulop et al., 1996).

Předmětem mnoha studií je membránová složka LPS, která po určité modifikaci může sloužit jako imunizační prostředek (Elkins et al., 1993). Lipopolysacharid je pro svou neobvyklou strukturu a své biologické vlastnosti dost značným předmětem zájmu v oblasti výzkumu a vývoje vakcín proti tularémii. Díky své biochemické aktivitě je potencionální složkou budoucích vakcín (Ancuta et al., 1996). V jedné studii bylo prokázáno, že intraperitoneálně podané LPS vykazuje ochranné účinky před kmenem LVS, ale nikoliv před kmenem SCHU S4 (Fulop et al., 2001).

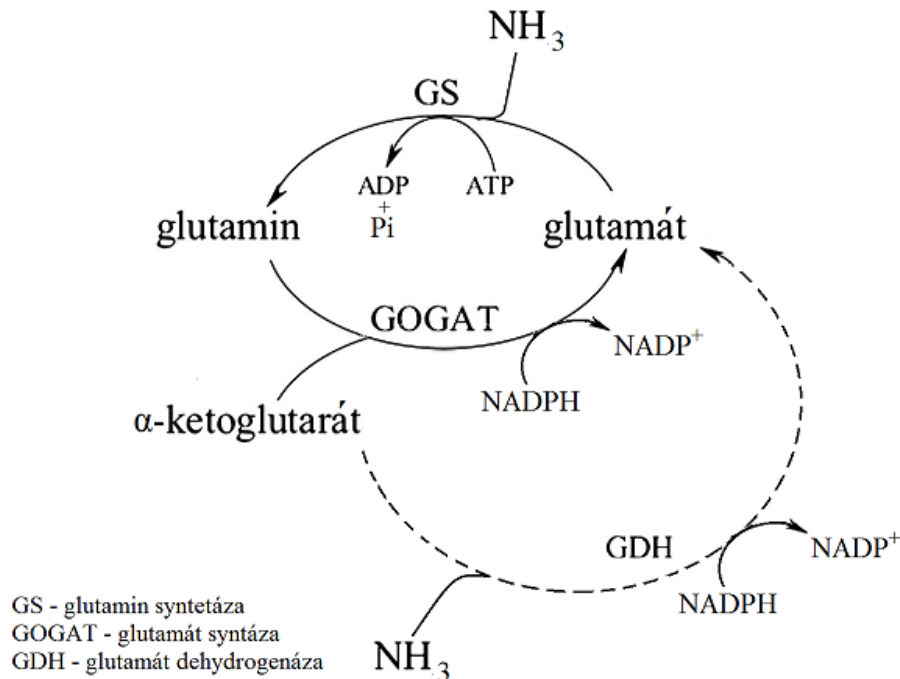
## 2.9. Sledované kandidátní geny virulence

Tato práce se zabývá vytvořením delečních mutantních kmenů *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200, u kterých byl sledován vliv mutace na virulenci bakterie. Kandidátní geny virulence byly vybrány na základě proteomických analýz a jedná se o geny FTS\_0265, který ve zmíněném kmeni *F. tularensis* kóduje glutamát-dehydrogenázu, FTS\_0611, jehož expresí vzniká exopolyfosfatáza a geny FTS\_0815 a FTS\_1462, které představují hypotetické proteiny. V této kapitole budou blíže popsány molekulární funkce glutamát-dehydrogenázy a exopolyfosfatázy.

### 2.9.1. Glutamát-dehydrogenáza

Asimilace dusíku je u mnoha bakterií nezbytná pro vytvoření zásobních dusíkatých látek, které jsou potřebné pro řadu biosyntetických pochodů. Primárními sloučeninami, do kterých je navázán amoniak jsou glutamin a glutamát. Glutamát je zapojen do transaminačních reakcí metabolismu aminokyselin (např. alanin je transaminázou převeden na pyruvát za současného uvolnění amoniaku) (Mobley et al., 2001). Biosyntetické dráhy, které v bakteriích zajišťují zabudování dusíku do glutamátu a

glutaminu, zajišťují 3 hlavní enzymy: GOGAT (glutamát syntáza), GS (glutamin syntetáza) a GDH (glutamát dehydrogenáza). Glutamát syntáza převádí amidovou skupinu z glutaminu na ketoglutarát, za vzniku glutamátu. Glutamin syntetáza zajišťuje přenos amoniaku na glutamát, za vzniku glutaminu. Alternativní cestu k zabudování dusíku do glutaminu zajišťuje glutamát dehydrogenáza, která katalyzuje redukční reakci ketoglutarátu amoniakem (Obr. 4) (Merrick et Edwards, 1995).

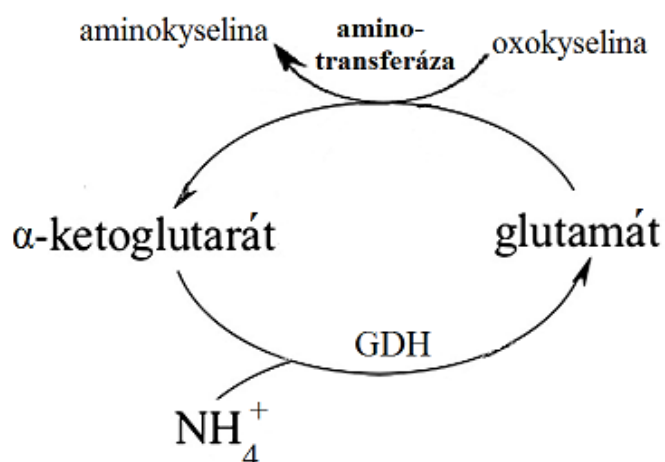


Obrázek 4: Schéma biosyntetické dráhy glutamátu a glutaminu (vytvořeno dle Merrick et Edwards, 1995)

Aminoskupina glutamátu je využita při syntéze purinů, pyrimidinů, dusíkatých cukrů, histidinu, tryptofanu aj. Glutamát je akceptorem i donorem dusíku a je klíčovou sloučeninou v koloběhu dusíku v buňce. Glutamát dehydrogenáza je, jak již bylo řečeno, pouze alternativní metoda (ve většině organismů) pro zabudování dusíku do glutamátu, častěji využívaný mechanismus k zabudování dusíku do glutamátu je využití GOGAT a GS.

Díky reverzibilní aktivitě aminotransferáz může organismus syntetizovat aminokyseliny (Obr. 5) (Santero et al., 2012).

Glutamát dehydrogenáza je reverzibilní enzym, jehož fyziologická reakce závisí na typu substrátu. Pokud je přítomen NADPH, pak GDH pracuje v biosyntetickém směru, tzn., že probíhá syntéza glutamátu asimilací amoniaku na  $\alpha$ -ketoglutarát. Pokud je ale substrátem  $\text{NAD}^+$ , pak má GDH katabolickou funkci, přičemž vzniká  $\alpha$ -ketoglutarát a amoniak (Minambres et al., 2000).



Obrázek 5: Schéma využití glutamátu jako donora amino skupiny pro syntézu aminokyselin (vytvořeno dle Santero et al., 2012)

Glutamát dehydrogenáza je kódovaná genem *gdhA* a v kmenu *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 nese označení FTS\_0265 a je tvořena 449 aminokyselinami. V kmenech U112 a SCHU S4 je taktéž tvořena 449 aminokyselinami a nese označení FTN\_1532 (*novicida*) a FTT\_0380c (*tularensis*).

Inaktivace genu pro glutamát dehydrogenázu u gram-pozitivní bakterie, jež způsobuje průjemová onemocnění, *Clostridium difficile* (*gluD*) způsobila vyšší citlivost této bakterie na  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dále se tento mutantní kmen prezentoval nižší schopností růstu na kultivačním médiu (Girinathan et al., 2014). Podobně byla snížena schopnost růstu gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, když došlo k inaktivaci genu pro glutamát dehydrogenázu *gdhB* (Lu et Abdelal, 2001). Ke snížení růstu může ale dojít i nadměrnou expresí *gdh*, což bylo potvrzeno u *Klebsiella aerogenes* (Janes et al., 2001). Inaktivace genu *gdhA* u *E. coli* nevyvolala zjevné změny v růstu bakterie, ovšem dvojitý mutantní kmen v genu *gdhA* a genu pro glutamát syntázu vyžadoval pro svůj růst přidaný glutamát (Berberich, 1972).

## 2.9.2. Exopolyfosfatáza

Exopolyfosfatáza (*ppx*) hraje významnou roli v metabolismu anorganického polyfosfátu v buňce. Anorganický polyfosfát je polymer skládající se z několika stovek orthofosfátových zbytků a je zdrojem energie, která je uložena ve vysokoenergetických vazbách (Kornberg et al., 1999). Polyfosfát byl objeven ve všech buňkách prokaryot i eukaryot. Mezi jeho nejvýznamnější funkce patří jeho nezbytnost pro přežití bakterií ve stacionární fázi (Rao et Kornberg, 1996). Polyfosfát je syntetizován pomocí polyfosfát kinázy (*ppk*), která přenáší fosfátový zbytek z vysokoenergetického dárce (nejčastěji z



ATP) na polyfosfátový řetězec. Exopolyfosfatáza katalyzuje hydrolýzu polyfosfátu a umožňuje tak odštěpení koncového anorganického fosfátu (Pi) z polyfosfátové molekuly. Geny *ppx* a *ppk* tvoří polyfosfátový operon (Akiyama et al., 1993).

Bylo prokázáno, že ke hromadění fosfátu v buňce dochází během energeticky bohatých růstových podmínek, kdy jsou přebytky Pi uloženy do molekuly polyfosfátu. Tato zásoba umožňuje buňkám přežít během růstových podmínek, které jsou energeticky chudé. V případě nedostatku energie pro růst buňky může dojít k jejímu získání buď regenerací ATP nebo hydrolýzou polyfosfátu pomocí PPX, kdy dojde k uvolnění orthofosfátu a dobití transmembránového protonového gradientu, což zajišťuje šetření energie uložené v ATP (Keasling et al., 2000). Dále bylo také prokázáno, že polyfosfát hraje důležitou roli ve virulenci *Pseudomonas aeruginosa* (Rashid M. H. et Kornberg A., 2000), *Shigella flexneri* a *Salmonella* spp. (Kim et al., 2002). Nedávná studie dokládá, že poruchy enzymatické aktivity PPX v mutantním kmenu *Bacillus cereus* jsou mnohem závažnější, než v mutantních kmenech PPK. Tato skutečnost je zřejmě způsobena kolísáním hladiny polyfosfátu v buňce (Shi et al., 2004). Jiná studie hovoří o tom, že akumulace polyfosfátu v *Mycobacterium tuberculosis* vede ke snížení životaschopnosti a k omezení růstu bakterie (Thayil et al., 2011). Akumulace polyfosfátu v buňce bakterií má negativní vliv na růst a prosperitu buněk, stejně jako jeho nedostatek (Kornberg et al., 1999).

V této práci byl zkoumán vliv delece exopolyfosfatázy na životaschopnost bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. V tomto kmenu je tento protein kódován genem *ppx*, který je označen jako FTS\_0611, dle svého lokusového umístění, a tvoří ho 308 aminokyselin. Pro srovnání, stejný protein v SCHU S4 je tvořen 311 aminokyselinami (FTT\_1444c) a v U112 je tvořen taktéž 308 aminokyselinami (FTN\_1414).

Po vstupu bakterie do hostitelské buňky se bakterie vystavuje stresovým podmínkám okolního prostředí. Přežití v náhle změněných podmínkách umožňuje exprese genů virulence a další změny v metabolických drahách bakterie. Takové změny mají na starosti hlavně globální transkripční regulátory. Aktivita těchto regulátorů je modulována anorganickým polyfosfátem a alarmní molekulou ppGpp. Bylo prokázáno, že u *E. coli* polyfosfát aktivuje *rpoS* gen, který pozitivně reguluje expresi genů, které zmírňují oxidační stres způsobený hostitelem (Shiba et al., 1997).

Polyfosfát hraje významnou roli v expresi virulencních genů u rodu *Francisella*. Pro expresi mnoha genů z ostrova patogenity je nezbytný regulační gen *fevR* (Brotcke et Monack, 2008). FevR může interagovat s regulačními proteiny MglA a SspA a ovlivňovat tak expresi genů z MglA/SspA regulonu. Děje se tak ale pouze při stabilizaci interakce mezi MglA a SspA za pomoci polyfosfátu (Wrench et al., 2013).

Polyfosfát tedy působí jako prostředník molekulárních interakcí v komplexu MglA/SspA, který je hlavním faktorem pro spuštění exprese patogenních determinantů. Předpokládá se, že koncentraci polyfosfátu ovlivňuje ppGpp. Stabilita komplexu MglA/SspA ovlivňuje schopnost bakterie vyvolat reakci na stres způsobený hostitelskou buňkou (Wrench et al., 2013).

## 3. Experimentální část

### 3.1. Materiál

#### BIOLOGICKÝ MATERIÁL

*Escherichia coli* NEB Turbo

F' *proA*<sup>+</sup>*B*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ*lacZ*M15 / *fhuA2* Δ(*lac-proAB*) *glnV galK16 galE15 R(zgb-210::Tn10)*Tet<sup>S</sup> *endA1 thi-1* Δ(*hsdS-mcrB*)5

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

*Escherichia coli* S17-1λpir

*recA, thi, pro, hsdR*<sup>-</sup>M<sup>+</sup>, <RP4:2-Tc:Mu:Km:Tn7>Tp<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>

Simon et al, 1983

*Escherichia coli* XL1- Blue

*endA1 gyrA96*(nal<sup>R</sup>) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44* F'[::Tn10 *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*)M15] *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)

Stratagene

*Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

Klinický izolát, *Francisella* Strain Collection (FSC) of the Swedish Defense Research Agency, Umeå, Švédsko

laboratorní myši typu BALB/c

MHC Haplotyp H2d

Velaz s.r.o.

#### ANTIBIOTIKA

Ampicilin sodná sůl

Gentamicin (10 mg/ml)

Chloramfenikol

Kanamycin sulfát

Penicilin (10 000U/ml) / streptomycin (10 mg/ml)

Polymyxin B sulfát

#### VÝROBCE

Serva Electrophoresis

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

Serva Electrophoresis

Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich

#### ENZYMY

*SacI*

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

*XhoI*

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

#### POLYMERÁZY

*Pfu*Ultra High-Fidelity DNA Polymerase

Agilent Technologies

Quick-Load *Taq* 2x Master Mix

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

*Taq* DNA polymerase

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

#### LIGÁZY

Quick ligase

New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.

## CHEMICKÝ MATERIÁL

Agaróza (PCR agarose)	Bio-Rad
Bacto agar	Difco
BBL™ Hemoglobin	Becton Dickinson
BBL™ IsoVitalex Enrichment	Becton Dickinson
BSA (100x)	New England BioLabs® Inc.
CaCl <sub>2</sub>	Penta Laboratories
Calcium panthotenate	Sigma Aldrich
Deoxycholát sodný	USB Labs
Diethyléter	Penta Laboratories
Difco™ GC Medium Base	Becton Dickinson
DL-methionine	Sigma Aldrich
DL-proline	Sigma Aldrich
DL-serine	Sigma Aldrich
DL-threonine	Sigma Aldrich
DL-valine	Fluka
DMEM médium 1x + GlutaMax™-I	Gibco®
DMSO (dimethyl sulfoxide)	Sigma Aldrich
dNTP Set, PCR Grade 100 mM	QIAGEN
Ethanol	Penta Laboratories
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	ICN Biomedicals Inc.
FTSI	Dominique Dutscher®
Gene Ruler 1kb DNA ladder ready-to-use	Thermo Scientific
HyperLadder™ 1 kb	Bioline
Quick-Load® 1 kb DNA Ladder	New England BioLabs® Inc.
Glukóza	Penta Laboratories
Glycerol	Penta Laboratories
GTC agarose	Cambrex
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'- [2-ethanesulfonic acid])	Sigma Aldrich
Isopropanol	Serva Electrophoresis
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
KCl	Lachema s.r.o.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich
L-arginine-HCl	Sigma Aldrich
L-aspartic acid	Sigma Aldrich
LB agar, Powder	Serva Electrophoresis
L-cysteine-HCl	Fluka
L-histidine-HCl	Sigma Aldrich
L-isoleucine	Sigma Aldrich
L-leucine	Sigma Aldrich
L-lysine-HCl	Sigma Aldrich
L-tyrosine	Sigma Aldrich
Luria Broth Medium	Sigma-Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	Lachema s.r.o.

MgSO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Sigma Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NEBuffer 4 (10x)	New England BioLabs <sup>®</sup> Inc.
PBS	Sigma-Aldrich
Sacharóza	Sigma-Aldrich
SOC Outgrowth Medium	New England BioLabs <sup>®</sup> Inc.
Spermine tetrahydrochloride	Sigma Aldrich
Sybr Safe DNA gel stain (10 000x)	Invitrogen <sup>™</sup>
TAE buffer 50x	Serva Electrophoreis
Thiamin-HCl	Sigma Aldrich
Trypanová modř	Lachema s.r.o.
Trypton	Oxoid LTD
Yeast extract	Serva Electrophoresis

### KOMERČNÍ KITY

AquaPure Genomic DNA Kit	Bio-Rad
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen <sup>™</sup>

### OLIGONUKLEOTIDY

	Generi Biotech s.r.o.
FTS_0265	T <sub>m</sub>
A 5'- CTC GAG TTT GAT TTA CAA GGG ATA ACA GC - 3'	62 °C
B 5'- CTT GTT GAA TCA TAA TGT ACT TCT GAG CAT TCA TTT ATG - 3'	62 °C
C 5'- CAG AAG TAC ATT ATG ATT CAA CAA GGT AGA TAC TAA - 3'	62 °C
D 5'- GAG CTC GGA TTT ATG GAA ACT AGC ATT ATC - 3'	64 °C
F1 5'- TAG TTT CTC AGT AGC CAA ATA A - 3'	58 °C
R2 5'- GCG ATT TAC CAG TTA ATA CAC C - 3'	62 °C
R3 5'- AAC ACA TAA GAG ATA GCA TCA C - 3'	60 °C
S1 5'- TAA TCT TAA TTT GGC TTC ATC AT - 3'	58 °C
S2 5'- GCT CAG AAG TAC ATT ATG ATT C - 3'	60 °C
FTS_0611	T <sub>m</sub>
A 5'- CTC GAG TTT CAC GAG GCG GAC GAA TCT - 3'	64 °C
B 5'-TCT TAT ACT TAC TTG TTG CTA CTA TCT TTG ACA TAT A - 3'	64 °C
C 5'- ATA GTA GCA ACA AGT AAG TAT AAG ATT GTT ATT AAT TAG- 3'	64 °C
D 5'-GAG CTC TAT CAT ATA AAA GAA GTA TTC TGG TC - 3'	66 °C
F1 5'-TAG CAG TAA TAT CCT CAT TTG AG - 3'	62 °C
R2 5'-TCA CGA TCT TCT CTA AGA CCT TC - 3'	66 °C
R3 5'-AGT ACA AAA CCC TGA TTT ACA AG - 3'	62 °C
S1 5'- CTA CAC CAA CTT TAG TCT CTT T - 3'	60 °C
S2 5'- GTC AAA GAT AGT AGC AAC AAG- 3'	58 °C

FTS_0815	T <sub>m</sub>
A 5'- CTC GAG ATT CCC TTA ATA GTA GGT TGC CA - 3'	64 °C
B 5'- TTT TAA TTT TAG TTT TTA AAC ATT TTA GCC TCC CTA AA - 3'	60 °C
C 5'- GCT AAA ATG TTT AAA AAC TAA AAT TAA AAT TAT TCT AAA TG 3'	60 °C
D 5'- GAG CTC AAT AAG TCT TGC TAG TGC TGG TA - 3'	64 °C
F1 5'- CTC CAA ACA ATC AGC ACT AAA TC - 3'	64 °C
R2 5'- GTA TTT ACC ACT ATC ATA AGA ACA A - 3'	64 °C
R3 5'- ATC AGT TCA GGA GGT CTT GGA - 3'	62 °C
S1 5'- GAT TGA CTA ATA GAA TAG CTT GT- 3'	60 °C
S2 5'- GCA AAT AGG TTA TTC TGG TCT TA- 3'	62 °C

FTS_1462	T <sub>m</sub>
A 5'- GCA TGT CTC GAG ATA GAT TGG CTT TGG TTT TTA C - 3'	56 °C
B 5'- CAT CAT CAA AAC CAG CTA CTT TCT TCA TAA TAA CTC T - 3'	62 °C
C 5'- TGA AGA AAG TAG CTG GTT TTG ATG ATG GTA GCG A - 3'	58 °C
D 5'- GCA TGT GAG CTC AGA TAC TGC TTT GCT TAT TGG T - 3'	60 °C
F1 5'- TAT TAT TCC CTG AGC CTG TAT T - 3'	60 °C
R2 5'- GGT ATG AAT CTG TTT GCG TAG - 3'	60 °C
R3 5'- ACC ATT CTA AAC ACC ATG ATA AC - 3'	62 °C
S1 5'- GTA GTT ACT TAG TTG ACC AAA G- 3'	60 °C
S2 5'- GTA ATC TGA TAT GAA GTT GTA GA- 3'	60 °C

## VEKTORY

pCR<sup>®</sup>4-TOPO

Invitrogen<sup>™</sup>

pDM4 (*mob*<sub>RP4</sub>; *ori*<sub>R6K</sub>; *sacB*; Cm<sup>R</sup>, *Francisella* suicide vector)

Milton et al, 1996

## KULTIVAČNÍ PŮDY A MÉDIA

<b>SOB médium</b>	složení:	2% Tryptone
		0,5% Yeast extract
		10 mM NaCl
		2,5 mM KCl

Směs byla autoklávována a následně k ní byly sterilně přidány tyto složky (po sterilizaci filtrací):

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

<b>SOC médium</b>	složení (1 liter):	Trypton (20g)
		Yeast Extract (5g)
		NaCl (0,5g)
		250 mM KCl (10 ml)
		2 M MgCl <sub>2</sub>
		1 M glukóza (filtrovaná, 20 ml)

**BMMs médium** složení: DMEM médium 1x + GlutaMax™-I  
10% teplotně inakt. FTSI  
10% médium z L929

**TB pufr (10x)** složení: 10 mM HEPES  
15 mM CaCl<sub>2</sub>  
250 mM KCl

Tato směs byla rozpuštěna ve vodě a následně bylo do směsi přidáno 55 mM MnCl<sub>2</sub>. Sterilizace filtrací.

**PBS (Sigma-Aldrich)** složení: 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
150 mM NaCl  
2 mM KCl  
2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH = 7,4

**McLeod kultivační půda** roztok I. (1 litr) GC Medium Base (72 g)  
deionizovaná voda (1 l)  
roztok II. (1 litr) hemoglobin (20 g)  
deionizovaná voda (1 l)

Roztok I byl připraven v den přípravy ploten, jeho složky byly smíchány a povařeny, až do rozpuštění. Roztok II byl připraven den předem. Jeho složky byly smíchány a za stálého míchání bobtnaly do druhého dne. Oba připravené roztoky byly autoklávovány při 121 °C po dobu 20 minut. Poté byly roztoky sterilně smíchány a ponechány vychladnout na 50 °C. Poté bylo do roztoku přidáno 20 ml IsoVitalu. Pokud bylo třeba, do média byla přidána příslušná antibiotika nebo sacharóza. Po promíchání roztoku bylo toto médium rozléváno do Petriho misek. Kultivační půdy byly ponechány s poodkrytými víčky, až do ztuhnutí. McLeod kultivační plotny byly uchovány v lednici.

**LB kultivační půda** (LB agar, Powder, Serva Electrophoresis)

LB agar (pevné médium, připraveno dle výrobce) byl rozvařen v mikrovlnné troubě. Poté byl roztok ochlazen ve vodní lázni na 50 °C a následně k němu byl sterilně přidán chloramfenikol (25 µg/ml) nebo kanamycin (50 µg/ml). Takto připravený roztok byl rozléván do Petriho misek, kde médium postupně utuhlo. LB kultivační plotny byly popsány (antibiotikum) a uchovány v lednici.

## Chamberlainovo médium

<b>Roztok 1</b>	% koncentrace	gramů na 2 litry
L-arginin-HCl	0,040	0,800
L-cystein-HCl	0,020	0,400
L-histidin-HCl	0,020	0,400
L-isoleucin	0,040	0,800
L-leucin	0,040	0,800
L-lysin-HCl	0,040	0,800
DL-prolin	0,200	4,000
DL-serin	0,040	0,800
DL-threonin	0,200	4,000
DL-valin	0,040	0,800
DL-methionin	0,040	0,800

<b>Roztok 2</b>		
glukóza	0,400	8,000

<b>Roztok 3</b>		
NaCl	1,000	20,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,100	2,000
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,100	2,000

<b>Roztok 4</b>		
L-asparagová kyselina	0,040	0,800
L-tyrosin	0,040	0,800

<b>Doplňky roztoku 1</b>	% konc.	navážit	ml vody	do 2 litrů média přidat
thiamin-HCl	0,0004	0,02 g	10	4 ml roztoku
spermin tetrahydrochlorid	0,004	0,08 g	10	10 ml roztoku
pantothenát vápenatý	0,0002	0,01 g	10	4 ml roztoku

<b>Doplňky roztoku 2</b>				
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0135	0,675	10	4 ml roztoku
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0002	0,01	10	4 ml roztoku

Roztoky 1, 2, 3 a 4 byly připraveny rozpuštěním ve 200 ml deionizované vody. Roztok 4 byl rozpouštěn za přidávání 3M NaOH (5-7 ml), až do rozpuštění zákalu. Do roztoku 1 a 2 byly přidány jejich doplňkové složky. Následně byly roztoky postupně smíchány, Do roztoku 1 byl přidán roztok 2 a směs byla důkladně promíchána. Dále byl přidán roztok 3 a vše bylo opět důkladně promícháno. Nakonec byl přidán roztok 4 s důkladným promícháním. Pomocí koncentrované HCl bylo upraveno pH na konečnou

hodnotu 6,3. Objem byl doplněn vodou do 2 l. Přes jednorázový filtr 0,22 µm byl roztok přefiltrován do sterilních lahví, které byly následně skladovány při 4 °C.

## **SOFTWARE**

Excel 2010

Microsoft Corporation

Word 2010

Microsoft Corporation

InfinityCapt

Vilber Lourmat

NEBcutter V2.0

New England BioLabs® Inc.

OligoAnalyzer 3.1

Integrated DNA Technologies

FLUOstar OPTIMA

BMG Labtech

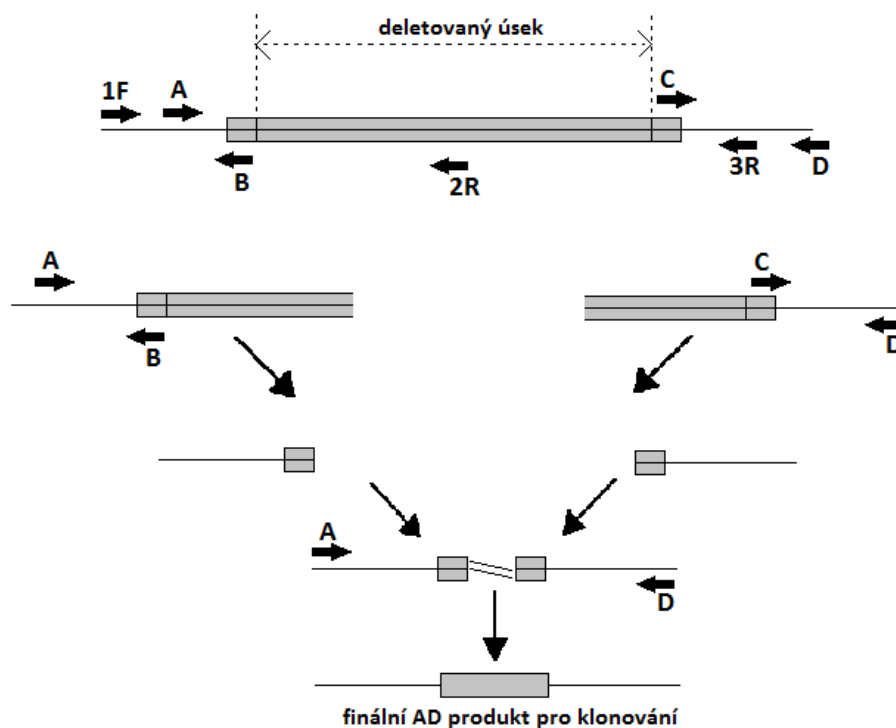
## **3.2. Metody**

### **3.2.1. Návrh primerů**

Příprava delečních mutantních kmenů bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 spočívá ve zhotovení delečního konstruktů pomocí tzv. overlap PCR. Primery byly navrženy podle genové sekvence, která byla zjištěna na webovém portálu NCBI (National Center for Biotechnology Information). Primery A, B, C a D sloužily k syntéze PCR produktů a primery 1F, 2R a 3R byly použity pro finální kontrolu mutantních kmenů. Dále byly navrženy primery pro sekvenaci nasyntetizovaného produktu, které jsou označeny jako S1 a S2. Primer A byl navržen cca 1 000 bp před samotným začátkem genu a primer D byl navržen cca 1 000 bp za koncem zájmového genu. Primery B a C byly navrženy tak, aby zahrnovaly start respektive stop kodon genu. Rozvržení jednotlivých primerů znázorňuje Obr. 6. U navržených primerů byla pomocí programu OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies) provedena kontrola tvorby vlásenek a dimerů primerů. OligoAnalyzer 3.1 je dostupný online na adrese: <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>. Dále byla pomocí NEBcutter V2.0 ověřena kompatibilita restričních enzymů (*XhoI*, *SacI*).

Navržené primery, které nasyntetizovala firma Generi Biotech s.r.o., byly resuspendovány v H<sub>2</sub>O dle pokynů výrobce na 100 mM zásobní roztoky. Dále z nich byly připraveny pracovní roztoky zředěním (10x), tzn. 10 µl 0,1 M primeru (A, B, C, D) + 90 µl H<sub>2</sub>O.





Obrázek 6: Rozvržení primerů pro syntézu delečního konstruktů

### 3.2.2. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza slouží k separaci makromolekul na základě jejich velikosti a průchodnosti skrze póry v gelu. Pro gelovou elektroforézu byl použit 1% agarózový gel připravený z agarózy (PCR agarose, Bio-Rad pro kontrolní PCR; GTC agarose, Cambrex pro izolaci z gelu) a 1x koncentrovaného TAE pufru (TAE buffer 50x, SERVA). Do tohoto roztoku byla přidána barva, která se váže na DNA, Sybr Safe DNA gel stain 10 000x (Invitrogen<sup>TM</sup>). Směs byla krátce povařena v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza úplně nerozpustila. Následně byl tento roztok nalit do plastové vaničky s hřebínkem, kde gel utuhnul. Pro separování vzorků byl gel přemístěn do elektroforetické vany, kde byl ponořen do 1x koncentrovaného TAE pufru (TAE buffer 50x, SERVA). Do vzniklých jamek byly aplikovány vzorky a do minimálně jedné jamky byl vpraven DNA standard (Gene Ruler 1kb DNA ladder ready-to-use, Thermo Scientific, 4 µl).

Elektroforetická aparatura (I-MUPID ADVANCE) byla nastavena na 100 V a 30 min.

### 3.2.3. Kultivace bakteriálních kultur *F. tularensis* a *E. coli*

Kultury *E. coli* byly kultivovány v tekutém LB médiu, při 37 °C a 200 rpm (případně 80 rpm pro kultivaci *E. coli* S17-1λpir před konjugací) nebo na pevných LB půdách s agarem, taktéž při 37 °C.

Kultury *F. tularensis* byly kultivovány na McLeod půdách při 37 °C nebo v chemicky definovaném Chamberlainově médiu při 37 °C a 200 rpm. Pro přípravu kultur byly použité zásobní zmražené kultury, které byly po vysetí a kultivaci pasážovány na novou McLeod půdu.

Pokud bylo třeba, byla do média přidána příslušná antibiotika. Pro *E. coli*: kanamycin (50 µg/ml), chloramfenikol (25 µg/ml). Pro *F. tularensis*: polymyxin B (75 µg/ml), chloramfenikol (2,5 µg/ml).

Pro kultivaci byl používán inkubátor 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator nebo třepací inkubátor Infors AG CH – 4103.

### 3.2.4. Příprava zásobních zmražených kultur

Z kultur bakterií, které nesly ve svém genomu požadovaný produkt, byly vytvořeny zásobní kultury, které byly uloženy v mrazícím boxu pro případné další použití. Zásobní kultury bakterií *E. coli* XL1, *E. coli* NEB Turbo a *E. coli* S17-1λpir byly vytvořeny sterilním smícháním 500 µl 60% glycerolu s 500 µl bakteriální suspenze, která byla připravena kultivací (37 °C, přes noc, 200 rpm, Infors AG CH – 4103) bakterií v tekutém LB médiu s příslušným antibiotikem. Zásobní kultury byly zmrazeny na -80 °C.

Zásobní kultury *F. tularensis* byly připraveny následovně. Kultura bakterií z McLeod plotny byla sterilně setřena bakteriologickou kličkou a resuspendována v 10 ml PBS. Dále byla změřena optická denzita této suspenze denzitometrem. Suspenze byla centrifugována při 4 °C a 6700 rpm po dobu 15 min (Eppendorf centrifuge 5804R). Vzniklá peleta byla resuspendována v 10 ml PBS a opět centrifugována za stejných podmínek. Peleta byla resuspendována ve fyziologickém roztoku s 10% glycerolem (10 ml). Tato suspenze byla rozdělena do kryotub po 250 µl. Tyto kryotuby byly zamrazeny na -150 °C (SANYO MDF - C2156VAN).

### 3.2.5. Izolace chromozomální DNA

Izolace chromozomální DNA bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 byla provedena pomocí AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad).

K základním principům izolace chromozomální DNA patří lyze buněk, kdy dojde k rozbití buněčné stěny a uvolnění DNA. K odstranění RNA a proteinů byla používána RNáza A. Poté, co jsou tyto složky odstraněny, dochází k přečištění a zkoncentrování DNA. Zakoncentrovaná DNA byla získána rozpuštěním ve vodě. Po získání chromozomální DNA byla provedena kontrola její čistoty a změřena koncentrace pomocí spektrofotometrického měření.

Pro izolaci chromozomální DNA *F. tularensis* byla připravena suspenze bakterií ve 2 ml PBS, jejíž optická denzita při vlnové délce 600 nm byla 0,6. Z této suspenze bylo přeneseno 500  $\mu$ l do 1,5 ml zkumavky a centrifugováno (15 s, 13 000 g). Poté, co byl supernatant opatrně odstraněn, bylo k peletě přidáno 300  $\mu$ l roztoku Genomic DNA Lysis Solution a pomocí pipety byla tato peleta resuspendována. Tato směs byla inkubována 5 min při 80 °C. Následně bylo k lyzátu přidáno 1,5  $\mu$ l RNasy A (4 mg/ml) a vzorek byl otáčením promíchán a poté inkubován 45 min při 37 °C.

Po ochlazení vzorku na laboratorní teplotu bylo k roztoku přidáno 100  $\mu$ l Protein Precipitation Solution následným vortexováním (20 s) a centrifugováním (3 min, 13 000 g) bylo docíleno precipitace proteinů, které se usadily ve formě pelety. Získaný supernatant byl přenesen do nové 1,5 ml zkumavky a bylo k němu přidáno 300  $\mu$ l isopropanolu. Vzorek byl jemně otáčením promíchán a centrifugací (1 min, 13 000 g) byla získána malá bílá peleta (DNA). Po opatrném odstranění supernatantu byla zkumavka obrácena dnem vzhůru, aby vytekl přebytečný isopropanol. Následně bylo k peletě DNA přidáno 300  $\mu$ l 80% etanolu a několikrát promícháno otáčením zkumavky. Centrifugací (1 min, 13 000 g) byla opět získána malá peleta. Po opatrném odstranění supernatantu byla zkumavka obrácena dnem vzhůru, ponechána 15 min, aby došlo k vysušení pelety.

Dále byla DNA hydratována přidáním 50  $\mu$ l DNA Hydration Solution a následně inkubována 5 min při 65 °C. Nakonec byla DNA vortexována 5 s při středních otáčkách, aby nedošlo k jejímu polámání a krátce centrifugována, aby byla veškerá DNA situována na dně zkumavky. Následně byla změřena koncentrace DNA.

### **3.2.6. Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA**

Stanovení čistoty a koncentrace získané DNA bylo měřeno pomocí spektrofotometru UV-VIS, IMPLÉN. Čistota DNA byla stanovena v poměru absorpčních hodnot A260/A280. DNA bývá nejčastěji kontaminována bílkovinami, které absorbují UV záření při vlnové délce 280 nm, a proto se v grafu projeví zvýšená hodnota A280. Vhodný vzorek DNA pro použití v molekulární biologii je vzorek s čistotou A260/A280 1,8 – 2,0. Koncentrace DNA byla měřena proti blanku, kterým byla nejčastěji čistá voda, ale lze použít i pufr, ve kterém byla DNA rozpuštěna. Koncentrace DNA byla měřena v ng/ $\mu$ l. K měření byl použit vždy vzorek o objemu 3  $\mu$ l, který byl nanášen na nanokvety LabelGuard<sup>TM</sup> Microliter Cell.

### **3.2.7. Restrikční štěpení**

Restrikční štěpení je způsob štěpení DNA pomocí restrikčních enzymů (restrikčních endonukleáz). Tyto enzymy jsou schopné štěpit fosfodiesterovou vazbu, která spojuje fosfátovou skupinu jednoho nukleotidu s cukernou složkou (deoxyribóza) nukleotidu druhého. Restrikční enzymy štěpí DNA ve specifickém místě tzv. rozpoznávací sekvenci, která je pro každý enzym jiná. Restrikční enzymy mohou DNA rozštěpit na tzv. kohezivní nebo tupé konce. V této práci byly použity restrikční enzymy *XhoI* a *SacI*. Tyto enzymy tvoří kohezivní konce. Rozpoznávací sekvence pro *SacI* je

GAGCT↓C ve směru 5'-3' a pro *XhoI* je C↓TCGAG ve směru 5'-3'. Restrikční štěpení je využíváno pro kontrolu zaklonování fragmentu do plazmidu (porovnání délek fragmentů) nebo k následnému vyštěpení požadovaného fragmentu. Složení směsi pro restrikční štěpení popisuje Tab. 2. Reakce probíhá ve vodní lázni při 37 °C nejméně 2 hodiny pro kontrolní restrikční štěpení, nejméně 4 hodiny pro následnou izolaci fragmentu z gelu.

<b>komponenty reakce</b>	<b>objem (μl)</b>
NEBuffer 4 (10x)	1
BSA (10x)	1
<i>XhoI</i>	0,5
<i>SacI</i>	0,5
H <sub>2</sub> O	5
plazmid obsahující AD	2

Tabulka 2: Komponenty kontrolního restrikčního štěpení plazmidů nesoucích AD produkt

Pro izolaci fragmentu AD z plazmidu pCR4 byla použita restrikční směs, jež je uvedena v Tab. 3.

<b>komponenty reakce</b>	<b>objem (μl)</b>
NEBuffer 4 (10x)	1
BSA (10x)	1
<i>XhoI</i>	0,5
<i>SacI</i>	0,5
H <sub>2</sub> O	3
plazmid obsahující AD	4

Tabulka 3: Komponenty restrikčního štěpení pro izolaci fragmentu AD z plazmidu

Pro restrikční štěpení plazmidu pDM4 a jeho následnou izolaci z gelu byla použita směs, jež vyjadřuje Tab. 4.

<b>komponenty reakce</b>	<b>objem (μl)</b>
NEBuffer 4 (10x)	2
BSA (10x)	2
<i>XhoI</i>	1
<i>SacI</i>	1
plazmid pDM4	14

Tabulka 4: Komponenty restrikčního štěpení plazmidu pDM4

Vzorky byly naneseny na agarózový gel a podrobeny gelové elektroforéze. Pomocí UV světla (Transluminator System Infinity 3026 WL) byly vzorky zobrazeny a díky programu Infinity Capt vyhodnoceny. Fragment odpovídající štěpenému plazmidu pDM4 byl z gelu vyříznut a izolován.

### 3.2.8. PCR reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR = Polymerase Chain Reaction) je biochemická reakce, která využívá termostabilní DNA-polymerázu (*Taq* polymeráza, *Pfu* polymeráza aj.) k syntéze nového řetězce podle templátu na základě komplementarity jednotlivých bází. Nejprve dochází k denaturaci DNA pomocí vysoké teploty (94 °C), kdy dojde k rozpletení dvouřetězcové DNA a vznikne požadované jednořetězcové vlákno, které slouží jako templát. Následně dojde k hybridizaci primerů (oligonukleotidů), tzv. annealing, taktéž na základě komplementarity bází. Teplota této fáze je určena poměrem nukleotidů obsažených v primerech ( $T = 4x (G+C) + 2x (A+T)$ ). Pro reakci byl použit tzv. forward primer, který je navržený na 5'konci řetězce a reverse primer, který je navržený na 3'konci řetězce. Přisednutím primerů na jednovláknovou DNA se označí úsek, který bude později amplifikován. Procesem elongace dojde k syntéze DNA řetězců pomocí DNA-polymerázy, která přiřazuje jednotlivé nukleotidy ve směru 5'-3'. Teplota elongace je zvolena dle použité polymerázy a čas dle délky amplifikovaného fragmentu.

PCR reakce byla použita pro amplifikaci fragmentů AB, CD, AD. Dále byla použita pro kontrolu izolovaných plazmidů nesoucích daný fragment a k ověření kolonií bakterií na přítomnost plazmidu s delečním či jiných požadovaným konstruktem (PCR na koloniích). K PCR byl použit DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler, BioRad. Složení PCR reakce s použitím *Pfu* polymerázy a Quick-Load *Taq* 2x Master Mix vyjadřují Tab. 5, 6, 7 a 8.

komponenty reakce	objem (μl)	PCR	teplota (°C), čas (s/min)	
H <sub>2</sub> O	19,25*	denaturace	94 °C, 45 s	30 cyklů
pufr pro <i>Pfu</i> polymerázu (10x)	2,5	denaturace	94 °C, 45 s	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75	annealing	55 °C, 45 s	
10 mM dNTP	0,5	elongace	72 °C, 4 min	
forward primer A	0,625	elongace	72 °C, 10 min	
reverse primer D	0,625			
templát AB	AB:CD = 1:1*			
templát CD	AB:CD = 1:1*			
<i>Pfu</i> polymeráza	0,5			

Tabulka 5: Složení a podmínky PCR reakce pro amplifikaci AD produktu

\* Objem templátu AB a CD je v poměru 1:1. Množství bylo určeno dle intenzity fragmentů po elektroforetické separaci. Dle těchto objemů bylo upraveno množství vody tak, aby celkový objem reakční směsi činil 25 μl.

komponenty reakce	objem (μl)	PCR	teplota (°C), čas (s/min)	
H <sub>2</sub> O	19,25	denaturace	94 °C, 45 s	30 cyklů
pufr pro <i>Pfu</i> polymerázu (10x)	2,5	denaturace	94 °C, 45 s	
25 mM MgCl <sub>2</sub>	0,75	annealing	55 °C, 45 s	
10 mM dNTP	0,5	elongace	72 °C, 2 min	
forward primer	0,625	elongace	72 °C, 10 min	
reverse primer	0,625			
DNA	0,25			
<i>Pfu</i> polymeráza	0,5			

Tabulka 6: Složení a podmínky PCR reakce s použitím *Pfu* polymerázy – amplifikace AB a CD fragmentů

komponenty reakce	objem (μl)	PCR	teplota (°C), čas (s/min)	
Quick-Load <i>Taq</i> 2x Master Mix	12,5	denaturace	94 °C, 30 s	25 cyklů
H <sub>2</sub> O	10,5	denaturace	94 °C, 30 s	
primer A	0,5	annealing	55 °C, 30 s	
primer D	0,5	elongace	68 °C, 2,5 min	
DNA	1	elongace	68 °C, 5 min	

Tabulka 5: Složení a podmínky PCR reakce s použitím Quick-Load *Taq* 2x Master Mix

Pro PCR na koloniích (ověřování přítomnosti plazmidu s delečním konstruktem) byla templátová DNA připravena v titrační destičce, kdy byly kolonie rozmíchány v 10 μl vody. Z 10 μl byl použit 1 μl pro reakci PCR. V případě ověřování transformantů byly kolonie duplicitně přeneseny na novou LB kultivační plotnu s antibiotikem (stejnou kličkou, jakou byl připravován templát).

### PCR pro ověření mutantů *F. tularensis*

PCR byla prováděna na koloniích, které rostly na plotně bez chloramfenikolu a zároveň nerostly na plotně s chloramfenikolem (tyto kolonie byly testovány, neboť potenciální mutantní kmen v sobě již nenese rezistenci na chloramfenikol). PCR reakce proběhla následovně. V reakci byl použit 1 μl testované DNA, který byl připraven rozmícháním vzorku v 10 μl vody a následně byl zahříván na 95°C po dobu 10 min. (Thermoshaker TS-100 BIOSAN) Pro každý vzorek byly připraveny dvě reakce, jejichž složení znázorňuje následující Tab. 8.

komponenty	1. reakce (μl)	2. reakce (μl)
Quick-Load <i>Taq</i> 2x Master Mix	6,25	6,25
primer 1F	0,25	0,25
primer 2R	0,25	-----
primer 3R	-----	0,25
H <sub>2</sub> O	4,75	4,75
testovaná DNA	1	1

Tabulka 6: PCR na koloniích - testování potenciálních mutantních kmenů. Podmínky reakce viz tabulka 7 (čas 1. elongace se liší v závislosti na délce produktu 1kb = 1 min)

Místo pro navázání primeru 2R se nachází v sekvenci deletovaného genu. Pokud tedy nevznikne žádný produkt v reakci "1F2R" a zároveň vznikne produkt v reakci "1F3R", můžeme po zkontrolování délek vzniklých fragmentů považovat vzorek za pozitivně testovaný mutantní kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Pozitivní kolonie byly přepasážovány na novou McLeod kultivační plotnu a byly kultivovány do druhého dne (37°C). Druhý den byly vytvořeny zásobní kultury.

### 3.2.9. Klonování

Klonování obecně slouží ke kopírování DNA a vytváření identických klonů. Z praktického hlediska se jedná o kopírování určitého úseku DNA (cizorodého) buňkami, v našem případě buňkami bakteriálními. Zmíněný úsek DNA byl vytvořen molekulárně-genetickými metodami, jež zahrnuje tuto kapitola. Jedná se o TOPO klonování, ligaci a transformaci. Ke klonování byly použity klonovací plazmidové vektory pDM4 a pCR<sup>®</sup>4-TOPO a buňky *E. coli* XL1, NEB Turbo a S17-1 $\lambda$ pir.

### Ligace

Ligace je proces, při kterém za pomoci DNA ligáz, dochází ke spojení kohezivních nebo tupých konců DNA. Při ligaci vznikají rekombinantní plazmidy, které lze později použít pro transformaci. DNA ligáza je základní enzym, jehož aktivita hraje hlavní roli v replikaci a reparaci DNA. Z molekulárního hlediska dochází k vytvoření fosfodiesterové vazby mezi fosfátovou skupinou jednoho nukleotidu a cukernou složkou (deoxyribóza) nukleotidu druhého.

Na základě koncentrace AD fragmentů, které byly získány štěpením a následnou izolací z vektoru pCR4, a štěpeného pDM4 plazmidu, byla stanovena ligační směs, která byla následně použita pro samotnou transformaci. Pro výpočet množství jednotlivých složek ligační směsi byl použit kalkulátor ligace, který je dostupný online na adrese: [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html). Pro ligaci byl použit vektor pDM4 o velikosti 6 000 bp a množství 50 ng. Poměr molarity volných konců vektoru a použitého AD fragmentu byl nastaven na 1:4. Dále bylo podle velikosti jednotlivých fragmentů (bp) stanoveno množství těchto fragmentů do ligační směsi (ng). Na základě změřené koncentrace (Spektrofotometr UV-VIS, IMPLEN) AD fragmentů a zjištěného potřebného množství těchto fragmentů byl vypočítán objem ( $\mu$ l) použitelný do ligační směsi.

Ligační směs byla připravena do 10  $\mu$ l následně (Tab. 9).

komponenty ligace	objem ( $\mu$ l)
Quick Ligase	0,5
Quick Ligase Reaction Buffer (2x)	5
AD + pDM4 + H <sub>2</sub> O	5

Tabulka 7: Ligační směs

Ligační směs byla inkubována 5 min při 25 °C, poté byla připravena k okamžitému použití či zamrazení.

## Transformace

Transformace je proces, kdy dochází k zabudování plazmidu, který nese požadovaný konstrukt (v našem případě fragment AD), do jiného organismu (bakterie). V této práci byla transformace využita pro vnesení plazmidu pCR<sup>®</sup>4-TOPO se zabudovaným AD fragmentem do buněk *E. coli* XL1, při zabudování plazmidu pDM4, který obsahoval fragment AD do buněk *E. coli* NEB Turbo a při zabudování plazmidu ADpDM4 do buněk *E. coli* S17-1λpir.

Transformace ADpDM4 do *E. coli* NEB Turbo byla započata přidáním 5 µl ligační směsi ke kompetentním buňkám *E. coli* NEB Turbo. Tato směs byla ponechána 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok, kdy byla směs zahřívána na 42 °C po dobu 30 s. Následně byla směs opět ochlazena pomocí ledu po dobu 2 min. Poté bylo do směsi přidáno 950 µl růstového SOC média (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.) a směs byla kultivována při 37°C po dobu 1 hod v třepacím inkubátoru (200 rpm, Infors AG CH - 4103).

Po inkubaci byla směs centrifugována (2 min, 6000 rpm), přibližně 500 µl SOC média bylo odstraněno a vzniklá peleta byla pomocí pipety resuspendována ve zbylém médiu. Směs transformované *E. coli* NEB Turbo byla sterilně vyseta na kultivační LB plotnu s chloramfenikolem. Vzorek byl inkubován (37°C, 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator) do druhého dne, dokud na plotně nevyrostly kolonie. Tyto kolonie byly následně testovány metodou PCR na koloniích na přítomnost transformovaného AD fragmentu.

Transformace plazmidu ADpDM4, který byl izolován z buněk *E. coli* NEB Turbo, do buněk *E. coli* S17-1λpir byla provedena obdobně, s určitými změnami. K 50 µl buňkám *E. coli* S17-1λpir bylo po rozmrazení přidáno **75 µl 0,1M CaCl<sub>2</sub>**. Následně byl k suspenzi přidán plazmid ADpDM4 v množství dle jeho naměřené koncentrace (100 ng k 50 µl buněk). Směs byla 30 min inkubována na ledu. Dále byl proveden teplotní šok, kdy byla směs zahřívána na **42 °C po dobu 1 min a 30 s** a hned poté ochlazena na ledu po dobu 2 min. K buňkám bylo přidáno 900 µl růstového SOC média (New England BioLabs<sup>®</sup> Inc.) a bakteriální suspenze byla kultivována v třepacím inkubátoru (37 °C, 200 rpm, Infors AG CH - 4103) po dobu 1 hod. Po inkubaci byla směs centrifugována (2 min, 6 000 rpm, PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific) a následně bylo odstraněno 500 µl média. Peleta byla pomocí pipety resuspendována ve zbylém médiu. Bakteriální suspenze byla sterilně vyseta na LB plotny s chloramfenikolem a kultivována přes noc v kultivačním boxu (37 °C, 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator). Na těchto koloniích byla pro kontrolu provedena PCR na koloniích

Transformace ADpCR4 do buněk *E. coli* XL1 je popsána v rámci kapitoly TOPO klonování, neboť na něj bezprostředně navazuje.



## TOPO klonování

TOPO klonování slouží k zaklonování delečního konstruktů, v našem případě PCR produktu AD, do plazmidového vektoru pCR<sup>®</sup>4-TOPO. Ke klonování byl použit TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen). Vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO je plazmid o velikosti 3,9 kb a nese rezistenci na kanamycin a ampicilin. V místě, kde dochází k zaklonování produktu, má tento vektor 3'-T přesahy. Pro zaklonování je nutné k PCR produktu připojit 3'-A přesahy, aby došlo ke spojení nukleotidů na základě komplementarity bází. Tyto přesahy byly vytvořeny pomocí *Taq* polymerázy následovně. V 1,5 ml zkumavce byl smíchán PCR produkt (10,75 µl), pufr pro *Taq* polymerázu (10x) v množství 1,25 µl, 10 mM dATP (0,25 µl) a *Taq* polymeráza (0,25 µl). Směs byla inkubována 10 min při 72 °C (Thermoshaker TS-100 BIOSAN). Poté byl PCR produkt s 3'-A přesahy v množství 4 µl smíchán se Salt solution (1 µl) a pCR<sup>®</sup>4-TOPO vektorem (1 µl). Tato směs byla inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Poté byla směs přesunuta na led a přidána ke 100 µl chemokompetentních buněk *E. coli* XL1. Po 30 minutové inkubaci na ledu byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 30 s (Thermoshaker TS-100 BIOSAN) a poté byla směs ihned přesunuta na led. K buňkám bylo přidáno 400 µl kultivačního SOC média, které bylo přehřáté na 42 °C. Buňky *E. coli* XL1 byly inkubovány v třepacím inkubátoru (37 °C, Infors AG CH - 4103) po dobu 1 hodiny.

Buněčná suspenze byla vyseta na LB kultivační plotny s kanamycinem (50 µg/ml). Tyto plotny byly přes noc inkubovány (37 °C, 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator).

Kolonie *E. coli* XL1 nesoucí plazmid pCR4 se zabudovaným AD fragmentem - ADpCR4- byly testovány pomocí PCR na koloniích.

### 3.2.10. Izolace DNA z agarózového gelu

Amplifikované fragmenty nebo vzorky po restričním štěpení byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Pokud bylo třeba DNA fragment z gelu izolovat, DNA byla zviditelněna s použitím filtru, který měnil UV světlo na modré (Transluminator System Infinity 3026 WL). Výsledný snímek byl pomocí programu Infinity Capt analyzován. Následně byla provedena izolace fragmentů z agarózového gelu pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

Fragmenty byly vyříznuty z gelu a přemístěny do 1,5 ml zkumavky. Dle hmotnosti gelových fragmentů k nim bylo přidáno 3x více objemu pufru QG a následně byly zkumavky zahřívány na 50 °C po dobu 10 min. Poté bylo ke směsi přidáno stejné množství isopropanolu jako byla hmotnost gelu a vše bylo přepipetováno do zkumavky s membránou "spin column". Následnou centrifugací (1 min, 13 000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific) byla zachycena DNA na membráně. Přidáním 500 µl pufru QG a následnou centrifugací (1 min, 13 000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific) byla DNA na membráně propláchnuta. Přidáním 750 µl pufru PE a ponecháním 5 min stát byla DNA promyta a došlo k odstranění přebytečných solí. Dvakrát po sobě jdoucí centrifugací (1 min, 13 000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific) byl odstraněn pufr. Nakonec byla provedena eluce 15 µl H<sub>2</sub>O. Směs byla ponechána 1 min stát a část zkumavky s membránou byla

umístěna do 1,5 ml zkumavky. Centrifugací (1 min, 13 000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific) byl získán roztok DNA. Nakonec byla změřena koncentrace izolovaných fragmentů (Spektrofotometr UV-VIS, IMPLEN).

### **3.2.11. Příprava chemokompetentních buněk**

V této práci byly použity pro transformaci buňky *E. coli* XL1, *E. coli* NEB Turbo a *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir. *E. coli* NEB Turbo byly komerčně dodávané, zbylé musely být upraveny tak, aby se staly kompetentními a byly schopné přijmout cizorodou DNA. V této práci byly vytvořeny kompetentní buňky chemickou cestou, proto jsou to buňky chemokompetentní.

Chemokompetentní buňky *E. coli* XL1 byly připraveny z narostlé kultury *E. coli* XL1. Kolonie byly zaočkovány do 50 ml SOB média a kultivovány (37 °C, Infors AG CH – 4103) do  $OD_{600} = 0,6$ . Kultura buněk byla následně inkubována 10 min na ledu a poté byla 10 min centrifugována (2 500 g, 4 °C, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific). Vzniklá peleta byla resuspendována v 20 ml studeného TB pufru a inkubována 10 min na ledu. Poté byla směs opět 10 min centrifugována (2 500 g, 4 °C, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) a následně resuspendována ve 4 ml studeného TB pufru. Následně bylo do směsi přidáno 0,28 ml DMSO (konečná koncentrace 7 %) a poté byla směs inkubována 10 min na ledu. Chemokompetentní buňky *E. coli* XL1 byly po 200  $\mu$ l přeneseny do 1,5 ml zkumavek a zamrazeny na -80 °C.

Chemokompetentní buňky *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir byly připraveny následovně. Buňky *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir byly zaočkovány do tekutého LB média a kultivovány přes noc (37 °C, 200 rpm, Infors AG CH – 4103). Z této kultury bylo napipetováno 100  $\mu$ l suspenze do 100 ml nového LB média a ponecháno kultivovat (37 °C, 200 rpm, Infors AG CH – 4103) do  $OD_{600} = 0,4-0,6$ . Suspenze byla přesunuta na led a rozdělena do vychlazených 50 ml zkumavek. Zkumavky s buněčnou suspenzí byly kultivovány 15-30 min na ledu. Poté byly zkumavky centrifugovány (4 °C, 6 000 rpm, 8 min, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) a vzniklá peleta byla resuspendována v 25 ml vychlazeného 0,1 M  $MgCl_2$ . Suspenze byla centrifugována (4 °C, 6 000 rpm, 8 min, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific) a peleta byla resuspendována v 25 ml vychlazeného 0,1 M  $CaCl_2$ . Buňky byly 20 min inkubovány na ledu a poté opět centrifugovány (4 °C, 6 000 rpm, 8 min, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific). Peleta byla resuspendována v 1 ml vychlazeného 0,1 M  $CaCl_2$  s 14% glycerolem. Chemokompetentní buňky *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir byly po 50  $\mu$ l napipetovány do vychlazených 1,5 ml zkumavek. Zásobní kultury byly zmrazeny na -80 °C.

### **3.2.12. Izolace plazmidové DNA**

Pro izolaci plazmidu z bakteriální kultury byl použit kit QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN.

Přes noc narostlá bakteriální kultura s požadovaným zabudovaným plazmidem byla postupně přenesena do dvou 1,5 ml zkumavek a centrifugována (1 min,

13 000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific). Vzhledem k množství materiálu byl postup několikrát opakován, dokud nebyla celá kultura zcentrifugována. Získaná bakteriální peleta byla resuspendována pufr P1 (250 µl). Následně byl přidán pufr P2 (250 µl) a získaná suspenze byla ručně promíchána otáčením zkumavek (4-6x). Poté byla suspenze ponechána 5 min při pokojové teplotě lyzovat. Poté byl přidán pufr N3 (350 µl) a opět byla suspenze ručně promíchána otáčením zkumavek (4-6x). Tímto postupem bylo docíleno vysrážení bílkovinného materiálu z bakteriálních buněk. Následnou centrifugací (10 min, 13 000 rpm) byl získán supernatant, který byl poté přenesen do speciálních zkumavek s membránou "spin column". Centrifugací (1 min, 13 000 rpm) byla směs přefiltrována přes membránu, kde byla zachycena DNA (plazmid). Filtrát byl odstraněn. Dále byl na membránu nanesen pufr PB (500 µl) a centrifugací (1 min, 13 000 rpm) byla membrána promyta. Filtrát byl opět odstraněn. Následně byl přidán pufr PE (750 µl) a centrifugací (1 min, 13 000 rpm) byla membrána s DNA promyta. Po odstranění filtrátu byla zkumavka ještě jednou centrifugována, aby došlo k úplnému odstranění zbytků etanolu. Část zkumavky s membránou byla přenesena do nové 1,5 ml zkumavky. Na membránu bylo naneseo 30 µl vody a DNA byla ponechána se 1 min rozpouštět. Centrifugací (1 min, 13 000 rpm) byla získána plazmidová DNA, jejíž koncentrace byla změřena na spektrofotometru (Spektrofotometr UV-VIS, IMPLÉN).

Pomocí kontrolní PCR reakce a kontrolního restriční štěpení byla ověřena správnost plazmidové sekvence. Pro další kontrolu byl produkt sekvenován Střediskem sekvenování při MBÚ AV ČR, za použití univerzálních sekvenačních primerů T7 a M13 reverse a sekvenačních primerů S1 a S2.

Izolace plazmidové DNA byla provedena pro získání plazmidu pDM4, pDM4 se zabudovaným fragmentem AD a plazmidu pCR4 se zabudovaným fragmentem AD.

### **3.2.13. Konjugace *E. coli* S17-1λpir s *F. tularensis* FSC200**

Plazmid pDM4, který byl použitý jako vektor pro přenos delečního konstrukt, není schopen se replikovat v buňkách *F. tularensis* a v případě nezačlenění tohoto plazmidu do chromozomu by došlo k jeho zániku při dělení bakterie. Proto dochází k jeho začlenění do chromozomu pomocí homologní rekombinace. První homologní rekombinace probíhá při konjugaci *E. coli* S17-1λpir (nesoucí plazmid pDM s delečním konstruktem) a *F. tularensis* FSC200, kdy dochází k začlenění celého plazmidu pDM4 (i s delečním konstruktem) na chromozom *F. tularensis*. Druhá homologní rekombinace probíhá pomocí sacharózové selekce, kdy dochází k vyštěpení plazmidu pDM4 z chromozomu, ale deleční konstrukt na chromozomu zůstává. K odstranění plazmidu pDM4 dochází v důsledku přítomnosti *sacB* genu, jehož produkt mění sacharózu na toxický produkt pro gram-negativní bakterie. V procesu sacharózové selekce je 50% pravděpodobnost, že vznikne požadovaný mutantní kmen, neboť k druhé homologní rekombinaci může docházet na dvou místech. V případě, že se tato rekombinace neuskuteční na vhodném místě, vznikne původní kmen *F. tularensis* FSC200 (Obr. 4).

Proces konjugace, kdy konjuguje *E. coli* S17-1λpir (nesoucí plazmid pDM4 s delečním konstruktem) a *Francisella tularensis* FSC200, probíhá následně. První den

byly připraveny buněčné kultury. *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir , které byly kultivovány v LB médiu (10 ml) s chloramfenikolem (25  $\mu$ g/ml,) přes noc, při 37°C v kultivačním třepacím inkubátoru (200 rpm, Infors AG CH - 4103). Dále byla připravena pasáž kultury FSC200 na novou McLeod plotnu, která byla rovněž kultivována přes noc, při 37°C v kultivačním inkubátoru (5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator).

Druhý den byla provedena samotná konjugace. Z kultury *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir byla připravena nová suspenze buněčné kultury v LB médiu s chloramfenikolem (25  $\mu$ g/ml), a to o optické denzitě 0,1. Tato suspenze byla následně kultivována při 37°C a 80 rpm (Infors AG CH - 4103) dokud kultura nedosáhla optické denzity 0,5 - 0,6. Optická denzita byla měřena na denzitometru (WPA CO 8000 Cell Density Meter). Z takto získané kultury bylo odebráno 500  $\mu$ l a centrifugováno (5 min, 6000 rpm, Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific). Supernatant byl odstraněn. Kultura FSC200 byla resuspendována ve 2 ml PBS tak, aby vzniklá suspenze měla hodnotu  $OD_{600} = 1$ . Z této suspenze bylo odebráno 500  $\mu$ l a centrifugováno 2 min, 13000 rpm. Supernatant byl rovněž odstraněn. K peletám *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir a *F. tularensis* FSC200 bylo přidáno 25  $\mu$ l PBS + 10 mM  $MgSO_4$  a pelety byly resuspendovány pomocí pipety. Resuspendovaná kultura *F. tularensis* FSC200 byla přenesena k buněčné suspenzi *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir. Vzniklá buněčná suspenze byla přenesena na LB kultivační plotnu, resp. byla umístěna v podobě jedné velké kapky na zmíněnou plotnu. Tato kultivační LB plotna s buněčnou kulturou byla ponechána přes noc při pokojové teplotě.

Třetí den byla narostlá kultura resuspendována ve 150  $\mu$ l PBS + 10 mM  $MgSO_4$  a vyseta na dvě kultivační McLeod plotny, které obsahovaly polymyxin B (75  $\mu$ g/ml) a chloramfenikol (2,5  $\mu$ g/ml) (75  $\mu$ l suspenze vyseto na jednu plotnu). Následně byly kultury ponechány v kultivačním inkubátoru (5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator) při 37 °C po dobu pěti dnů. Narostlé kolonie byly přeneseny na novou McLeod kultivační plotnu s chloramfenikolem (2,5  $\mu$ g/ml) čárkovací metodou a kultivovány do druhého dne při 37 °C.

### 3.2.14. Sacharózová selekce

Při sacharózové selekci dochází k již zmíněné druhé homologní rekombinaci, kdy dochází k vyštěpení plazmidu pDM4 z chromozomu.

Buněčné kultury, které narostly na McLeod plotně s chloramfenikolem (2,5  $\mu$ g/ml), byly resuspendovány ve 2 ml PBS (každá kolonie zvlášť). Ze vzniklé suspenze byla vytvořena ředící řada do  $10^{-4}$  následovně: do čtyř zkumavek bylo dáno 450  $\mu$ l PBS, z buněčné suspenze bylo odebráno 50  $\mu$ l a přeneseno do první zkumavky, která byla následně promíchána vortexem. Z této zkumavky bylo odebráno opět 50  $\mu$ l a vloženo do zkumavky druhé. Tento postup byl opakován až do čtvrté zkumavky. Z ředění  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  bylo vyseto 100  $\mu$ l na McLeod plotnu s 5% sacharózy. Následně byly tyto vzorky kultivovány v kultivačním inkubátoru (5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator) při 37 °C, po dobu dvou dnů.

Získané kolonie byly přeneseny na McLeod plotnu s chloramfenikolem a na McLeod plotnu bez chloramfenikolu, resp. každá kolonie byla rozčárkována na tyto dvě plotny za použití jedné kličky (replica plating). Tyto vzorky byly kultivovány (5215-2

SHEL LAB CO2 Incubator) při 37 °C do druhého dne. Klony rostoucí na plotně bez antibiotika a zároveň nerostoucí na plotně a antibiotikem byly považovány za potenciální mutantní kmeny a byly dále testovány pomocí PCR na koloniích.

### **3.2.15. Infekce myši typu BALB/c**

Pro testování mutantních kmenů *F. tularensis* byly použity laboratorní myši typu BALB/c. Mutantní kmen byl testován ve dvou ředěních ( $3 \times 10^2$  a  $3 \times 10^6$  bakterií/myš). Kmen *F. tularensis* FSC200 byl aplikován v ředění  $3 \times 10^2$  bakterií/myš. Pro kontrolu byl další skupině myši subkutánně aplikován fyziologický roztok. Pro každou skupinu bylo použito 5 myší.

Pro přípravu ředící řady bakteriální suspenze do  $10^{-5}$  byla použita bakteriální suspenze *F. tularensis* FSC200 a mutantních kmenů o optické densitě ( $OD_{600 \text{ nm}}$ ) 1 ( $= 3 \times 10^9$  bakterií / 1 ml) ve 4 ml PBS. Pro aplikaci *F. tularensis* FSC200 a mutantního kmene v ředění  $3 \times 10^2$  bylo použito 200  $\mu$ l suspenze ředění  $10^{-5}$  a 3,8 ml fyziologického roztoku. Pro aplikaci mutantního kmene *F. tularensis* FSC200 v ředění  $3 \times 10^6$  bylo použito 200  $\mu$ l suspenze ředění  $10^{-1}$  a 3,8 ml fyziologického roztoku. Myši byly infikovány subkutánně dávkou 200  $\mu$ l těchto suspenzí.

Skutečný počet aplikovaných bakterií (CFU) byl určen výsevem bakteriálních suspenzí na McLeod plotny.

Projevy onemocnění byly sledovány po dobu 21 dní. Případný úhyn byl zaznamenán do úhynového listu.

### **3.2.16. Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů**

Pro izolaci myších makrofágů byly použity laboratorní myši typu BALB/c (z 1 ks bylo získáno cca  $1,5 \times 10^7$  buněk). Myši byly uspány v diethyléteru, uchyceny na pitevní desku a následně usmrceny stříhem do krčních tepen. Po usmrcení bylo břicho a zadní končetiny ošetřeny 70% etanolem a kůže byla nastřížena od oblasti břicha až k zadním končetinám. Po odstranění kůže byly zadní končetiny odděleny od těla v oblasti pánve a uchovány v DMEM médiu.

Další kroky bylo nutné provést sterilně, za použití Bioair S@feFlow 1.2. Při práci s buňkami byly dodržovány postupy pro práci s buněčnými kulturami. Pro další postup byl použit 6-ti jamkový panel, přičemž v první jamce byl 70% etanol a v dalších pěti jamkách DMEM médium. Nejprve byly zadní končetiny ponořeny do první jamky (70% etanol) a vydesinfikovány. Následně byly tyto končetiny postupně oplachovány v jamkách č. 2, 3 a 4 (DMEM médium). Poté byly od sebe odděleny holenní a stehenní kost, kdy bylo nutné nepřestříhnout či jinak nepoškodit kost či kloub, aby nedošlo ke kontaminaci buněk. Poté, co byla důkladně odstraněna svalová tkáň, jednotlivé kosti byly přemístěny do poslední jamky s DMEM médiem.

Pro získání kostní dřeně bylo nutné odstříhnout konce kostí - těsně pod kloubem- a propláchnout kost z obou stran cca 2 ml DMEM média (jehla: 25-28 G) do 50 ml zkumavky. Získaná směs byla důkladně propipetována a poté ponechána 1 min

stát, aby se usadily větší kusy tkáně. Supernatant byl přenesen do nové 50 ml zkumavky a centrifugován (5 min, 400 g, RT, Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific).

Po odlití supernatantu byly buňky rozředěny v 1 ml BMMs média (penicilin 10 000U/ml + streptomycin 10 mg/ml) a následně doplněny do 10 ml tímto médiem. Počet buněk na 1 ml suspenze byl spočítán v Bürkerově komůrce (50  $\mu$ l buněčné suspenze a 50  $\mu$ l trypanové modři (0,5%, PBS)) a dle těchto hodnot byl spočítán objem buněčné suspenze, který byl použit pro diferenciaci v kostně dřevňové makrofágy na Petriho miskách.

Pro kultivaci kostně-dřevňových myších makrofágů byly použity Petriho misky o průměru 90 mm. Celkový objem kultivační směsi na Petriho misce činil 15 ml, přičemž objem buněčné suspenze byl vypočítán dle zjištěné koncentrace pomocí Bürkerovy komůrky (požadovaná koncentrace kostně dřevňových buněk v kultivační misce je  $6 \times 10^6$  buněk /ml). Zjištěný objem byl doplněn do 15 ml BMMs médiem.

Petriho misky s buněčnou suspenzí byly kultivovány (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Incubator IR Sensor, SANYO) a po čtyřech dnech byla provedena částečná výměna média, tzn., že bylo odebráno 7,5 ml média, které bylo nahrazeno novým DMEM médiem s 10% FTSI (7,5 ml). Po týdnu byly diferencované makrofágy nasazeny na 24 jamkový panel.

### **3.2.17. Proliferace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a mutantních kmenů v primárních kostně dřevňových makrofázích**

Proliferace *F. tularensis* v kostně dřevňových makrofázích je nezbytnou součástí testování mutantních kmenů bakterie *in vitro*. Výsledky proliferace vypovídají o životaschopnosti bakterie v makrofázích v laboratorních podmínkách.

Petriho misky s inkubovanými makrofágy byly zkontrolovány pod mikroskopem. Z těchto misek bylo sterilně odsáto médium a buňky byly jednou promyty přehřátým přefiltrovaným PBS (10 ml). Poté, co byly buňky promyty teplým PBS, bylo na každou misku nanášeno 4 ml studeného PBS a buňky byly pomocí mikrobiologické škrabky seškrábány ze dna misky. Směs buněk a PBS byla důkladně propipetována a přenesena do 50 ml zkumavky. Misky byly ještě jednou promyty studeným PBS (4 ml) a roztok byl přenesen do téže zkumavky. Následně byl vzorek centrifugován (1250 rpm, 5 min, RT, JOUAN CR 312). Po centrifugaci bylo PBS odstraněno a buňky byly důkladně resuspendovány v 1 ml DMEM + 10% FTSI médiu. Po resuspendování byla suspenze buněk doplněna do 10 ml DMEM + 10% FTSI médiem. Pomocí Bürkerovy komůrky byla spočítána koncentrace buněk v 1 ml. Následně bylo podle této hodnoty vypočítáno množství suspenze nasazované na 24 jamkový panel (celkem 4 panely pro 4 časové intervaly) tak, aby odpovídalo koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk/jamku. Do jamek na panelech (pro každý typ bakterie byly použity 3 jamky) bylo napipetováno DMEM + 10% FTSI médium (1 ml - vypočítaný objem buněčné suspenze). Následně byla přidána buněčná suspenze doprostřed jamky s DMEM + 10% FTSI médiem a obsah jamek byl promíchán pohybem "do čtverce". Panely byly uloženy do druhého dne v kultivačním boxu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Incubator IR Sensor, SANYO).

Následující den byla připravena bakteriální suspenze *F. tularensis* FSC200 a mutantního kmene z již den předem naočkované McLeod plotny, která byla kultivována při 37 °C, (5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator). Bakteriální suspenze byly připraveny do 4 ml PBS o optické densitě (OD<sub>600 nm</sub>) 1. Z takto připravené bakteriální suspenze byl odebrán 1 ml a přenesen do 1,5 ml zkumavky. Následnou centrifugací (7 min, 7 000 rpm, 4 °C, Eppendorf centrifuge 5804R) byla získána peleta bakterií, která byla resuspendována v 1 ml kultivačního média DMEM + 10% FTSI. Pro kontrolu byl proveden kontrolní výsev pro odečet CFU v ředění 10<sup>-7</sup> na McLeod kultivační plotny (50 µl bakteriální suspenze). Tyto plotny byly kultivovány v inkubačním boxu (37 °C, 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator).

Z jamek na 24 jamkových destičkách (4 panely) bylo odsáto 750 µl média a do každé jamky byla přidána suspenze bakterií o MOI = 50. Při našich hodnotách (5 x 10<sup>5</sup> makrofágů v 1 jamce; 3 x 10<sup>9</sup> bakterií v 1 ml suspenze o OD = 1) bylo přidáno 8,4 µl bakteriální suspenze do 1 jamky.

Takto připravené 24 jamkové panely byly centrifugovány (5 min, 400 g, RT, JOUAN CR 312). Od této chvíle byl započat "čas = 0" pro jednotlivé časové intervaly proliferace (1 hod, 6 hod, 24 hod, 48 hod). Po centrifugaci byl panel uložen na 30 min do kultivačního boxu (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Incubator IR Sensor, SANYO). Poté byly jamky 3x promyty teplým PBS a následně do nich byl napipetován 1 ml DMEM média + 10% FTSI s gentamicinem (5 µg/ml). Během inkubace (30 min, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Incubator IR Sensor, SANYO) došlo k odstranění zbývajících extracelulárních bakterií. Po inkubaci byly jamky s přisedlými makrofágy 3x promyty teplým PBS a opět kultivovány v 1 ml DMEM médiu + 10% FTSI (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Incubator IR Sensor, SANYO) do konce jednotlivých časových intervalů. Po skončení inkubace byla provedena lyze. Z jednotlivých jamek bylo odstraněno médium a buňky byly 3x promyty předehřátým PBS (platí pro intervaly 1 hod, 6 hod), 1x promyty (platí pro interval 24 hod) a nepromývány (platí pro interval 48 hod). Následně byly buňky lyzovány (na ledu) pomocí 0,1% deoxycholátu sodného (100 µl). Během lyzační doby (5 min) byly buňky opakovaně protahovány špičkou pipety. Poté byly jamky doplněny 900 µl PBS. Z takto připravené bakteriální suspenze byly zhotoveny ředící řady dle Tab. 10.

čas odběru CFU	ředění <i>F. tularensis</i> FSC200	ředění mutantního kmene
1 hod	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup>
6 hod	10 <sup>-4</sup> , 10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup>
24 hod	10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup> , 10 <sup>-6</sup>
48 hod	10 <sup>-6</sup> , 10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-5</sup> , 10 <sup>-6</sup>

Tabulka 8: Ředění pro CFU v jednotlivých časových intervalech

Z příslušných ředění v jednotlivých časových intervalech bylo vyseto 50 µl naředěné buněčné suspenze na McLeod plotny. Výsev byl proveden duplicitně, tzn., že jedno ředění bylo vyseto na dvě plotny. Vzorky byly kultivovány (37 °C, 5215-2 SHEL LAB CO2 Incubator) do nárůstu bakterií. Následně byl proveden odečet narostlých kolonií na jednotlivých plotnách a pomocí Microsoft Excel 2010 byl sestaven graf

proliferace *F. tularensis* FSC200 a mutantních kmenů v kostně-dřeňových myších makrofázích (viz kap. Výsledky).

### 3.2.18. Měření růstové křivky

K měření růstové křivky byl využit přístroj FluoStar Optima, BMG Labtech. Tento přístroj pracuje na základě detekce absorbance světla, které prochází skrze vzorky v mikrotitrační destičce (96 jamek). Světelný zdroj o vlnové délce 600 nm prochází jamkami, kde je přítomen vzorek s buněčnou suspenzí. Detektor světla umístěný na druhé straně zaznamenává množství světla, které prošlo skrze vzorek. Množství propuštěného světla je přímo úměrné koncentraci molekul ve vzorku.

Bakteriální kultury byly zaočkovány do 2,5 ml předehřátého Chamberleinova média tak, aby optická denzita ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) byla 0,1, a byly kultivovány přes noc při 36,8 °C (200 rpm, Infors AG CH – 4103). Následující den byla z těchto vzorků připravena buněčná suspenze o optické denzitě ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) 0,1 v čerstvém Chamberlainově médiu. Do 96 jamkové titrační destičky bylo sterilně napipetováno 200  $\mu$ l Chamberlainova média (jako blank) a 200  $\mu$ l buněčných suspenzí. Od každého vzorku bylo nanášeno 5 replikátů. Vzorky nebyly na destičku nanášeny do krajních řad, neboť zde dochází k největšímu vypařování během měření. Do krajních a ostatních prázdných míst bylo napipetováno 350  $\mu$ l vody. Titrační destička se vzorky byla vložena do přístroje, připravená k 24 hodinovému měření. Parametry měření jsou uvedeny v Tab. 11.

Teplota	36,8 °C
Typ destičky	Microplate TPP96
Počet cyklů	145
Čas jednoho cyklu	600 s (10 min)
Absorbance filtru	A-620
Čas třepání/cyklus	300 s (5 min)

Tabulka 9: Parametry pro měření růstové křivky

Po získání dat byla v Microsoft Excel 2010 vytvořena růstová křivka ve formě grafu.



## 4. Výsledky

Tato práce zkoumá vliv inaktivace konkrétních genů na virulenci *F. tularensis* subsp. *holarctica* v *in vivo* a *in vitro* systémech. Cílové geny byly vybrány na základě proteomických studií provedených na pracovišti, a dále na základě výsledků jiných skupin. Předmětem zájmu byly geny s označením FTS\_0265, FTS\_0611, FTS\_0815 a FTS\_1462 (Tab. 12).

Gen FTS\_0265 kóduje protein NADP- specifickou glutamát dehydrogenázu. Tento protein byl popsán jako sekretovaný (Konečná et al., 2010), jeho exprese je snížena u  $\Delta mglA$  a  $\Delta ssp$  mutantů *F. tularensis* (Charity et al., 2010). Dále pak bylo zjištěno, že dochází ke zvýšené expresi tohoto proteinu během proliferace uvnitř hostitelských buněk (Pávková et al., 2013) a že protein je imunoreaktivní (Pelletier et al., 2009).

Protein kódovaný genem FTS\_0611 je exopolyfosfatáza. U ní bylo publikováno, že se jedná o imunoreaktivní protein (Eyles et al., 2007) se zvýšenou expresí během stacionární fáze růstu (Lenčo et al., 2009).

Gen FTS\_0815 kóduje hypotetický lipoprotein se zvýšenou expresí během stacionární fáze (Lenčo et al., 2009).

Hypotetický protein kódovaný genem FTS\_1462 byl popsán jako nezbytný pro přežití a replikaci *F. tularensis* uvnitř lidských makrofágů (Lindemann et al., 2011), dále byl identifikovaný v tzv. vesikulech vnější membrány (outer membrane vesicles OMV) u *F. novicida* (McCaig et al., 2013). Jeho exprese je rovněž zvýšena během stacionární fáze růstu (Lenčo et al., 2009).

Jako metoda inaktivace cílových genů byla zvolena delece pomocí dvojité homologní rekombinace. V první fázi byly vytvořeny tzv. deleční konstrukty, které byly klonovány do vektoru neschopného replikace v *F. tularensis*. V druhé fázi probíhala konjugace *E. coli* S17-1 $\lambda$  s divokým kmenem *F. tularensis* FSC200 a testování vzniklých transformantů. Úspěšně vytvoření deleční mutanti genů FTS\_0815 ( $\Delta 0815/200$ ) a FTS\_1462 ( $\Delta 1462/200$ ) byli následně testováni *in vitro* v myších kostně dřevných makrofázích, kde byla sledována úspěšnost proliferace mutantních bakterií ve srovnání s mateřským kmenem FSC200. Úspěšnost proliferace bakterie *in vitro* byla stanovena CFU výsevem po lyzi kostně dřevných makrofágů v časových intervalech 1 hod, 6 hod, 24 hod a 48 hod po infekci bakteriálními kulturami. Dále pak byly mutantní kmeny testovány v *in vivo* systému, kde bylo sledováno přežití laboratorních myší typu BALB/c po subkutánní infekci kmeny *F. tularensis*. Virulence mutantních kmenů byla vyhodnocena v porovnání s virulencí původního kmene FSC200.

lokus	gen	protein	počet aminokyselin	počet nukleotidů
FTS_0265	<i>gdhA</i>	glutamát dehydrogenáza	449	1 350
FTS_0611	<i>ppx</i>	exopolyfosfatáza	308	927
FTS_0815	-	hypotetický protein	111	336
FTS_1462	-	hypotetický protein	169	510

Tabulka 10: Základní údaje sledovaných genů v *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

## 4.1. Izolace chromozomální DNA

Chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200, která sloužila jako templát do PCR reakcí, byla izolována pomocí AquaPure Genomic DNA Kit (Bio-Rad). Její koncentrace byla spektrofotometricky změřena na UV-VIS (IMPLEN) (Tab. 13).

vzorek	koncentrace (ng/μl)
1	214
2	314

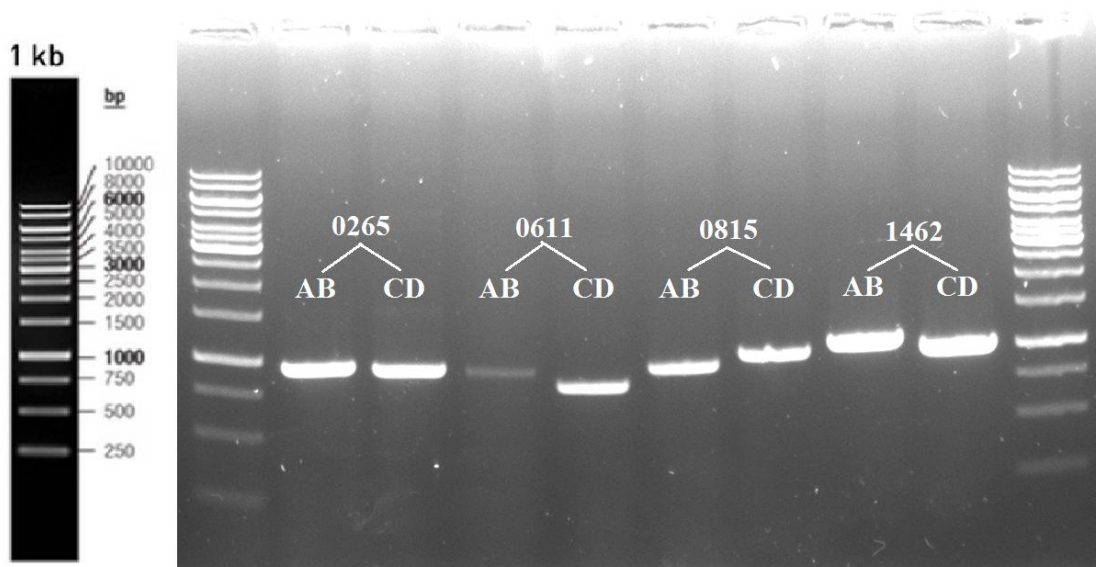
Tabulka 11: Koncentrace chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

## 4.2. Amplifikace fragmentů AB a CD

Amplifikace fragmentů AB a CD byla provedena pomocí PCR reakce, s použitím příslušných primerů A a B (pro AB), a C a D (pro CD). Primery A a D nesly rozpoznávací sekvence pro restriční endonukleázy *SacI* a *XhoI*. Primery B a C byly navrženy tak, aby obsahovaly komplementární „ocásky“. Primer B obsahoval ocásek komplementární k primeru C a primer C ocásek komplementární k primeru B. Amplifikované fragmenty AB a CD byly separovány na agarózovém gelu (Obr. 7) a následně izolovány a dále použity jako templát pro přípravu AD fragmentu. Velikosti AB a CD fragmentů jsou uvedeny v Tab. 14.

	AB (bp)	CD (bp)
0265	928	724
0611	900	783
0815	915	999
1462	1 085	994

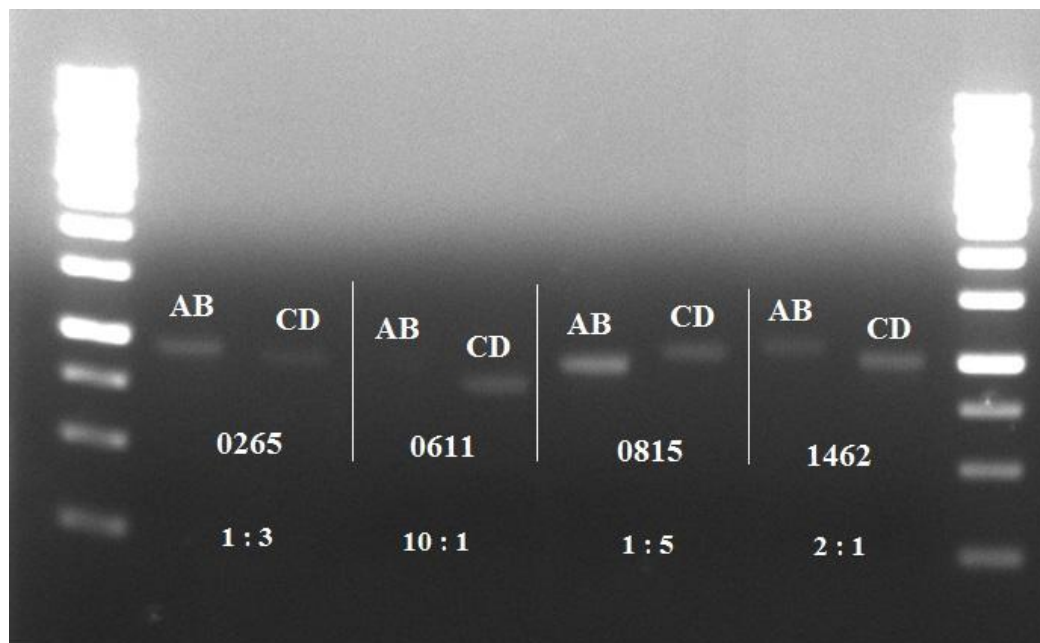
Tabulka 12: Velikosti jednotlivých AB a CD fragmentů



Obrázek 7: Amplifikace fragmentů AB a CD, standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

### 4.3. Amplifikace AD fragmentů

Amplifikace AD fragmentů byla provedena pomocí tzv. overlap PCR, ve které bylo jako templátu využito fragmentů AB a CD. Množství AB a CD bylo stanoveno pomocí elektroforetického snímku kontrolní elektroforézy izolovaných fragmentů AB a CD. Dle intenzity jednotlivých bandu byl stanoven poměr AB : CD (Obr. 8).

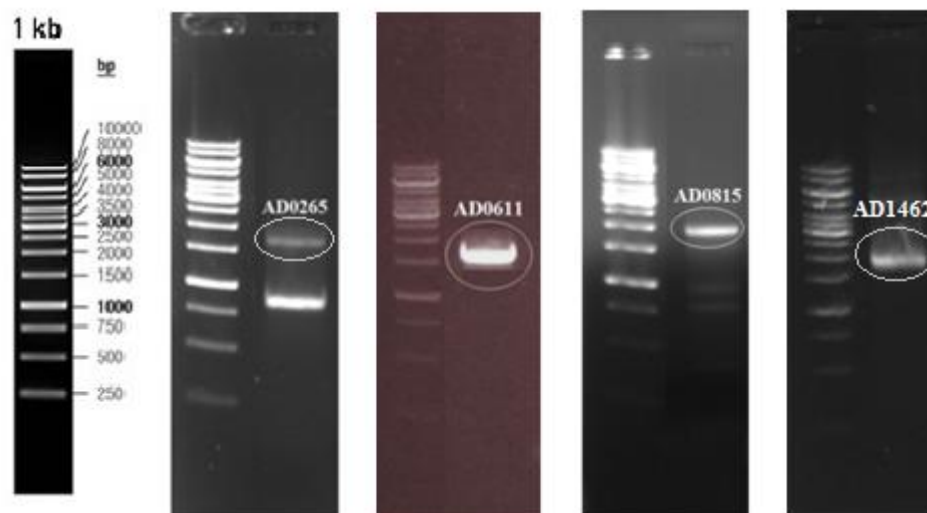


Obrázek 8: Stanovení poměru fragmentů AB a CD jako templátu do PCR reakce amplifikace AD fragmentů, standard HyperLadder™ 1kb

Amplifikace AD fragmentů byla možná díky komplementárním ocáskům na koncích produktů AB a CD. Délka požadovaných AD fragmentů byla předem spočítána. Délky AD fragmentů (bp) jsou uvedeny v Tab. 15.

název AD	délka (bp)
0265	1 785
0611	1 632
0815	1 864
1462	2 212

Tabulka 13: Délka jednotlivých AD fragmentů

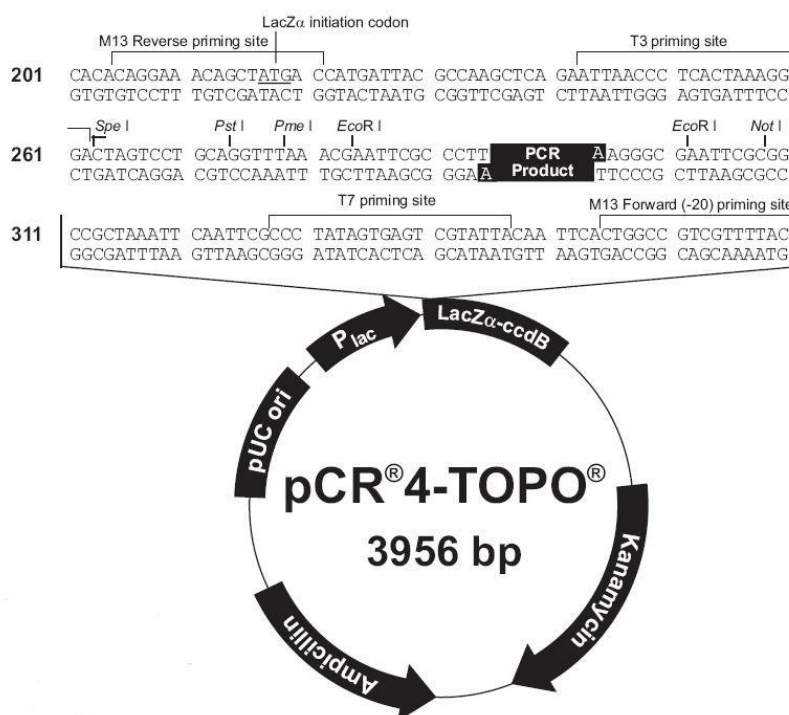


Obrázek 9: Amplifikace fragmentů AD (0265, 0611, 0815, 1462), standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Jednotlivé AD fragmenty byly izolovány z gelu (Obr. 9) pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) a byly dále použity pro TOPO klonování.

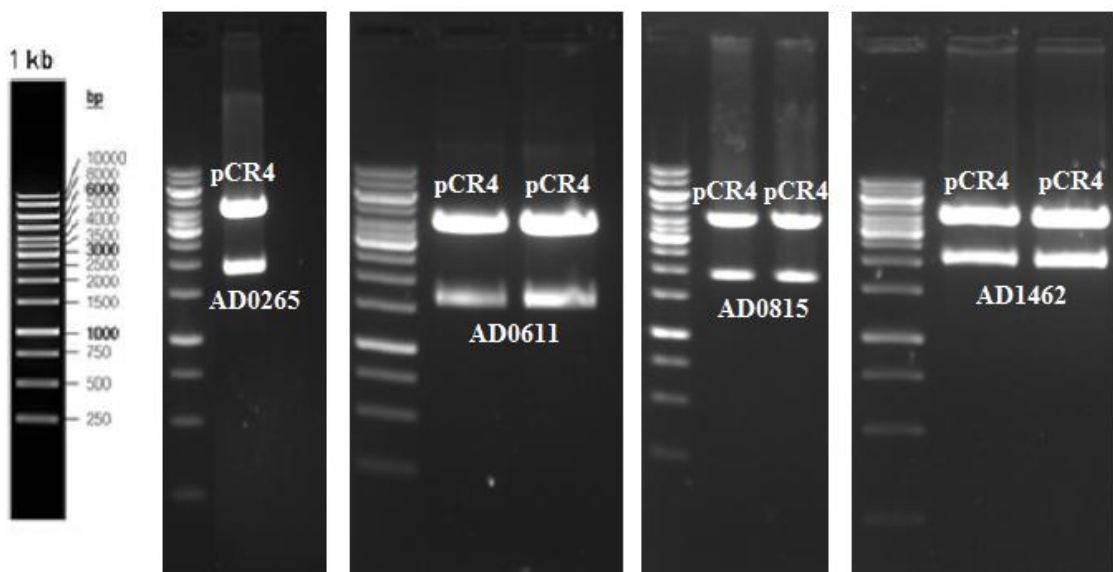
#### 4.4. TOPO klonování

Pro amplifikace AB, CD i AD fragmentů byla použita *Pfu* polymeráza s korektorskou aktivitou. Tato polymeráza na rozdíl od jiných zanechává po amplifikaci tupé konce bez jakýchkoliv přesahů. Aby mohly být AD fragmenty klonovány do TOPO vektoru pCR4, bylo třeba přidat k AD fragmentům na 3' konce -A přesahy, neboť vektor pCR<sup>®</sup>4-TOPO obsahuje 3'-T přesahy (Obr. 10).



Obrázek 10: Schéma pCR<sup>®</sup>4-TOPO vektoru

K přidání 3'-A přesahů byla využita aktivita *Taq* polymerázy v reakci, do které byly přidány pouze dATP nukleotidy. Rezistence ke kanamycinu, kterou nese vektor pCR4 byla dále využívána jako selekční znak. AD fragment zaklonovaný do vektoru pCR<sup>®</sup>4-TOPO byl transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* XL1. Přítomnost AD fragmentu v buňkách byla ověřena pomocí PCR na koloniích. Z pozitivních kolonií byla připravena zásobní kultura a izolován plazmid ADpCR4, který byl podroben kontrolnímu restričnímu štěpení (Obr. 11) a kontrolní PCR reakci (Obr. 12), pro úplné ověření přítomnosti AD fragmentu. Správnost sekvence AD produktů byla dále ověřena sekvenováním.



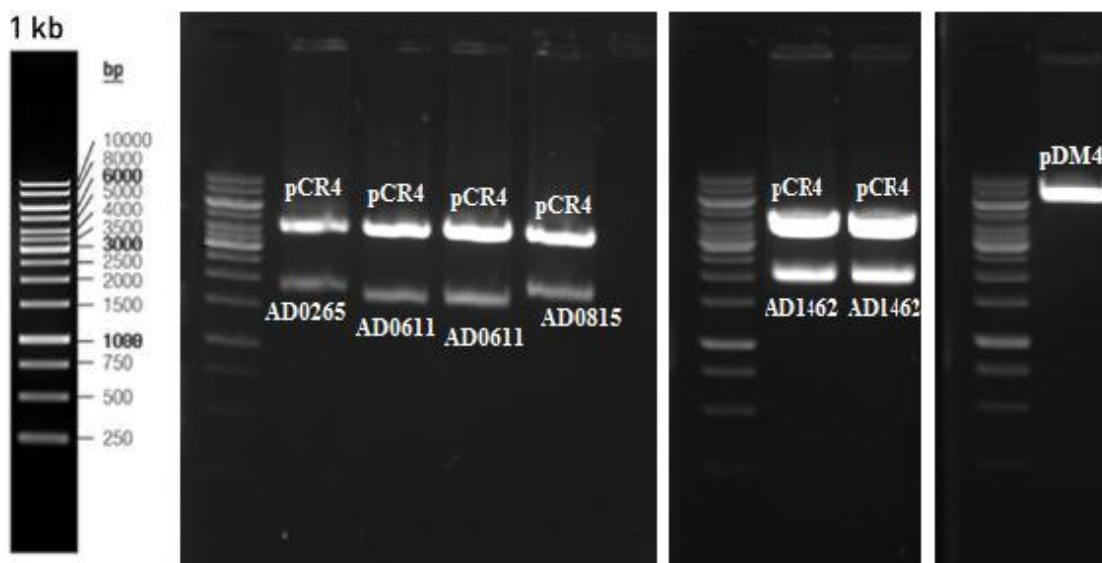
Obrázek 11: Kontrolní restriční štěpení plazmidu ADpCR4, standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

#### 4.5. Příprava vektoru ADpDM4 a transformace ADpDM4 do *E. coli* NEB Turbo

Dále bylo třeba překlónovat AD fragmenty do plazmidového vektoru pDM4. Tento plazmid obsahuje pouze replikační počátek pro *E. coli* a nikoliv pro *F. tularensis*, což znamená, že se množí (replikuje) v *E. coli* a nikoliv v *F. tularensis*. Vektor je odvozen od plazmidu pDM1 a pNQ705 (Milton et al., 1996). Vektor pDM4 nese rezistenci ke chloramfenikolu, která byla využívána jako selekční znak, a *sacB* gen, který byl posléze využit při selekci transformantů *F. tularensis*. Do vektoru pDM4 opracovaného restričními endonukleázami *SacI* a *XhoI* byl vložen AD fragment vyštěpený z pCR4 vektoru pomocí stejných restriktáz.

Po restričním štěpení byla provedena preparativní elektroforéza a fragmenty odpovídající AD fragmentům a linearizovanému pDM4 vektoru byly izolovány

(Obr. 13), byla změřena jejich koncentrace a použity k ligaci pomocí Quick ligase NEB).



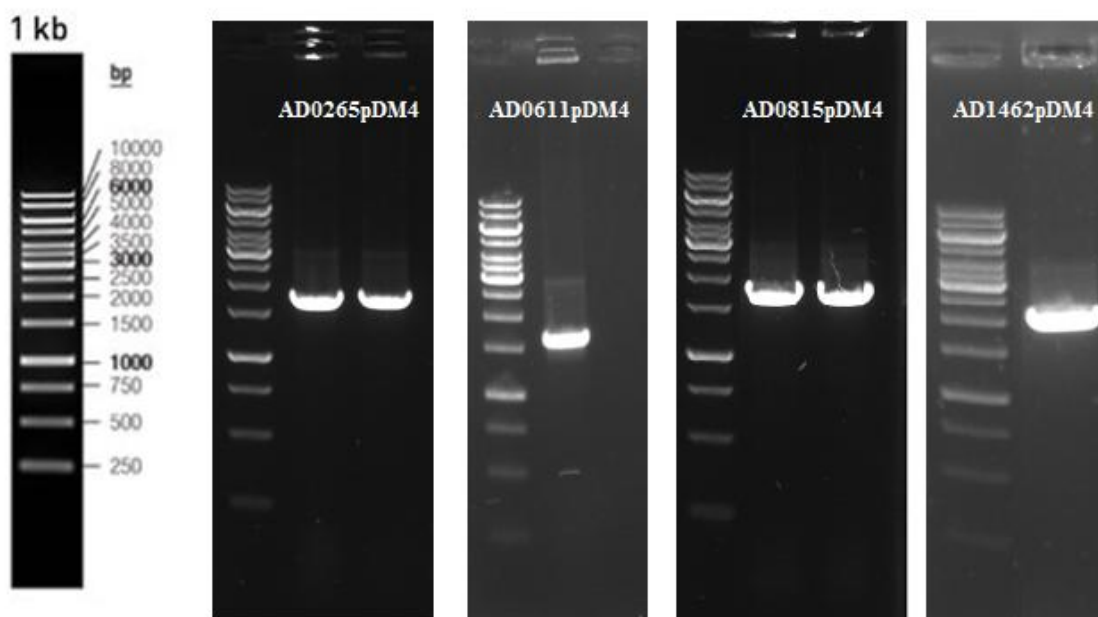
Obrázek 12: Restriční štěpení pro izolaci pDM4 a AD z ADpCR4, standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Pomocí kalkulátoru ligace bylo stanoveno množství AD fragmentů v ng (Tab. 16). Množství plazmidového vektoru pDM4 bylo stanoveno na 50 ng. Dle koncentrace izolovaných AD fragmentů a pDM4 bylo vypočítáno množství v  $\mu\text{l}$ . Poměr molarity volných konců vektoru a insertu (AD) byl nastaven na 1:4.

AD	množství (ng) - 20 $\mu\text{l}$ lig. směsi
0265	59,5
0611	54,4
0815	62,1
1462	73,7

Tabulka 14: Množství AD fragmentů (ng) v 20  $\mu\text{l}$  ligační směsi

Výsledkem ligace byl plazmid ADpDM4, který byl použit pro transformaci komerčně dostupných chemokompetentních buněk *E. coli* NEB Turbo. Kolonie získané po selekci na chloramfenikol byly testovány metodou PCR na koloniích pro ověření přítomnosti fragmentu AD (Obr. 14).



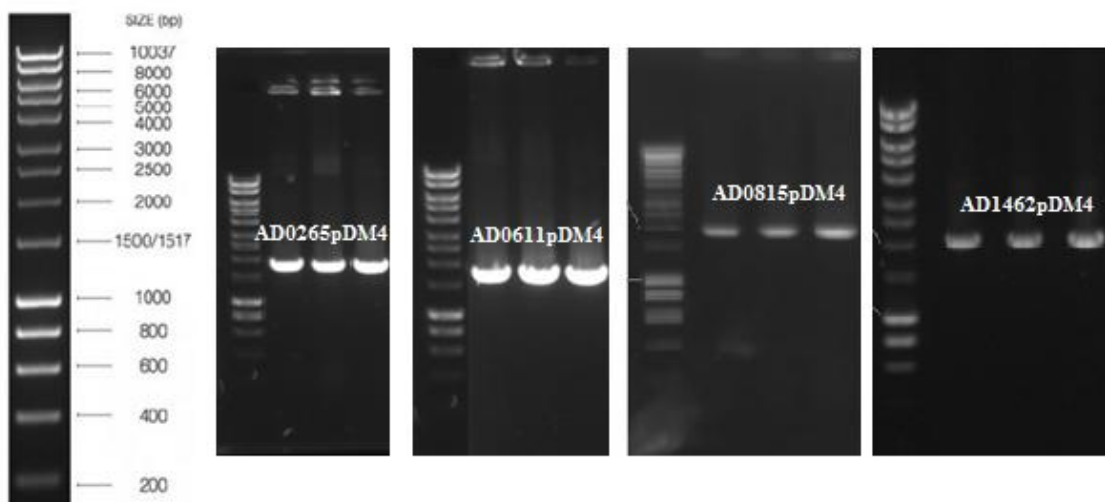
Obrázek 13: PCR na koloniích ADpDM4 (*E. coli* NEB Turbo), standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

Z těchto pozitivních kolonií byla vytvořena zásobní kultura a byl izolován plazmid ADpDM4, který byl dále použit pro transformaci do buněk *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir.

#### 4.6. Transformace ADpDM4 do *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir

Plazmid pDM4, který v sobě nese klonovaný AD fragment, byl transformován do buněk *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir. Tento kmen *E. coli* je schopen konjugovat s *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Přítomnost plazmidu ADpDM4 v buňkách *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir byla testována metodou PCR na koloniích (Obr. 15). Amplifikované fragmenty na jednotlivých snímcích odpovídají velikosti AD fragmentů vztahující se ke konkrétním genům.





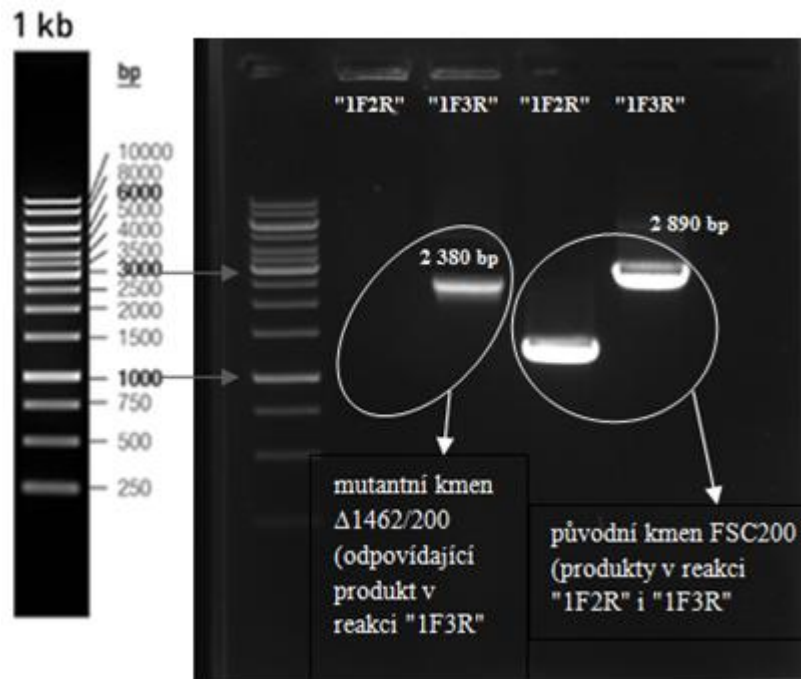
Obrázek 14: PCR na koloniích ADpDM4 (*E. coli* S17-1 $\lambda$ pir), standard HyperLadder™ 1kb

Kultury *E. coli* S17-1 $\lambda$ pir, pozitivní na přítomnost příslušného AD fragmentu, byly dále použity pro konjugaci s *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a rovněž z nich byla vytvořena zásobní kultura.

#### 4.7. Konjugace a ověření mutantních kmenů *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

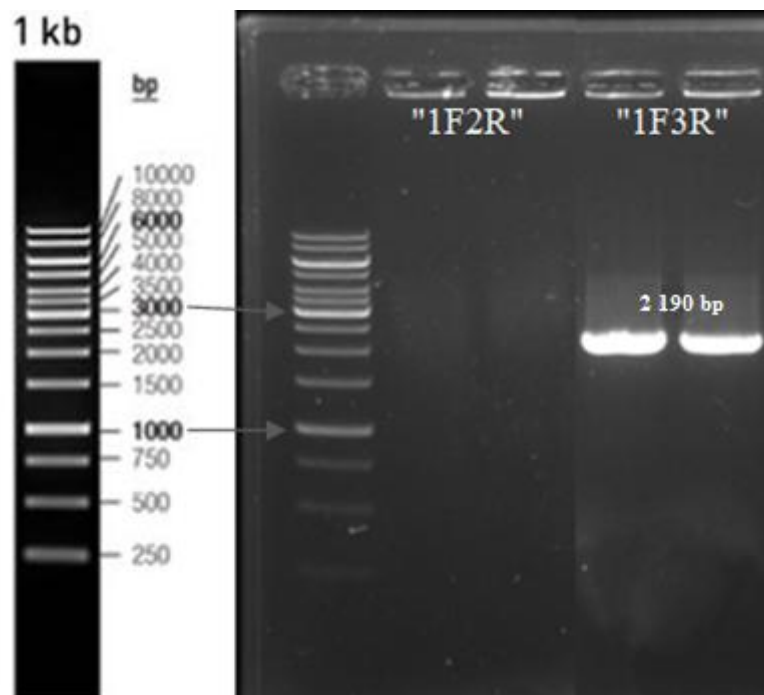
Konjugace byla provedena tak, jak je popsáno v kapitole Metodika. Z narostlé směsné kultury *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir a *F. tularensis* FSC200 na LB plotně byla vytvořena suspenze, která byla vyseta na McLeod plotny s polymyxinem B (blokuje růst *E. coli*) a chloramfenikolem (selektuje pouze ty buňky *F. tularensis*, u kterých došlo k inkorporaci plazmidu ADpDM4 do chromozomu). K integraci plazmidu do chromozomu dochází z toho důvodu, že plazmid pDM4 se v *F. tularensis* nereplikuje, ale bakterie ho potřebuje, aby mohla růst na médiu s chloramfenikolem. Získání transformanti byli podrobeni sacharóze selekci. Jak bylo zmíněno, plazmid pDM4 nese gen *sacB*. Produkt tohoto genu je toxický, pokud bakterie roste na médiu se sacharózou. V tomto okamžiku dochází ke druhé homologní rekombinaci a odstranění plazmidu pDM4 z chromozomu. Kolonie narostlé po sacharóze selekci již nejsou chloramfenikol rezistentní, protože již nenesou plazmid kódující rezistenci. Ke druhé homologní rekombinaci může dojít ve dvou místech, což má za následek buď tvorbu mutantního delečního kmene či návrat do WT formy. K rozlišení byla použita metoda PCR za použití primerů 1F, 2R a 3R. Jelikož se místo pro navázání primeru 2R nachází v sekvenci deletovaného genu, v případě mutantního kmene nevznikne v reakci "1F2R" žádný produkt. Délka produktu reakce "1F3R" se liší podle toho, zda homologní reakce proběhla ve správném místě a vznikl mutantní kmen s delecí konkrétního genu, nebo zda proběhla ve stejném místě jako první homologní rekombinace a pak je výsledný klon divokým kmenem (WT).





Obrázek 15: Ověření mutantního kmene  $\Delta 1462/200$ , standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

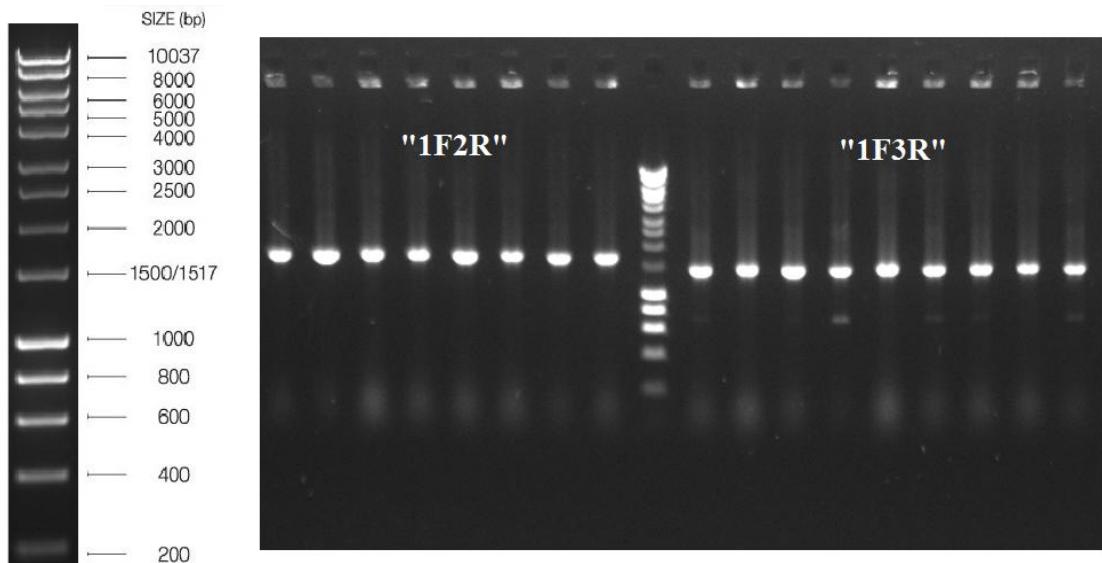
V případě delečního mutantního kmene  $\Delta 1462/200$  vznikne produkt v reakci "1F3R" dlouhý 2 380 bp. V případě, že by po homologní rekombinaci došlo k navrácení do původního divokého kmene FSC200, vznikne produkt v reakci "1F2R" a produkt v reakci "1F3R" bude dlouhý 2 890 bp (Obr. 16). Mutantní kmen  $\Delta 1462/200$  byl uchován v podobě zásobní zmražené kultury.



Obrázek 16: Ověření mutantního kmene  $\Delta 0815/200$ , standard GeneRuler 1 kb DNA Ladder

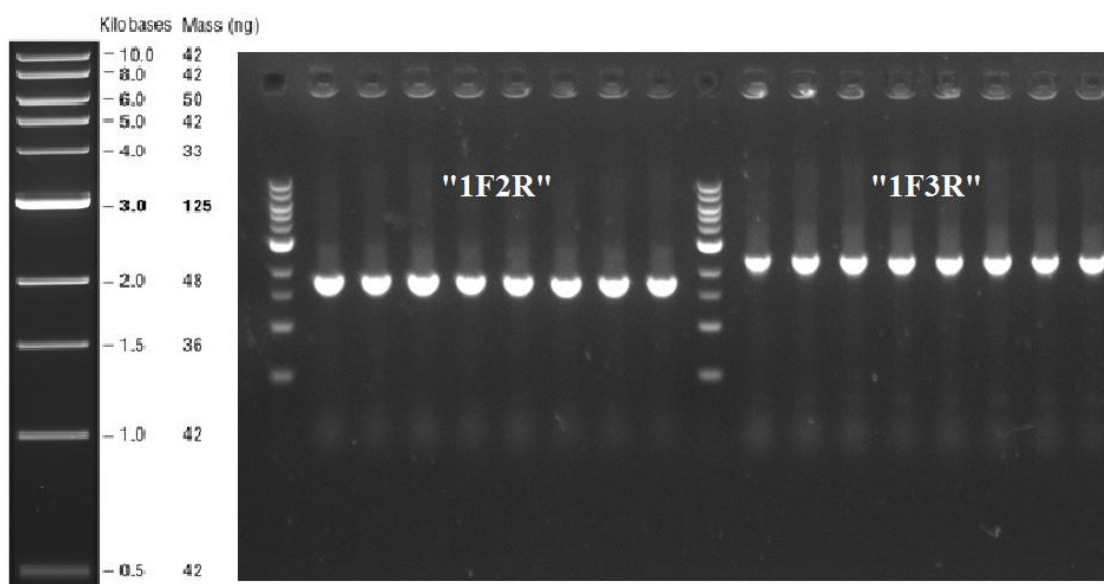
V případě delečního mutantního kmene  $\Delta 0815/200$  vznikne produkt v reakci "1F3R" dlouhý 2 190 bp (Obr. 17) V případě, že by po homologní rekombinaci došlo k navrácení do původního divokého kmene FSC200, vznikne produkt v reakci "1F2R" a produkt v reakci "1F3R" bude dlouhý 2 526 bp. Mutantní kmen  $\Delta 1462/200$  byl uchován v podobě zásobní zmražené kultury.

Inaktivace genů FTS\_0265 a FTS\_0611 nebyla úspěšně dokončena. Všechny testované kolonie se projevily jako původní divoký kmen FSC200. Celkem bylo otestováno 75 kolonií potencionálního mutantního kmene  $\Delta 0611/200$  a 68 kolonií potencionálního mutantního kmene  $\Delta 0265/200$ .



Obrázek 17: Ověření mutantního kmene  $\Delta 0265/200$ , standard HyperLadder™ 1kb

Pokud by vznikl mutantní kmen  $\Delta 0265/200$ , byl by fragment v reakci "1F3R" dlouhý 2 134 bp. V případě divokého kmene FSC200 vznikne fragment v reakci "1F2R", který je dlouhý 1 682 bp (Obr. 18). Fragment "1F3R" by měl být dlouhý 3 484 bp. Jak je patrné z Obr. 18, ani u jedné testované kolonie potencionálního delečního mutantního kmene  $\Delta 0265/200$  nebyl v reakci "1F3R" získán fragment, který by odpovídal buď mutantní formě nebo divokému typu (cca 1500 bp vs 2134 bp či 3484 bp. Pro kontrolu byla provedena PCR reakce na chromozomální DNA kmene *F. tularensis* FSC200. Opět byl získán fragment o přibližné velikosti 1500 bp (neuvedeno). Na základě tohoto výsledku byl navržen nový primer 3R, nicméně ani s ním nebylo dosaženo tvorby produktu, který by odpovídal WT formy na chromozomální DNA kmene FSC200. Protože však vznikl fragment v reakci "1F2R" o velikosti odpovídající divokému kmenu FSC200 bylo testování tohoto potencionálního mutanta uzavřeno s tím, že se jedná o WT formu.



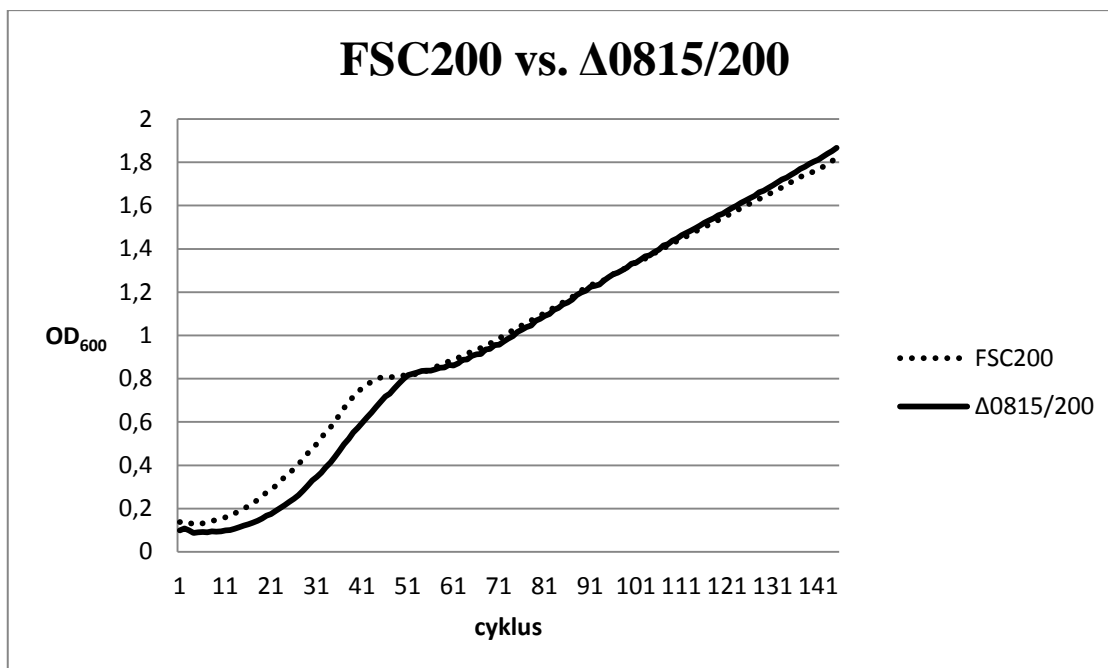
Obrázek 18: Ověření mutantního kmene  $\Delta 0611/200$ , standard Quick-Load® 1 kb DNA Ladder

Pokud by vznikl mutantní kmen  $\Delta 0611/200$ , byl by fragment v reakci "1F3R" dlouhý 1 207 bp. V případě divokého kmene FSC200 vznikne fragment v reakci "1F2R", který je dlouhý 1 820 bp a fragment "1F3R" dlouhý 2 488 bp (Obr. 19). Z obrázku je patrné, že testované kolonie odpovídají divokému kmeni.

#### 4.8. Růstová křivka

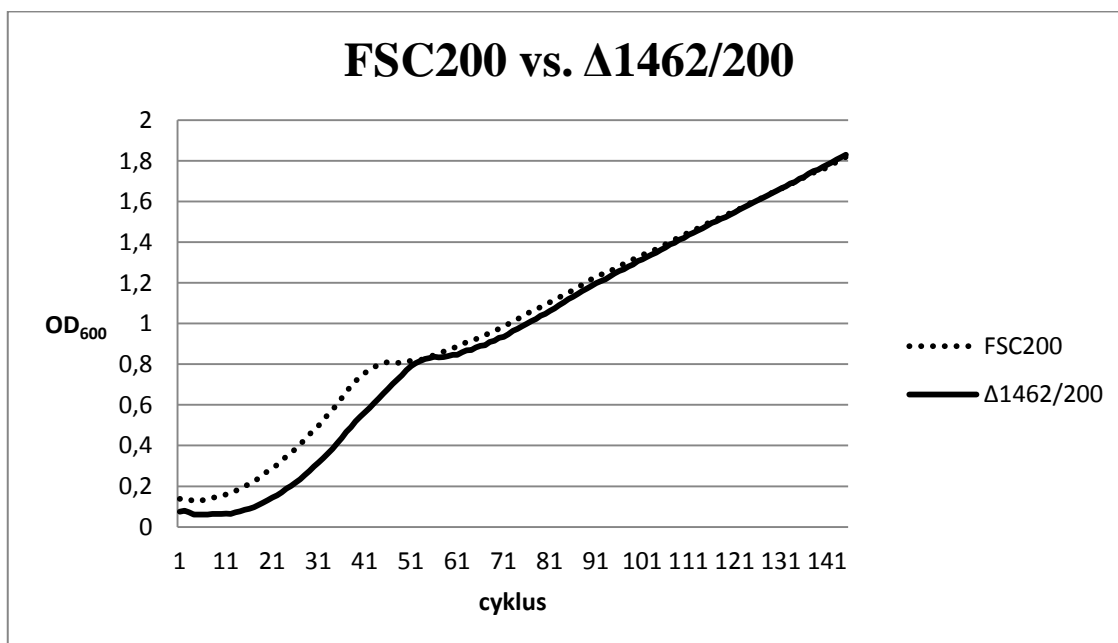
Měření růstové křivky patří k základním testům u nově připravených mutantních kmenů. Zkoumá, zda inaktivace daného genu neovlivnila vlastní růst bakterie, což by pak mohlo hrát roli ve špatné interpretaci dalších *in vitro* či *in vivo* testů.

Růstová křivka obou mutantních kmenů ( $\Delta 0815/200$  a  $\Delta 1462/200$ ) byla měřena ve srovnání s původním kmenem *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 pomocí přístroje FluoStar Optima, BMG Labtech. Vzorky byly proměřovány 24 hodin (145 měřících cyklů) v pentaplikátech. Po získání naměřených dat, byly hodnoty zprůměrovány pro každý typ vzorku. Pro správné vyhodnocení byla od těchto hodnot odečtena hodnota blanku (Chamberlainovo médium) a pomocí dělicího koeficientu 0,31574 (koeficient odpovídá objemu 200  $\mu$ l) byly vypočteny hodnoty odpovídající  $OD_{600}$  hodnotám stanoveným stolním denzitometrem. Pomocí vytvořeného grafu můžeme porovnat růst buněk mutantního kmene s původním kmenem FSC200.



Graf 1: Růstová křivka  $\Delta$ 0815/200 v porovnání FSC200

Na základě vyhodnocení růstové křivky mutantního kmene  $\Delta$ 0815/200 (Graf 1) lze konstatovat, že delece genu FTS\_0815 (hypotetický protein) nijak neovlivnila růst mutantního bakteriálního kmene v růstovém médiu za standardních podmínek ve srovnání s *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200.



Graf 2: Růstová křivka  $\Delta$ 1462/200 v porovnání FSC200

Na základě vyhodnocení růstové křivky mutantního kmene  $\Delta$ 1462/200 (Graf 2) lze konstatovat, že delece genu FTS\_1462 (hypotetický protein) nijak neovlivnila růst mutantního bakteriálního kmene v růstovém médiu za standardních podmínek ve srovnání s *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200.

#### 4.9. Infekce myši typu BALB/c bakteriemi *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a mutantními kmeny

Pro testování virulence *in vivo* byl zvolen model laboratorních myši typu BALB/c. Tyto myši jsou citlivé vůči infekci tularémií. Byly použity samice o stáří cca 6-8 týdnů. Myši BALB/c byly infikovány bakteriální suspenzí *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a mutantními kmeny  $\Delta$ 0815/200 a  $\Delta$ 1462/200 subkutánně (200  $\mu$ l). Mutantní kmeny byly injikovány ve dvou dávkách ( $3 \times 10^2$  a  $3 \times 10^6$  CFU/myš), kmen FSC200 v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Myši byly rozděleny do 4 skupin, každá skupina čítala 5 myši. Tři skupiny byly infikovány bakteriálními suspenzemi, čtvrtá skupina sloužila jako kontrola a myším bylo injikováno 200  $\mu$ l fyziologického roztoku. Projevy onemocnění byly sledovány po dobu 21 dní. Úhyn byl zaznamenán do úhynového listu (Tab. 19 a 20). Skutečný počet aplikovaných bakterií byl určen CFU výsevem (Tab. 17 a 18). Ačkoliv byl počet bakterií aplikován téměř v dvakrát větším množství, lze brát výsledné hodnoty jako objektivní, neboť hodnoty byly přibližně stejné u všech suspenzí.

koncentrace	FSC200 (CFU/myš)	$\Delta$ FTS1462/FSC200 (CFU/myš)	$\Delta$ FTS1462/FSC200 (CFU/myš)
<b>předpokládaná</b>	$3 \times 10^2$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^2$
<b>skutečná</b>	$5,72 \times 10^2$	$5,76 \times 10^6$	$5,76 \times 10^2$

Tabulka 15: Předpokládaný a skutečný počet aplikovaných bakterií pro infekci myši (FSC200 a  $\Delta$ FTS1462/FSC200)

koncentrace	FSC200 (CFU/myš)	$\Delta$ FTS0815/FSC200 (CFU/myš)	$\Delta$ FTS0815/FSC200 (CFU/myš)
<b>předpokládaná</b>	$3 \times 10^2$	$3 \times 10^6$	$3 \times 10^2$
<b>skutečná</b>	$7,6 \times 10^2$	$5,64 \times 10^6$	$5,52 \times 10^2$

Tabulka 16: Předpokládaný a skutečný počet aplikovaných bakterií pro infekci myši (FSC200 a  $\Delta$ FTS0815/FSC200)

	FSC200	$\Delta$ FTS0815/FSC200	$\Delta$ FTS0815/FSC200
	0,2 ml, $3 \times 10^2$	0,2 ml, $3 \times 10^6$	0,2 ml, $3 \times 10^2$
23.10.	Den infekce		
24.10.			
25.10.			
26.10.			
27.10.		5	
28.10.	2		
29.10.	3		5
30.10.			
31.10.			

Tabulka 17: Úhynový list pro  $\Delta$ 0815/200 a FSC200

	<b>FSC200</b>	<b>ΔFTS1462/FSC200</b>	<b>ΔFTS1462/FSC200</b>
	0,2 ml, 3 x 10 <sup>2</sup>	0,2 ml, 3 x 10 <sup>6</sup>	0,2 ml, 3 x 10 <sup>2</sup>
11.9.	Den infekce		
12.9.			
13.9.			
14.9.			
15.9.		5	
16.9.	4		3
17.9.	1		2
18.9.			
19.9.			

Tabulka 18: Úhynový list pro Δ1462/200 a FSC200

Pozn.: Vzhledem k úhynu myši byly tabulky úhynového listu omezeny na méně než 21 dní.

V tabulce úhynového listu je zaznamenán počet uhynulých myši v konkrétní den. Z tabulek vyplývá, že rozdíly v úmrtnosti na infekci kmenem FSC200 a mutantními kmeny nejsou markantní a lze tedy konstatovat, že míra virulence mutantních kmenů Δ0815/200 a Δ1462/200 je stejná jako virulence kmene FSC200 v *in vivo* systémech. Z kontrolní skupiny myši, kterým byl aplikován fyziologický roztok, neuhynula myš ani jedna.

#### 4.10. Proliferace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a mutantních kmenů v BMMs

*F. tularensis*, jakožto intracelulární patogen, vstupuje jak do fagocytujících buněk, k nimž patří makrofágy, dendritické buňky a polymorfonukleární leukocyty, tak i do epiteliálních nebo endoteliálních buněk. V nich je schopna se množit a následně uniknout do extracelulárního prostoru a infikovat další buňky. Pro studium proliferace FSC200 a mutantních kmenů Δ0815/200 a Δ1462/200 byl zvolen model primárních myších kostně dřevných makrofágů (BMMs). V čase „0“ byla provedena infekce a v časových intervalech 1 h, 6 h, 24 h, 48 h po infekci byly makrofágy lyzovány, lyzáty naředěny a vysety na McLeod plotny pro odečet CFU jednotlivým kmenů *F. tularensis*. Na základě získaných hodnot byl stanoven logaritmus počtu bakteriálních buněk obsažených v 1 ml suspenze v daných časových intervalech (Tab. 22 a 23). Z logaritmických hodnot byl vytvořen graf pro porovnání proliferace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a jednotlivých mutantních kmenů. Dle předpokladů bylo aplikováno 50 bakterií na jednu buňku (MOI = 50) BMMs, avšak skutečný počet aplikovaných bakterií byl stanoven kontrolním CFU výsevem (Tab. 21).

	<b>MOI</b>		<b>MOI</b>
<b>FSC200</b>	49	<b>FSC200</b>	90
<b>Δ0815/200</b>	79	<b>Δ1462/200</b>	94

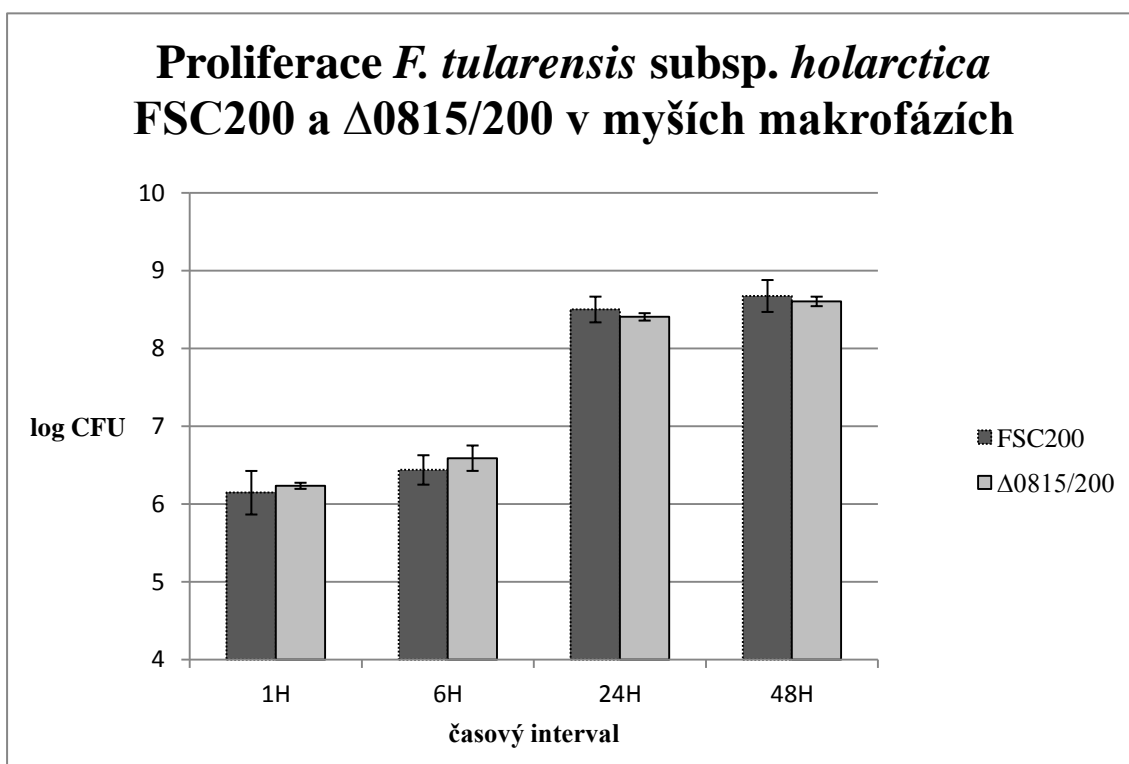
Tabulka 19: Skutečné množství bakterií aplikovaných na jednu buňku BMMs

	1H	6H	24H	48H
<b>FSC200</b>	6,146	6,439	8,502	8,676
<b>Δ0815/200</b>	6,235	6,590	8,408	8,606

Tabulka 20: Logaritmické hodnoty proliferace FSC200 a Δ0815/200

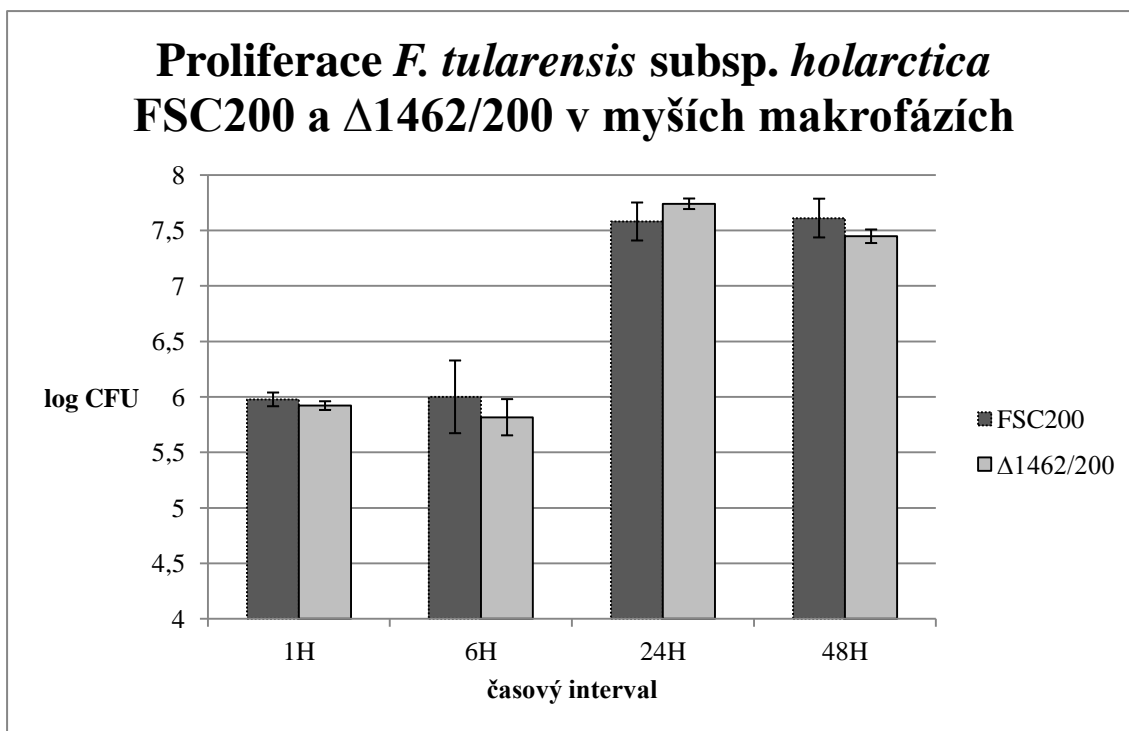
	1H	6H	24H	48H
<b>FSC200</b>	5,977	6,000	7,580	7,611
<b>Δ1462/200</b>	5,921	5,816	7,740	7,447

Tabulka 21: Logaritmické hodnoty proliferace FSC200 a Δ1462/200



Graf 3: Proliferace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a Δ0815/200 v BMMs

Na základě grafu proliferace kmenů Δ0815/200 a FSC200 v BMMs (Graf 3) lze konstatovat, že delecí genu *FTS\_0815* (hypotetický protein) nebyl ovlivněn vstup mutantního kmene do makrofágů, ani jeho replikace v tomto typu buněk, což naznačuje, že delece genu *FTS\_0815* nemá vliv na virulenci *in vitro*.



Graf 4: Proliferace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a  $\Delta$ 1462/200 v BMMs

Rovněž, z grafu proliferace kmenů  $\Delta$ 1462/200 a FSC200 v BMMs (Graf 4) lze konstatovat, že delecí genu FTS\_1462 (hypotetický protein) nebyl ovlivněn vstup mutantního kmene do makrofágů, ani jeho replikace v tomto typu buněk, což naznačuje, že delece genu FTS\_0815 nemá vliv na virulenci *in vitro*.



## 5. Diskuze

Vzhledem k velkému zájmu o biologické zbraně se výzkum faktorů virulence *F. tularensis* stal předmětem studií jak minulého století, tak současné doby. Virulenční mechanismy této bakterie spočívají v její schopnosti odolávat imunitnímu systému hostitelské buňky, aktivně ji napadat a množit se uvnitř ní.

Konstrukcí mutantních kmenů bylo objeveno několik esenciálních genů pro růst a virulenci bakterie *F. tularensis*. Největším přínosem pro výzkum virulence této bakterie byl objev ostrova patogenity, kde jsou lokalizovány geny, které jsou nezbytné pro virulenci bakterie (Nano et al., 2004). Nezbytnost těchto genů byla potvrzena například inaktivací genů z operonu *igl* (Gray et al., 2002, Golovliov et al., 2003). Virulence bakterie spočívá i ve schopnosti intracelulární replikace. I v této oblasti bylo provedeno několik výzkumů, kdy pomocí mutantních kmenů byla potvrzena nebo vyvrácena souvislost určitých genů se schopností replikace uvnitř hostitelských buněk. Souvislost s intracelulární replikací mají geny z již zmiňovaného ostrova patogenity, ale předmětem výzkumu byly a jsou i jiné geny, které kódují důležité metabolické dráhy nebo například hypotetické proteiny se zvýšenou expresí během intracelulárního růstu. Mezi takové proteiny patří například proteiny kódované geny FTT\_0383, FTT\_0369c a FTT\_1676. Jejich vliv na replikaci uvnitř makrofágů byl potvrzen inaktivací těchto genů v kmenu SCHU S4 (Wehrly et al., 2009).

Rozdíl ve virulenci *F. tularensis* subsp. *tularensis* (SCHU S4) a *F. tularensis* subsp. *holarctica* (LVS) může být způsobený genem *pdpD*, který se nachází v FPI kmenu SCHU S4, ale nikoliv v kmenu LVS. V kmenu LVS se nacházejí pouze dvě krátké sekvence genů, které vykazují homologii s genem *pdpD* (Bröms et al., 2010). Druh *F. novicida* také obsahuje gen *pdpD*, ale pouze v jedné kopii, narozdíl od poddruhu *tularensis*, který má FPI zastoupený ve dvou kopiích. Bylo zjištěno, že protein PdpD je lokalizován na vnější membráně a ovlivňuje virulenci bakterie, ale neovlivňuje intracelulární růst. Dále bylo zjištěno, že *pdpD* má vliv na distribuci proteinů IglABC (Ludu et al., 2008). Rozdíly v FPI jsou i v přítomnosti genu *anmK*, který je zapojen do virulence *F. novicida*, ale pouze v malé míře (Nano et al., 2007). Zajímavé je, že *iglI* není nezbytný pro intracelulární růst *F. novicida* a experimentálně bylo zjištěno, že i kmen LVS je bez tohoto genu schopen růst. Tyto poznatky ukazují, že funkce FPI mohou být druhově specifické (Bröms et al., 2010).

Předmětem výzkumu jsou i geny, které kódují proteiny s neznámou funkcí vykazující interakci s imunitním systémem hostitele či jinou možnou souvislost s virulencí a růstem bakterie.

Inaktivace genů představuje často využívanou metodu molekulární biologie pro studium esenciálních genů patogenních bakterií a identifikaci virulenčních faktorů. Inaktivovat určité geny je možné konstrukcí inzerčních nebo delečních mutantních kmenů. V této práci byla použita pro inaktivaci genů deleční mutagenese pomocí dvojité homologní rekombinace, protože u inzerční mutagenese existuje možnost vzniku polárního efektu na geny nacházející se za inaktivovaným genem. Mutantní kmeny *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 byly vytvořeny delecí genů FTS\_0815 a FTS\_1462, které jsou anotovány jako hypotetické proteiny. Dále bylo cílem práce

vytvořit mutantní kmeny v genech FTS\_0265, který kóduje NADP- specifickou glutamát dehydrogenázu, a FTS\_0611, který kóduje exopolyfosfatázu.

Na základě proteomických studií bylo zjištěno, že hypotetický lipoprotein kódovaný genem FTS\_0815 a hypotetický protein kódovaný genem FTS\_1462 vykazují zvýšenou expresi během stacionární fáze růstu bakterie (Lenčo et al., 2009). Ačkoliv byl gen FTS\_1462 identifikován jako nezbytný pro přežití a replikaci bakterie v lidských makrofázích (Lindemann et al., 2011), výsledky této diplomové práce ukazují, že delece genu FTS\_1462 ve *F. tularensis* subsp. *holarctica* nijak neovlivnila intracelulární růst bakterie v myších kostně dřevných makrofázích. Tyto makrofágy slouží jako *in vitro* model tularemické infekce, zároveň jsou mutantní kmeny *F. tularensis* testovány v *in vivo* systému, neboť může dojít k rozdílné intenzitě virulence v těchto dvou systémech. Virulence mutantních kmenů  $\Delta$ 0815/200 a  $\Delta$ 1462/200 byla stejná jako virulence původního kmenu FSC200 v *in vitro* (myši kostně dřevné makrofágy) a *in vivo* (myši typu BALB/c) systémech. Delece genů FTS\_0815 a FTS\_1462 tedy nehraje významnou roli ve virulenci a růstu bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200, a jejich funkce je zatím neznámá. Zejména výsledky dosažené u mutantního kmenu  $\Delta$ 1462/200 ukazují, že jeden konkrétní gen má odlišnou funkci ve virulenci poddruhů *tularensis* a *holarctica*.

Expresí genu FTS\_0265, který kóduje NADP-specifickou glutamát dehydrogenázu, je zvýšena během proliferace uvnitř hostitelských buněk (Pávková et al., 2013). Dále bylo zjištěno, že tento protein reaguje s protilátkami imunitního systému (Pelletier et al., 2009). Jeho funkci ve virulenci bakterie naznačuje i zjištění, že v mutantních kmenech  $\Delta$ *mglA* a  $\Delta$ *ssp* (hlavní regulační proteiny pro expresi virulenčních genů) je expresí tohoto genu snížena (Charity et al., 2010). Glutamát dehydrogenáza je jeden z enzymů, který zajišťuje zabudování zásobního dusíku do glutamátu, aminoskupina glutamátu je posléze využívána k syntéze purinů a pyrimidinů (Merrick et Edwards, 1995). GDH je jeden z nejvíce studovaných enzymů v biochemických procesech organismů. GDH je reverzibilní enzym, tzn., že může buď katalyzovat syntézu glutamátu, nebo může pomocí něj docházet k deaminaci glutamátu (Smith et al., 1975). U bakterií *Clostridium difficile* (Girinathan et al., 2014) a *Pseudomonas aeruginosa* (Lu et Abdelal, 2001) došlo inaktivací genu pro glutamát dehydrogenázu ke snížené schopnosti růstu těchto bakterií na kultivačním médiu a vyšší citlivosti k H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na druhé straně může ke snížení schopnosti růstu dojít i nadměrnou expresí glutamát dehydrogenázy, což bylo potvrzeno u *Klebsiella aerogenes* (Janes et al., 2001). U *Bacillus subtilis* bylo zjištěno, že GDH hraje roli v katabolismu prolinu a argininu (Gunka et al., 2012) a ovlivňuje odolnost buněčné stěny proti antibiotikům (Lee et al., 2012). Glutamát dehydrogenáza může hrát také roli v adaptaci mikroorganismů na vysoké teploty, neboť byly zjištěny vysoké hladiny GDH u hypertermofilních organismů, jako je například *Pyrococcus furiosus* (Consalvi et al., 1991) nebo *Thermococcus* sp. (Kobayashi et al., 1995). GDH může přispívat k rozdílu mezi *Mycobacterium bovis* a *Mycobacterium tuberculosis*. Konstrukcí mutantních kmenů bylo potvrzeno, že protein GDH není nezbytný pro růst *M. bovis*, narozdíl od mnohem nebezpečnějšího druhu *M. tuberculosis* (Viljoen et al., 2013). Glutamát dehydrogenázy také přispívají k virulenci *Proteus mirabilis*, způsobující infekce

močových cest. Inaktivace GDH u *P. mirabilis* vedla ke snížené schopnosti růstu a celkově ovlivnila vitalitu bakterie v *in vivo* systémech (Pearson et al., 2011). Všechny tyto studie dokazují, že jsou glutamát dehydrogenázy nezbytnou součástí metabolismu mikroorganismů, a to i přesto, že GDH není jediným enzymem pro syntézu glutamátu. Zásahy do metabolismu dusíku vedou k poruchám růstu a mnohdy i k defektu virulence patogenních bakterií. Tyto poznatky vedly k myšlence, že by mohla být glutamát dehydrogenáza nezbytná i pro růst a virulenci bakterie *F. tularensis*.

V této práci jsme se snažili vytvořit mutantní kmen  $\Delta 0265/200$ , nicméně všechny testované kolonie se po druhé homologní rekombinaci projeví jako původní divoký kmen FSC200. Vzhledem k počtu testovaných kolonií (celkem 68) je možné, že *F. tularensis* není schopna bez tohoto genu přežít, a tudíž by se mohlo jednat o gen esenciální.

Gen FTS\_0611, jehož expresí vzniká exopolyfosfatáza, byl popsán také jako imunoreaktivní (Eyles et al., 2007), se zvýšenou expresí během stacionární fáze růstu bakterie *F. tularensis* (Lenčo et al., 2009). V této práci měla být potvrzena úloha tohoto genu ve virulenci bakterie vytvořením a testováním mutantních kmenů  $\Delta 0611/200$ . Všechny testované kolonie (celkem 75) se po homologní rekombinaci projeví jako původní divoký kmen FSC200, lze tudíž opět spekulovat (vzhledem k počtu testovaných kolonií) o schopnosti přežívání bakterie bez tohoto genu. Tato hypotéza je podpořena i faktem, že na pracovišti Katedry molekulární patologie a biologie selhaly i snahy o vytvoření mutantního kmene v genu FTS\_0611 pomocí TargeTron inzerční mutagenese.

Exopolyfosfatáza, která odštěpuje anorganický fosfát z polyfosfátu, je nezbytná pro energetický metabolismus bakterie. Bylo prokázáno, že polyfosfát je nezbytný pro přežívání bakterií ve stacionární fázi růstu (Rao et Kornberg, 1996). Jelikož je polyfosfát rezervoárem energie, může jeho nedostatkem dojít k energetickému vyčerpání buňky, protože v růstově chudých podmínkách jsou molekuly ATP nedostačující. Kolísání hladin polyfosfátu významně ovlivňuje virulenci jiných patogenních bakterií, proto se předpokládá, že změna metabolismu polyfosfátu v *F. tularensis* bude mít podobné následky. Vliv polyfosfátu na virulenci bakterií byl prokázán u *Pseudomonas aeruginosa* (Rashid et Kornberg, 2000), *Shigella flexneri* a *Salmonella* spp. (Kim et al., 2002). Syntéza polyfosfátu je zajištěna *ppk* (polyfosfatová kináza), nicméně kolísání hladiny polyfosfátu u *Bacillus cereus* způsobené mutací *ppx* má mnohem větší negativní vliv, než mutace *ppk* (Shi et al., 2004). Na druhou stranu, i nadbytek polyfosfátu v buňce negativně ovlivňuje prosperitu bakteriální buňky, což bylo prokázáno u *Mycobacterium tuberculosis* (Thayil et al., 2011). Polyfosfát hraje významnou roli v expresi virulenčních genů *F. tularensis*, kde působí jako prostředník molekulárních interakcí v komplexu MglA/SspA. Tento komplex je hlavním regulátorem exprese virulenčních faktorů a ovlivňuje schopnost bakterie odolávat intracelulárnímu stresu. Souvislost polyfosfátu s MglA/SspA komplexem dokazují mutantní kmeny v *mglA* a *sspA*, u kterých došlo i ke snížení polyfosfátu v buňce (Wrench et al., 2013). Delecí genu pro exopolyfosfatázu může dojít k nedostatku polyfosfátu v buňce a tak k nesprávnému fungování regulonu MglA/SspA a tudíž nemusí docházet k expresi genů, které jsou nezbytné pro růst bakterie *F. tularensis*.

U *E. coli* polyfosfát zajišťuje dostatek živin pro přežití ve stacionární fázi růstu a optimální reakce na stres (Rao et Kornberg, 1996), a to díky nahromadění polyfosfátu v buňce během exponenciální fáze růstu bakterie (Kuroda et al., 1997).

Na významnost polyfosfátu pro růst a virulenci *Francisella* poukazuje i studie, která se zabývala inaktivací *ppk* (fosfátová kináza) u *F. novicida*. Tyto mutantní kmeny byly oslabené v *in vivo* systému i v intracelulárním růstu v makrofázích (Richards et al., 2008).

Důležitost enzymů, které hrají roli v metabolismu fosfátu dokazuje i vědecká studie zabývající se kyselými fosfatázami. Kyselé fosfatázy jsou zapojené do přenosu signálů prostřednictvím anorganického fosfátu. Kyselé fosfatázy hydrolyzují fosforylovou skupinu při kyselém pH a jsou zapojeny do virulence i u jiných patogenních bakterií, jako je například *Legionella pneumophila* (Aragon et al., 2001), *Coxiella burnetii* (Baca et al., 1993), *Bordetella bronchiseptica* (Jungnitz et al., 1998) nebo *Mycobacterium tuberculosis* (Saleh et Belisle, 2000). Rod *Francisella* má čtyři typy kyselých fosfatáz (AcpA, AcpB, AcpC a Hap), z nichž hlavní enzymovou aktivitu zajišťuje AcpA. Delecí všech čtyř kyselých fosfatáz u *F. novicida* došlo k omezení intracelulárního růstu, fagozomálního úniku a k ne schopnosti potlačit oxidativní stres způsobený hostitelskou buňkou (Mohapatra et al., 2007). Naopak jiná studie uvádí, že kyselé fosfatázy nemají vliv na virulenci, intracelulární růst ani fagozomální únik u vysoce infekčního poddruhu *tularensis* (SCHU S4) (Child et al., 2010). Na tomto příkladu lze opět demonstrovat, že inaktivací stejného genu se schopnost virulence a intracelulární replikace může u různých druhů rodu *Francisella* lišit.

## 6. Závěr

V této práci byly úspěšně vytvořeny dva mutantní kmeny *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 inaktivací genů FTS\_0815 ( $\Delta$ 0815/200) a FTS\_1462 ( $\Delta$ 1462/200), které kódují hypotetické proteiny. Mutantní kmeny byly testovány v systémech *in vitro* a *in vivo*. Ani u jednoho z mutantních kmenů se neprojevila změna v jejich proliferaci uvnitř kostně dřevných myších makrofágů, ani ve virulenci v *in vivo* myším modelu. Tyto geny nijak neovlivňují patogenitu bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Samotná schopnost růstu mutantních kmenů byla testována pomocí růstové křivky. Mutantní kmeny měly stejnou růstovou schopnost v médiu za standardních podmínek jako původní kmen FSC200.

Inaktivace genů FTS\_0265 (glutamát dehydrogenáza) a FTS\_0611 (exopolyfosfatáza) nebyla úspěšně dokončena. Všechny testované kolonie se projevíly jako původní divoký kmen a lze tedy uvažovat, že tyto geny jsou nezbytné pro růst bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200.

## Seznam použité literatury

1. Abd H, Johansson T, Golovliov I, Sandstrom G, Forsman M (2003): Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Applied Environmental Microbiology; 69:600–606.
2. Akiyama M., Crooke E. et Kornberg A. (1993): An Exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The Enzyme and its *ppx* Gene in a Polyphosphate Operon. Journal of Biological Chemistry. 268 (1): 633-639.
3. Alford R. H., John J. T. et Bryant R. E. (1972): Tularemia treated successfully with gentamicin. American review of respiratory disease. 106 (2): 265-268. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. European respiratory journal. 21: 361-373.
4. Alibek K. (1999): Biohazard: The Chilling True Story of the Largest Covert Biological Weapons Program in the World, Told From the Inside by the Man Who Ran It. New York: Random House. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunophatogenesis of a potential Agent of Biowarfare. Annual reviews Microbiology. 60: 167-185.
5. Ancuta P., Pedron T., Girard R. Sandström G. et Chaby R. (1996): Inability of the *Francisella tularensis* lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins. Infection and Immunity. 64 (6): 2041-2046.
6. Anthony L. S., Cowley S. C., Mdluli K. E. et Nano F. E. (1994): Isolation of a *Francisella tularensis* mutant that is sensitive to serum and oxidative killing and is avirulent in mice: correlation with the loss of MinD homologue expression. FEMS Microbiol letters. 124: 157-165. In: Barker J. R. et Klose K. E. (2007): Molecular and genetic basis of pathogen *Francisella tularensis*. Annals of the New York Academy of Science. 1105: 138-159.
7. Anthony L. S., Morrissey P. J., Nano F. E. (1992): Growth inhibition of *Francisella tularensis* live vaccine strain by IFN-gamma-activated macrophages is mediated by reactive nitrogen intermediates derived from l-arginine metabolism. Journal of Immunology. 148: 1829–34. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunophatogenesis of a potential Agent of Biowarfare. Annual reviews Microbiology. 60: 167-185.

8. Aragon V., Kurtz S. et Cianciotto N. P. (2001): *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection. *Infection and Immunity*. 69 (1): 177-185.
9. Asare R. et Kwaik Y. A. (2010): Exploitation of Host Cell Biology and Evasion of Immunity by *Francisella Tularensis*. *Frontiers in Microbiology*. 1: 145.
10. Baca O. G., Roman M. J., Glew R. H., Christner R. F., Buhler J. E. et Aragon A. S. (1993): Acid phosphatase activity in *Coxiella burnetii*: a possible virulence factor. *Infection and Immunity*. 61 (10): 4232-4239.
11. Bailey, R. (1999): Eye infections in the tropics. In: Foley J. E. et Nathan C. N. (2010): Tularemia. *Veterinary Microbiology* 140: 332-338.
12. Bakshi, C. S., M. Malik, K. Regan, J. A. Melendez, D. W. Metzger, V. M. Pavlov, and T. J. Sellati. (2006): Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *Journal of Bacteriology*. 188:6443–6448.
13. Baron G. S., Reilly T. J. et Nano F. E. (1999): The respiratory burst-inhibiting acid phosphatase AcpA is not essential for the macrophage growth or virulence of *Francisella novicida*. *FEMS Microbiology letters*. 176:c85-90.
14. Bell J. F. (1977): Tularemia - a review, *CRC Handbook Series in Zoonoses*, p. 161. In: Petersen J. M. et Chriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. 36: 455-467.
15. Berberich M. A. (1972): A glutamate-dependent phenotype in *E. coli* K12: the result of two mutations. *Biochemical and biophysical research communications*. 47 (6): 1498-1503. In: Heeswijk W. C., Westerhoff H. V. et Boogerd F. C. (2013): Nitrogen Assimilation in *Escherichia coli*: Putting Molecular Data into a Systems Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77 (4): 628-695.
16. Bevanger L., Maeland J. A. et Kvan A. I. (1994): Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1 (2): 238-240.
17. Bosio C. M. et Dow S. W. (2005): *Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells. *Journal of Immunology*. 175 (10): 6792-6801.

18. Boyce J. M. (1975): Recent trends in the epidemiology of tularemia in the United States. *Journal of infectious diseases*. 131 (2): 197-199. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.
19. Brabetz W., Müller-Loennies S. et Brade H. (2000): 3-Deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic Acid (Kdo) Transferase (WaaA) and Kdo Kinase (KdkA) of *Haemophilus influenzae* Are Both Required to Complement a waaAKnockout Mutation of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 34954-34962.
20. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Byström M., Eriksson U., Larsson E., Prior R. G., Sjöstedt A., Titball R. W. et Forsman M. (2003): Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (7): 2924-2931.
21. Bröms J. E., Sjöstedt A. et Levander M. (2010): The Role of the *Francisella tularensis* Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology*. 1: 136
22. Brotcke A. et MOnack D. M. (2008): Identification of fevR, a novel regulator of virulence gene expression in *Francisella novicida*. *Infection and Immunity*. 76 (8): 3473-3480.
23. Brown S. L., McKinney F. T., Klein G. C. et Jones W. L. (1980): Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*. 11 (2): 146-148.
24. Bruin O. M., Duplantis B. N. et Ludu J. S. (2011): The biochemical properties of the *Francisella* pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IglA, IglB, IglC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology*, 157 (12): 3483-3491.
25. Buddingh G. J. et Womack F. C. (1941): Observations on the infection of chick embryos with *Bacterium tularense*, *Brucella*, and *Pasteurella pestis*. *Journal of Experimental Medicine*. 74 (3): 213-222.
26. Burke, D. S. (1977): Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory acquired tularemia. *J. Infect. Dis.* 135:55–60. In: 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.



27. Clemens D. L., Lee B. Y. et Horwitz M. A. (2004): Virulent and Avirulent Strains of *Francisella tularensis* Prevent Acidification and Maturation of Their Phagosomes and Escape into the Cytoplasm in Human Macrophages. *Infection and Immunity*. 72 (6): 3204-17.
28. Clemens D. L., Lee B. Y. et Horwitz M. A. (2005): *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infection and Immunity*. 73 (9): 5892-5902.
29. Conlan J. W., KuoLee R., Shen H. et Webb A. (2002): Different host defences are required to protect mice from primary systemic vs pulmonary infection with the facultative intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis* LVS. *Microb Pathog*. 32:127–34. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a potential Agent of Biowarfare. *Annual reviews Microbiology*. 60: 167-185
30. Conlan J. W., Shen H., Kuolee R., Zhao X. et Chen W. (2005): Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alphabeta T cell- and interferon gamma-dependent mechanism. *Vaccine* 23:2477–2485. In: Pechous R. D., McCarthy T. R. et Zahrt T. C. (2009): Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Dovelopment. *Microbiology and molecular biology reviews*,73 (4): 684-711.
31. Conlan, J. W. et P. C. Oyston. (2007): Vaccines against *Francisella tularensis*. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1105:325–350. In: Pechous R. D., McCarthy T. R. et Zahrt T. C. (2009): Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Dovelopment. *Microbiology and molecular biology reviews*,73 (4): 684-711.
32. Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Vaccaro R., De Rosa M. et Scandurra R. (1991): Extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry*. 202 (3): 1189-1196.
33. Cowley S. C. et Elkins K. L. (2011): Immunity to *Francisella*. *Frontiers in Microbiology*. 2: 26.

34. Cowley S. C., Hamilton E., Frelinger J. A., Su J., Forman J. et Elkins K. L. (2005): CD4–CD8– T cells control intracellular bacterial infections both *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 202 (2): 309-319.
35. Cowley S. C., Myltseva S. V. et Nano F. E. (1996): Phase variation in *Francisella tularensis* affecting intracellular growth, lipopolysaccharide antigenicity and nitric oxide production. *Mol. Microbiol.*, 20: 867-874. In: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 631-646.
36. Dahlstrand S., Ringertz O. et Zetterberg B. (1971): Airborne tularemia in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 3:7–16. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a potential Agent of Biowarfare. *Annual reviews Microbiology*. 60: 167-185
37. Dai S., Mohapatra N. P., Schlesinger L. S. et Gunn J. S. (2012): The Acid Phosphatase AcpA Is Secreted In Vitro and in Macrophages by *Francisella* spp. *Infection and Immunity*. 80 (3): 1088-1097.
38. Darling R. G., Catlett C. L., Huebner K. D. et Jarrett D. G. (2002): Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emergency medicine clinics of North America*. 20 (2): 273-309. In: Petersen J. M. et Chriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. 36: 455-467.
39. Dennis D. T. (2001): Tularemia as a biological weapon - medical and public health management. *JAMA*. 285: 2763-2773. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
40. Dienst F. T. (1963): Tularemia: a perusal of three hundred thirty-nine cases. *The journal of the Louisiana State Medical Society*. 115: 114-127. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
41. Dorofe'ev K. A. (1947): Classification of the causative agent of tularemia. *Symposium Research Works Institute Epidemiology and Microbiology Chita*. 1: 170-180. In: Ellis J., Oyston P. C., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology reviews*. p 631-646.
42. Eigelsbach H. T. et Downs C. M. (1961): Prophylactic effectiveness of live and killed tularemia vaccines. I. Production of vaccine and evaluation in the white

- mouse and guinea pig. *Journal of immunology*. 87: 415-425. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.
43. Eliasson H., Lindbäck J., Nuorti J. P., Arneborn M., Giesecke J. et Tegnell A. (2002): The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerging infectious diseases*. 8 (9): 956-960.
  44. Elkins K. L., Cooper A., Colombini S. M., Cowley S. C. et Kieffer T. L. (2002): In vivo clearance of an intracellular bacterium, *Francisella tularensis* LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70. *Infection and Immunity*. 70 (4): 1936-1948.
  45. Elkins K. L., Rhinehart-Jones T., Nacy C. A., Winegar R. K. et Fortier A. H. (1993): T-cell-independent resistance to infection and generation of immunity to *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*. 61(3):823-9.
  46. Ellis J., Oyston P. C., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*. 15 (4): 631-646.
  47. Enderlin G., Morales L., Jacobs R. F. et Cross J. T. (1994): Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularemia: review of the literature. *Clinical infectious diseases*. 19 (1): 42-47. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
  48. Evans M. E., Gregory D. W., Schaffner W., McGee Z. A. (1985): Tularemia: a 30 year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore)*, 64: 251-269.
  49. Eyles J. E., Unal B., Hartley M. G., Newstead S. L., Flick-Smith H., Prior J. L., Oyston P. C., Randall A., Mu Y., Hirst S., Molina D. M., Davies D. H., Milne T., Griffin K. F., Baldi P., Titbal R. W. et Felgner P. L. (2007): Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Proteomics*. 7 (13): 2172-2183.
  50. Farlow J., Smith K. L., Wong J., Abrams M., Lytle M. et Keim P. (2001): *Francisella tularensis* Strain Typing Using Multiple-Locus, Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39 (9): 3186-3192.
  51. Feldman K. A., Ensore R. E., Lathrop S. L., Matyas B. T., McGuill M., Schriefer M. E., Stiles-Enos D., Dennis D. T., Petersen L. R. et Hayes E. B. (2001): An outbreak of primary pneumonic tularemia on Martha's Vineyard. *The New England journal of medicine*. 345 (22): 1601-1606.

52. Forslund A. L., Kuoppa K., Svensson K., Salomonsson E., Johansson A. et Bystrom M. (2006): Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Molecular Microbiology*. 59(6): 1818–30.
53. Forsman M., Sandstrom G. et Sjostedt A. (1994): Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44:38–46.
54. Fortier A. H., Leiby D. A., Narayanan R. B., Asafoadjei E., Crawford R. M., Nacy C. A. et Meltzer M. S. (1995): Growth of *Francisella tularensis* LVS in macrophages: the acidic intracellular compartment provides essential iron required for growth. *Infection and Immunity*. 63 (4): 1478-1483.
55. Foshay L., Hesselbrock W. H., Wittenberg H. J. et Rodenberg A. H. (1942): Vaccine prophylaxis against tularemia in man. *American Journal of Public Health, Nations Health* 32:1131–1145.
56. Francis E. (1922): Tularemia. VI. Cultivation of *Bacterium tularensis* on three additional mediums new to this organism. *Public Health Report*. 37 (17): 987-989.
57. Francis E. et Callender G. R. (1927): Tularemia: The microscopic changes of the lesions in man. *Archives of pathology and laboratory medicine*. 3: 577-607. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.
58. Fulop M., Leslie D. et Titball R. (1996): A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 54 (4): 364-366. In: Petersen J. M. et Schriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary research*. 36: 455-467.
59. Fulop M., Manchee R. et Titball R. (1996): Role of two outer membrane antigens in the induction of protective immunity against *Francisella tularensis* strains of different virulence. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 13 (3): 245-7.
60. Fulop M., Mastroeni P., Green M. et Titball R. W. (2001): Role of antibody to lipopolysaccharide in protection against low- and high-virulence strains of *Francisella tularensis*. *Vaccines*. 19 (31): 4465-4472. In: Steiner D. J., Furuya Y. et Metzger D. W. (2014): Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infection and Drug Resistance*. 7: 239-251.

61. García Del Blanco N., Dobson M. E., Vela A. L., De La Puente V. A., Gutiérrez C. B., Hadfield T. L., Kuhnert P., Frey J., Domínguez L. et Rodríguez Ferri E. F. (2002): Genotyping of *Francisella tularensis* strains by pulsed-field gel electrophoresis, amplified fragment length polymorphism fingerprinting, and 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. 40 (8): 2964-2972.
62. Gil H., Platz G. J., Forestal C. A., Monfett M., Bakshi C. S., Sellati T. J., Furie M. B., Benach J. L. et Thanassi D. G. (2006): Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence. *Journal of Bacteriology*. 188: 6443-6448.
63. Gil V., Cunha B. A. (1997): Tularemia pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* 12: 61-67. In: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 631-646.
64. Girinathan B. P., Braun S. E. et Govind R. (2014): *Clostridium difficile* glutamate dehydrogenase is a secreted enzyme that confers resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Microbiology*. 160 (1): 47-55.
65. Golovliov I., Baranov V., Kročová Z., Kovářová H. et Sjöstedt A. (2003): An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* can escape the Phagosome of Monocytic Cells. *Infection and Immunity*. 71 (10): 5940-50.
66. Golovliov I., Ericsson M., Sandstrom G., Tärnvik A. et Sjöstedt A. (1997): Identification of proteins of *Francisella tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kilodalton protein. *Infection and Immunity*. 65: 2183-2189.
67. Golovliov I., Sjöstedt A., Morkrievich A. et Pavlov V. (2003): A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiology letters*. 222: 273-280.
68. Gray C. G., Cowley S. C., Cheung K. K. M. et Nano F. E. (2002): The identification of five genetic loci of *Francisella novicida* associated with intracellular growth. *FEMS Microbiology letters*; 215(1):53–56.
69. Griffiths A. J. F., Miller J. H. et Suzuki D. T. (2000): *An Introduction to Genetic Analysis*. 7th edition, New York, WH Freeman. Conjugation. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21942/>.
70. Gunka K., Tholen S., Gerwig J., Herzberg C., Stulke J. et Commichau F. M. (2012): A highfrequency mutation in *Bacillus subtilis*: requirements for the

- decryptification of the *gudB* glutamate dehydrogenase gene. *Journal of Bacteriology*. 194: 1036-1044.
71. Gurycová D. (1997): Analysis of the incidence and routes of transmission of tularemia in Slovakia. *Journal of Epidemiology, Microbiology, Immunology*. 46: 67-72. In: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M., Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 631-646.
72. Hager A. J., Bolton D. L., Pelletier M. R., Brittnacher M. J., Gallagher L. A. et Kaul R. (2006): Type IV pili-mediated secretion modulates *Francisella* virulence. *Molecular Microbiology*; 62(1):227–37.
73. Hall L., Doerr K. A., Wohlfield S. L. et Roberts G. D. (2003): Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (4): 1447-1453.
74. Harris S. (1992): Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. *Annual of New York Academy of Science*. 666: 21-52. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
75. Hollis D. G., Weaver R. E., Steigerwalt A. G., Wenger J. D., Moss C. W. et 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.
76. Hood A. M. (1977): Virulence factors of *Francisella tularensis*. *Journal of Hygiene*. 79:47–60.
77. Hubálek Z., Sixl W. et Halouzka J. (1998): *Francisella tularensis* in Dermacentor reticulatus ticks from the Czech Republic and Austria. *Wien. Klinische Wochenschr*. 110: 909-910. In: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 631-646.
78. Hubálek Z., Sixl W., Halouzka J. et Mikulášková M. (1997): Prevalence of *Francisella tularensis* in Dermacentor reticulatus ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. *Central European journal of public health*. 5 (4): 199-201. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.

79. Chalabaev S., Kim T. H., Ross R., Derian A. et Kasper D. L. (2010): 3-Deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) hydrolase identified in *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, and *Legionella pneumophila*. *Journal of Biological Chemistry*. 285 (45): 34330-34336.
80. Chamberlain R. E. (1965): Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Applied Microbiology*. 13 (2): 232-235.
81. Charity J. C., Costante-Hamm M. M., Balon E. L., Boyd D. H., Rubin E. J. et Dove S. L. (2007): Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PloS Pathology*. 3 (6): e84.
82. Checroun C., Wehrly T. D., Fischer E. R., Hayes S. F. et Celli J. (2006): Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 103 (39): 14578-14583.
83. Child R., Wehrly T. D., Rockx-Brouwer D., Dorward D. W. et Celli J. (2010): Acid Phosphatases Do Not Contribute to the Pathogenesis of Type A *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*. 78 (1): 59-67.
84. Chocarro A., Gonzales A. et Garcia I. (2000): Treatment of tularemia with ciprofloxacin. *Clinical infectious disease*. 31 (2): 623.
85. Chong A., Wehrly T. D., Nair V., Fischer E. R., Barker J. R., Klose K. E. et Celli J. (2008): The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infection and Immunity*. 76:5488–5499.
86. Christenson B. (1984): An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 16: 285-290. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
87. Isobe T., White K. A., Allen A. G., Peacock M., Raetz Ch. R. H. et Maskell D. J. (1999): *Bordetella pertussis* waaA Encodes a Monofunctional 2-Keto-3-Deoxy-d-manno-Octulosonic Acid Transferase That Can Complement an *Escherichia coli* waaA Mutation. *Journal of Bacteriology*. 181 (8): 2648-2651.
88. Janes B. K., Pomposiello P. J., Perez-Matoz A., Najarian D. J., Goss T. J. et Bender R. A. (2001): Growth Inhibition Caused by Overexpression of the Structural Gene for Glutamate Dehydrogenase (gdhA) from *Klebsiella aerogenes*. *Journal of Bacteriology*. 183 (8): 2709-2714.

89. Johansson A., Berglund L., Sjöstedt A. et Tärnvik A. (2001): Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clinical infectious diseases*. 33 (2): 267-268.
90. Johansson A., Urich S. K., Chu M. C., Sjöstedt A. et Tärnvik A. (2002): *In vitro* susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 34 (5): 327-330. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
91. Jones C. L., Napier B. A., Sampson T. R., Llewellyn A. C., Schroeder M. R. et Weiss D. S. (2012): Subversion of Host Recognition and Defense Systems by *Francisella* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76 (2): 383-404.
92. Jungnitz H., West N. P., Walker M. J., Chhatwal G. S. et Guzmán C. A. (1998): A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infection and Immunity*. 66 (10): 4640-4650.
93. Keasling J. D., Van Dien S. J., Trelstad P., Renninger N. et McMahon K. (2000): Application of Polyphosphate Metabolism to Environmental and Biotechnological Problems. *Biochemistry*. 65 (3): 324-331.
94. Kim K. S., Rao N. N., Fraley C. D. et Kornberg A. (2002): Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99 (11): 7675-7680.
95. Kobayashi T., Higuchi S., Kimura K., Kudo T. et Horikoshi K. (1995): Properties of glutamate dehydrogenase and its involvement in alanine production in a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*. *Journal of Biochemistry*. 118 (3): 587-592.
96. Konečná K., Hernychová L., Reichelová M., Lenčo J., Klimentová J., Stulík J., Macela A., Alefantis T. et Delvecchio V. G. (2010): Comparative proteomic profiling of culture filtrate proteins of less and highly virulent *Francisella tularensis* strains. *Proteomics*. 10 (24): 4501-4511.
97. Kornberg A., Rao N. N. et Ault-Riché D. (1999): Inorganic polyphosphate: a molecule of many function. *Annual review of biochemistry*. 68 (7): 89-125.
98. Kuroda A., Murphy H., Cashel M. et Kornberg A. (1997): Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 272 (34): 21240-21243.



99. Lai X. H. et Sjöstedt A. (2003): Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infection and Immunity*. 71 (8): 4642-4646.
100. Lai X. H., Golovliov I. et Sjöstedt A. (2001): *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infection and Immunity*. 69 (7): 4691-4694.
101. Lai X. H., Golovliov I. et Sjöstedt A. (2004): Expression of IgIC is necessary for intracellular growth and induction of apoptosis in murine macrophages by *Francisella tularensis*. *Microbial Pathogenesis*. 37: 225-230.
102. Larsson P. (2005): The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nature Genetics*. 37: 153-159.
103. Larsson P., Elfsmark D., Svensson K., Wikström P., Forsman M., Brettin T., Keim P. et Johansson A. (2009): Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathogens*. 5 (6): e1000472.
104. Lauriano C. M., Barker J. R., Yoon S. S., Nano F. E., Arulanandam B. P., Hasset D. J. et Klose K. E. (2004): MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 101 (12): 4246-4249.
105. Lee Y. H., Kingston A. W. et Helmann J. D. (2012): Glutamate Dehydrogenase Affects Resistance to Cell Wall Antibiotics in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 194 (5): 993-1001.
106. Lenčo J., Link M., Tambor V., Žáková J., Červený J. et Stulík A. 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.
107. Levine B., Mizushima N. et Virgin H. W. (2011): Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 469 (7330): 323-335.
108. Libich J. (1981): Tularémie, Avicentrum, Praha. 117 s.
109. Lindemann S. R., Peng K., Long M. E., Hunt J. R., Apicella M. A., Monack D. M., Allen L. A. et Jones B. D. (2011): *Francisella tularensis* Schu S4 O-antigen and

- capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infection and Immunity*. 79 (2): 581-594.
- 110.Lindgren H., Golovliov I., Baranov V., Ernst R. K., Telepnev M. et Sjöstedt A. (2004): Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 953-958.
- 111.Lindgren H., Honn M., Salomonsson E., Kuoppa K., Forsberg A. et Sjöstedt A. (2011): Iron content differs between *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and subspecies *holarctica* strains and correlates to their susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced killing. *Infection and Immunity*. 79 (3): 1218-1224.
- 112.Lindgren H., Shen H., Zingmark C., Golovliov I., Conlan W. et Sjöstedt A. (2007): The resistance of *Francisella* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infection and Immunology*. 75 (3): 1303-1309.
- 113.Lodish H., Berk A. et Zipursky S. L. (2000): *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman. DNA Cloning with Plasmid Vectors. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>.
- 114.LoVullo E. D., Sherrill L. A., Perez L. L. et Pavelka M. S. (2006): Genetic tools for highly pathogenic *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Microbiology*. 152: 3425-3435.
- 115.Lu Ch. et Abdelal A. T. (2001): The *gdhB* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* Encodes an Arginine-Inducible NAD<sup>+</sup>-Dependent Glutamate Dehydrogenase Which Is Subject to Allosteric Regulation. *Journal of Bacteriology*. 183 (2): 490-499.
- 116.Ludu J. S., Bruin O. M., Duplantis B. N., Schmerk C. L., Chou A. Y., Elkins K. L. et Nano F. E. (2008): *Francisella* Pathogenicity Island Protein PdpD Is Required for Full Virulence and Associates with Homologues of the Type VI Secretion System. *Journal of Bacteriology*. 190 (13): 4584-4595.
- 117.Lyons C. R. et Wu T. H. (2007): Animal models of *Francisella tularensis* infection. In: Kwaik Y. A., Metzger D. W., Nano F., Sjöstedt A. et Titball R. (2007): *Francisella tularensis: biology, pathogenicity, epidemiology and biodefense*; p. 238–65.
- 118.Macela A. (2003): Vysoce riziková biologická agens, Úvod do managementu biologických událostí, 2002. Praha, Státní úřad pro jadernou bezpečnost: Azin CZ, s.r.o., 47-50

119. Malý J. (2005): Biologie prokaryot a virů. Učební text, Katedra biologie PřF UJEP, Ústí nad Labem. 48 s.
120. McCaig W. D., Koller A. et Thanassi D. G. (2013): Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *Journal of Bacteriology*. 195 (6): 1120-1132.
121. McCoy G. W. et Chapin C. W. (1912): Further observations on a plague-like diseases of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularensis*. *Journal of Infectious Diseases*. 10: 61–72.
122. McDonald M. K., Cowley S. C. et Nano F. E. (1997): Temperature-sensitive lesions in the *Francisella novicida valA* gene cloned into an *Escherichia coli msbA lpxK* mutant affecting deoxycholate resistance and lipopolysaccharide assembly at the restrictive temperature. *Journal of Bacteriology*. 179 (24): 7638-7643.
123. McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. (2006): *Francisella tularensis*: taxonomy, genetics, and immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annual Review of Microbiology*. 60: 167-185.
124. Mdluli K. E., Anthony L. S., Baron G. S., McDonald M. K., Myltseva S. V. et Nano F. E. (1994): Serum-sensitive mutation of *Francisella novicida*: association with an ABC transporter gene. *Microbiology*. 140 (12): 3309-3318.
125. Merrick M. J. et Edwards R. A. (1995): Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiological Reviews*. 59 (4): 604-622.
126. Milton D. L., O'Toole R., Hörstedt P. et Wolf-Watz H. (1996): Flagellin A Is Essential for the Virulence of *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*. 178 (5): 1310-1319.
127. Minambres B., Olivera E. R., Jensen R. A. et Luengo J. M. (2000): A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetic characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of Biology and Chemistry*. 275 (50): 39529-39542.
128. Mobley H. L. T., Mendz G. L. et Hazell S. L. (2001): *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Nitrogen Metabolism. Washington: ASM Press. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2412/#A1271>.
129. Mohapatra N. P., Balagopal A., Soni S., Schlesinger L. S. et Gunn J. S. (2007): AcpA is a *Francisella* acid phosphatase that affects intramacrophage survival and virulence. *Infection and Immunity*. 75 (1): 390-396.

- 130.Mörner T. (1992): The ecology of tularemia. *Revue scientifique et technique* (International office of epizootics). 11 (4): 1123-1130. In: Petersen J. M. et Chriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. 36: 455-467
- 131.Nano F. E. et Schmerk C. (2007): The *Francisella* Pathogenicity Island. *Annals of the New York Academy of Science*. 1105: 122-137.
- 132.Nano F. E. et Schmerk C. (2007): The *Francisella* pathogenicity island. *Annual of New York Academy of Science*. 1105: 122-137.
- 133.Nano F. E., Zhang N., Cowley S. C., Klose K. E., Cheung K. K., Roberts M. J., Ludu J. S., Letendre G. W., Meierovics A. I., Stephens G. et Elkins K. L. (2004): A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *Journal of Bacteriology*. 186 (19): 6430-6
- 134.Nudleman E. et Kaiser D. (2004): Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 7:52–62. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunophatogenesis of a potential Agent of Biowarfare. *Annual reviews Microbiology*. 60: 167-185
- 135.O'Farrell A. M., Liu Y., Moore K. W. et Mui A. L. (1998): IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO Journal*. 17 (4): 1006-1018.
- 136.Ohara H. (1925): Human inoculation experiment with a disease of wild rabbits, with a bacteriologic study. *Kinsei Igaku*. 12: 401. In: Petersen J. M. et Chriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. 36: 455-467
- 137.Ohara Y., Sato T. et Homma M. (1996): Epidemiological analysis of tularemia in Japan (yato-byo). *FEMS immunology and medical microbiology*. 13 (3): 185-189. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.
- 138.Ohara Y., Sato T. et Homma M. (1998): Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1374 cases observed between 1924 and 1996. *J. Med. Entomol*. 35: 471-473. In: Ellis J., Oyston P. C. F., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4): 631-646.
- 139.Okan N. A. et Kasper D. L. (2013): The atypical lipopolysaccharide of *Francisella*. *Carbohydrate Research*. 378: 79-83.

140. Okan N. A., Chalabaev S., Kim T. H., Fink A., Ross R. A. et Kasper D. L. (2013): Kdo hydrolase is required for *Francisella tularensis* virulence and evasion of TLR2-mediated innate immunity. *American Society for Microbiology*. 4 (1): e00638-12.
141. Owen C. R. (1974): Genus *Francisella*. p 283-285. In: Ellis J., Oyston P. C., Green M. et Titball R. W. (2002): Tularemia. *Clinical Microbiology reviews*. p 631-646.
142. Oyston P. C., Sjostedt A. et Titball R. W. (2004): Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol*, 2:967–978. In: Karsten R. O. et Kerry A. C. (2009): Environmental Adaptation of *Francisella tularensis*. *Microbes and Infection*. 11 (10-11): 828-834.
143. Pearson M. M., Yep A., Smith S. N. et Mobley H. L. T. (2011): Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the Murine Urinary Tract: Virulence and Nitrogen Assimilation Gene Expression. *Infection and Immunity*. 79 (7): 2619-2631.
144. Pechous R., Celli J., Penoske R., Hayes S. F., Frank D. W. et Zahrt T. C. (2006): Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infection and immunity*. 74 (8): 4452-4461.
145. Pelletier N., Raoult D. et La Scola B. (2009): Specific recognition of the major capsid protein of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus by sera of patients infected by *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiology Letters*. 297 (1): 117-123.
146. Pérez-Castrillón J. L., Bachiller-Luque P., Martín-Luquero M., Mena-Martín F. J. et Herreros V. (2001): Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clinical infectious diseases*. 33 (4): 573-576.
147. Pollitzer R. (1967): History and incidence of tularemia in the Soviet Union: a review. *Institute of Contemporary Russian Studies, Fordham University*. p.366. In: Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularaemia. *European respiratory journal*. 21: 361-373.
148. Polsinelli T., Meltzer M. S. et Fortier H. A. (1994): Nitric oxide-independent killing of *Francisella tularensis* by IFN-gamma-stimulated murine alveolar macrophages. *Journal of Immunology*. 153 (3): 1238-1245. In: Steiner D. J., Furuya Y. et Metzger D. W. (2014): Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infection and Drug Resistance*. 7: 239-251.

149. Prior J. L., Prior R. G., Hitchen P. G., Diaper H., Griffin K. F., Morris H. R., Dell A. et Titball R. W. (2003): Characterization of the O antigen gene cluster and structural analysis of the O antigen of *Francisella tularensis* subsp *tularensis*. *Journal of Medical Microbiology*. 52:845–51.
150. Raetz C. R. et Whitfield C. (2002): Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*. 71:635–700.
151. Rao N. N. et Kornberg A. (1996): Inorganic Polyphosphate Supports Resistance and Survival of Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 178 (5): 1394-1400.
152. Rashid M. H. et Kornberg A. (2000): Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (9): 4885-4890.
153. Raynaud C., Meibom K. L., Lety M. A., Dubail I., Candela T., Frapy E. et Charbit A. (2007): Role of the wbt locus of *Francisella tularensis* in lipopolysaccharide O-antigen biogenesis and pathogenicity. *Infection and Immunity*. 75 (1): 536-541.
154. Reintjes R., Dedushaj I., Gjini A., Jorgensen T. R., Cotter B., Lieftucht A., D'Ancona F., Dennis D. T., Kosoy M. A., Mulliqi-Osmani G., Grunow R., Kalaveshi A., Gashi L. et Humolli I. (2002): Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerging infectious diseases*. 8 (1): 69-73.
155. Rhinehart-Jones T. R., Fortier A. H. et Elkins K. L. (1994): Transfer of immunity against lethal murine *Francisella* infection by specific antibody depends on host gamma interferon and T cells. *Infection and Immunity*. 62 (8): 3129-3137.
156. Richards M. I., Michell S. L. et Oyston P. C. (2008): An intracellularly inducible gene involved in virulence and polyphosphate production in *Francisella*. *Journal of Medical Microbiology*. 57 (10): 1183-1192.
157. Riley R. L. (1957): Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. *American review of tuberculosis*. 76: 931-941. In: Oyston P. C., Sjöstedt A. et Titball R. W. (2004): Tularemia: Bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nature reviews Microbiology*. 2: 967-978.
158. Saleh M. T. et Belisle J. T. (2000): Secretion of an acid phosphatase (SapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. *Journal of Bacteriology*. 182 (23): 6850-6853.

159. Salomonsson E., Kuoppa K., Forslund A. L., Zingmark C., Golovliov I., Noppa L., et Forsberg A. (2009): Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain (LVS) of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*. 77 (8): 3424-3431.
160. Sandström G., Lofgren S. et Tarnvik A. (1988): A capsule-deficient mutant of *Francisella tularensis* LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*. 56:1194–202.
161. Santero E., Hervás A. B., Canosa I. et Govantes F. (2012): Glutamate Dehydrogenases: Enzymology, Physiological Role and Biotechnological Relevance. In: Canuto R. A. (2012): *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: "Dehydrogenases"*. ISBN 978-953-307-019-3.
162. Saslaw S., Eigelsbach H. T., Prior J. A., Wilson H. E. et Carhart S. (1961): Tularemia vaccine study. II Respiratory challenge. *Archives of Internal Medicine*. 107:702–14. In: McLendon M. K., Apicella M. A. et Allen L. A. H. (2006): *Francisella tularensis: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a potential Agent of Biowarfare*. *Annual reviews Microbiology*. 60: 167-185
163. Shepard C. C. (1959): Nonacid-fast bacteria and HeLa cells: their uptake and subsequent intracellular growth. *Journal of Bacteriology*. 63 (4): 1478-1483.
164. Shi X., Rao N. N. et Kornberg A. (2004): Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (49): 17061-17065.
165. Shi Y. (2002): Review Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*. 9 (3): 459-470.
166. Shiba T., Tsutumi K., Yano H., Ihara Y., Kameda A., Tanaka K., Takahashi H., Munekata M., Rao N. N. et Kornberg A. (1997): Inorganic polyphosphate and the induction of rpoS expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94 (21): 11210-11215.
167. Schilling B., McLendon M. K., Phillips N. J., Apicella M. A. et Gibson B. W. (2007): Characterization of lipid A acylation patterns in *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, and *Francisella philomiragia* using multiple-stage mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization on an intermediate vacuum source linear ion trap. *Analytical chemistry*. 79 (3): 1034-1042.

168. Sjöstedt A. (2002): Family XVII. *Francisellaceae*, genus I. *Francisella*. In: Petersen J. M. et Chriefer M. E. (2004): Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. 36: 455-467.
169. Sjöstedt A., Conlan J. W. et North R. J. (1994): Neutrophils are critical for host defense against primary infection with the facultative intracellular bacterium *Francisella tularensis* in mice and participate in defense against reinfection. *Infection and Immunity*. 62:2779–83.
170. Smith E. L., Austen B. M., Blumentahl K. M. et Nyc J. F. (1975): Glutamate dehydrogenases. In: Santero E., Hervás A. B., Canosa I. et Govantes F. (2012): Glutamate Dehydrogenases: Enzymology, Physiological Role and Biotechnological Relevance. In: Canuto R. A. (2012): Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: "Dehydrogenases". ISBN 978-953-307-019-3.
171. Steele S., Brunton J., Ziehr B., Taft-Benz S., Moorman N. et Kawula T. (2013): *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathogens*. 9 (8): e1003562.
172. Steiner D. J., Furuya Y. et Metzger D. W. (2014): Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infection and Drug Resistance*. 7: 239-251.
173. Strachan T. et Read A. P. (1999): *Human Molecular Genetics*. 2nd edition. New York: Wiley-Liss. Chapter 4, Cell-based DNA cloning. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7579/>.
174. Sullivan J. T., Jeffrey E. F., Shannon J. D. et Ramakrishnan G. (2006): Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of *fsIA* in siderophore production. *Journal of Bacteriology*. 188 (11): 3785-3795.
175. Tärnvik A. et Berglund L. (2003): Tularemia. *The European Respiratory Journal*. 21 (2): 361-373.
176. Telepnev M., Golovliov I., Grundström T., Tärnvik A. et Sjöstedt A. (2003): *Francisella tularensis* inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- $\alpha$  and IL-1 from murine macrophages. *Cell Microbiology*. 5 (1): 41-51.
177. Thayil S. M., Morrison N., Schechter N., Rubin H. et Karakousis P. C. (2011): The Role of the Novel Exopolyphosphatase MT0516 in *Mycobacterium tuberculosis* Drug Tolerance and Persistence. *PLoS One*. 6 (11): e28076.



178. Thomas R. M., Titball R. W., Oyston P. C., Griffin K., Waters E., Hitchen P. G., Michell S. L., Grice I. D., Wilson J. C. et Prior J. L. (2007): The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infection and Immunity*. 75 (1): 371-378.
179. Thomas R., Johansson A., Neeson B., Isherwood K., Sjöstedt A., Ellis J. et Titball R. W. (2003): Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (1): 50-57.
180. Tigertt W. D. (1962): Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines. A review of selected articles. *Bacteriology Review*. 26:354–373.
181. Titball R. W., Johanson A. et Forsman M. (2003): Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends Microbiology*, 11 (3): 118-123.
182. Twine S., Bystrom M., Chen W. X., Forsman M., Golovliov I., Johansson A., Kelly J., Lingren H., Svensson K., Zingmark C., Conlan W. et 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):8345–52.
183. Viljoen A. J., Kirsten C. J., Baker B., Helden P. D. et Wiid I. J. F. (2013): The Role of Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase and Glutamate Dehydrogenase in Nitrogen Metabolism in *Mycobacterium bovis* BCG. *PLoS One*. 8 (12): e84452.
184. Wehrly T. D., Chong A., Virtaneva K., Sturdevant D. E., Child R., Edwards J. A., Brouwer D., Nair V., Fischer E. R., Wicke L., Curda A. J., Kupko J. J., Martens C., Crane D. D., Bosio K. M., Porcella S. F. et Celli J. (2009): Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiology*. 11 (7): 1128-1150.
185. Wherry W. B. et Lamb B. H. (2004): Infection of man with *Bacterium tularensis*. 1914. *Journal of infectious diseases*. 189 (7): 1321-1329.
186. Whipp M. J., Davis J. M., Lum G., de Boer J., Zhou Y., Bearden S. W., Petersen J. M., Chu M. C. et Hogg G. (2003): Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *Journal of medical microbiology*. 52 (9): 839-842.
187. World Health Organization (2007): WHO Guidelines on Tularaemia. WHO Press. ISBN 978 92 4 154737 6.

188. World Health Organization. Health Aspects of chemical and biological weapons (WHO, Geneva 1970).
189. Wrench A. P., Gardner Ch. L., Siegel S. D., Pagliai F. A., Malekiha M., Gonzales C. F. et Lorca G. L. (2013): MglA/SspA Complex Interactions Are Modulated by Inorganic Polyphosphate. PloS One. 8 (10): e76428.
190. Zogaj X. et Klose K. E. (2010): Genetic Manipulation of *Francisella Tularensis*. Frontiers in Microbiology. 1: 142.

# Přílohy

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma intracelulárního růstu <i>F. tularensis</i> v makrofágu (Steiner et al., 2014).....	19
Obrázek 2: Schematické rozložení genů FPI kmenů SCHU S4, LVS a U112, převzato z Bröms et al., 2010.....	21
Obrázek 3: Schéma vzniku delečních mutantních kmenů <i>F. tularensis</i> .....	27
Obrázek 4: Schéma biosyntetické dráhy glutamátu a glutaminu (vytvořeno dle Merrick et Edwards, 1995).....	31
Obrázek 5: Schéma využití glutamátu jako donoru amino skupiny pro syntézu aminokyselin (vytvořeno dle Santero et al., 2012).....	32
Obrázek 6: Rozvržení primerů pro syntézu delečního konstruktů.....	41
Obrázek 7: Amplifikace fragmentů AB a CD.....	58
Obrázek 8: Stanovení poměru fragmentů AB a CD jako templátu do PCR reakce amplifikace AD fragmentů.....	59
Obrázek 9: Amplifikace fragmentů AD (0265, 0611, 0815, 1462).....	60
Obrázek 10: Schéma pCR®4-TOPO vektoru.....	60
Obrázek 11: Kontrolní restriční štěpení plazmidu ADpCR4.....	61
Obrázek 12: Kontrolní PCR plazmidu ADpCR4..... <b>Chyba! Záložka není definována.</b>	
Obrázek 13: Restriční štěpení pro izolaci pDM4 a AD z ADpCR4.....	62
Obrázek 14: PCR na koloniích ADpDM4 ( <i>E. coli</i> NEB Turbo).....	63
Obrázek 15: PCR na koloniích ADpDM4 ( <i>E. coli</i> S17-1 $\lambda$ pir).....	64
Obrázek 16: Ověření mutantního kmene $\Delta$ 1462/200.....	65
Obrázek 17: Ověření mutantního kmene $\Delta$ 0815/200.....	65
Obrázek 18: Ověření mutantního kmene $\Delta$ 0265/200.....	66
Obrázek 19: Ověření mutantního kmene $\Delta$ 0611/200.....	67

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Jednotlivé geny z FPI konkrétních kmenů <i>F. tularensis</i> (Bröms et al., 2010).....	22
Tabulka 2: Komponenty kontrolního restričního štěpení plazmidů nesoucích AD produkt.....	44
Tabulka 3: Komponenty restričního štěpení pro izolaci fragmentu AD z plazmidu....	44
Tabulka 4: Komponenty restričního štěpení plazmidu pDM4.....	44
Tabulka 5: Složení a podmínky PCR reakce s použitím <i>Pfu</i> polymerázy – amplifikace AB a CD fragmentů.....	46
Tabulka 6: Složení a podmínky PCR reakce pro amplifikaci AD produktu.....	45
Tabulka 7: Složení a podmínky PCR reakce s použitím Quick-Load <i>Taq</i> 2x Master Mix.....	46

Tabulka 8: PCR na koloniích - testování potencionálních mutantních kmenů.....	46
Tabulka 9: Ligační směs .....	47
Tabulka 10: Ředění pro CFU v jednotlivých časových intervalech .....	55
Tabulka 11: Parametry pro měření růstové křivky .....	56
Tabulka 12: Základní údaje sledovaných genů v <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 .....	57
Tabulka 13: Koncentrace chromozomální DNA <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 .....	58
Tabulka 14: Velikosti jednotlivých AB a CD fragmentů .....	58
Tabulka 15: Délka jednotlivých AD fragmentů .....	59
Tabulka 16: Množství AD fragmentů (ng) v 20 $\mu$ l ligační směsi .....	62
Tabulka 17: Předpokládaný a skutečný počet aplikovaných bakterií pro infekci myši (FSC200 a $\Delta$ FTS1462/FSC200) .....	69
Tabulka 18: Předpokládaný a skutečný počet aplikovaných bakterií pro infekci myši (FSC200 a $\Delta$ FTS0815/FSC200) .....	69
Tabulka 19: Úhynový list pro $\Delta$ 0815/200 a FSC200.....	69
Tabulka 20: Úhynový list pro $\Delta$ 1462/200 a FSC200.....	70
Tabulka 21: Skutečné množství bakterií aplikovaných na jednu buňku BMMs .....	70
Tabulka 22: Logaritmičké hodnoty proliferace FSC200 a $\Delta$ 0815/200.....	71
Tabulka 23: Logaritmičké hodnoty proliferace FSC200 a $\Delta$ 1462/200.....	71

## Seznam grafů

Graf 1: Růstová křivka $\Delta$ 0815/200 v porovnání FSC200.....	68
Graf 2: Růstová křivka $\Delta$ 1462/200 v porovnání FSC200.....	68
Graf 3: Proliferace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 a $\Delta$ 0815/200 v BMMs.....	71
Graf 4: Proliferace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200 a $\Delta$ 1462/200 v BMMs.....	72