

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Vliv Gp46 na funkci HU proteinu bakterie *Francisella tularensis*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Bc. Eliška Sokolová

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své konzultantce, RNDr. Petře Špidlové, Ph.D., za její odborné vedení, lidský přístup, čas a ochotu, kterou mi věnovala v průběhu zpracování mé diplomové práce. Mé poděkování patří rovněž prof. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. za její cenné připomínky a realizaci mé práce. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry molekulární patologie a biologie VLF Univerzity obrany, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na praktické části mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji své rodině a nejbližším za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Eliška Sokolová

Školitel: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Školitel – konzultant: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

Název diplomové práce: Vliv Gp46 na funkci HU proteinu bakterie *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je vysoce virulentní bakterie a DNA vazebný HU protein představuje jeden z jejích významných faktorů virulence. Nedávno bylo publikováno, že protein Gp46 inhibuje funkci HU proteinu bakterie *Bacillus subtilis* (Zhang et al., 2022). Hlavním cílem předkládané diplomové práce bylo zjistit, zda protein Gp46 bakteriofága SPO1 *B. subtilis* funguje i jako inhibitor HU proteinu *F. tularensis*. Jelikož jsou HU proteiny vysoce konzervované, mohl by Gp46 fungovat jako univerzální inhibitor všech HU proteinů.

Na pracovišti (Katedra molekulární patologie a biologie, VLF Univerzita obrany) bakteriofág SPO1, ani jeho DNA, nebyl k dispozici, proto bylo nejprve nutné metodou overlap PCR získat gen *gp46* kódující protein Gp46. Následně byl protein Gp46 pomocí afinitní chromatografie purifikován z expresního systému *E. coli*. V podmínkách *in vivo* i *in vitro* jsme studovali, zda a jak protein Gp46 ovlivňuje životaschopnost a virulenci *F. tularensis*. Pomocí EMSA metody jsme prokázali, že DNA vazebná aktivita HU proteinu *F. tularensis* je *in vitro* inhibována proteinem Gp46 bakteriofága SPO1 *B. subtilis*. Dále jsme ukázali, že růst divokého kmene *F. tularensis* FSC200 exprimujícího Gp46 *in trans* (FSC200/Gp46) odpovídal kinetice růstu delečního mutantního kmene postrádajícího HU protein (FSC200/ Δ HU) a lišil se od růstu divokého kmene FSC200. Bakteriální proliferace kmene FSC200/Gp46 uvnitř kostně-dřeňových makrofágů byla srovnatelná s replikací delečního mutantního kmene FSC200/ Δ HU, přičemž účinnost replikace obou kmenů byla statisticky významně snížena ve srovnání s účinností replikace divokého kmene FSC200. Tyto výsledky v kombinaci s poznatky

z nedávno publikované studie o proteinu Gp46 nasvědčují, že protein Gp46 by mohl být univerzálním inhibítoem bakteriálních HU proteinů.

Klíčová slova:

Francisella tularensis, tularémie, virulence, HU protein, Gp46

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Biochemical Science

Candidate: Bc. Eliška Sokolová

Supervisor: prof. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Supervisor – consultant: RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.

Title of diploma thesis: The effect of Gp46 on function of HU protein of *Francisella tularensis*

Francisella tularensis is a highly virulent bacteria and the DNA binding HU protein is one of its important virulence factors. Recently, it was reported that the Gp46 protein inhibits the function of the *Bacillus subtilis* HU protein (Zhang et al., 2022). The main goal of the presented diploma thesis was to find out if the Gp46 protein of the *B. subtilis* bacteriophage SPO1 also works as an inhibitor of the *F. tularensis* HU protein. Given the high conservation of HU proteins, Gp46 might function as a universal inhibitor of all HU proteins.

At the Department of Molecular Pathology and Biology (Military Faculty of Medicine, University of Defense) neither bacteriophage SPO1 nor its DNA were available, thus, it was initially necessary to acquire the *gp46* gene, which encodes the Gp46 protein, using the overlap PCR method. Subsequently, the Gp46 protein was purified from the *E. coli* expression system using affinity chromatography. In both *in vivo* and *in vitro* conditions, we studied whether and how the Gp46 protein affects the viability and virulence of *F. tularensis*. Using the Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA), we demonstrated that the DNA binding activity of the *F. tularensis* HU protein is inhibited *in vitro* by the Gp46 protein of the *B. subtilis* bacteriophage SPO1. Next, we showed that the growth of the *F. tularensis* wild-type strain FSC200 expressing Gp46 *in trans* (FSC200/Gp46) matched the growth kinetics of the deletion mutant strain lacking the HU protein (FSC200/ Δ HU) and differed from the growth of the wild-type strain FSC200. Bacterial proliferation of the FSC200/Gp46 strain within bone-marrow derived macrophages was comparable to that of the deletion mutant strain FSC200/ Δ HU, with the replication efficiency of both strains being significantly reduced compared to the replication

efficiency of the wild-type strain FSC200. These results, combined with findings from a recently published study on the Gp46 protein, suggest that the Gp46 protein could be a universal inhibitor of HU proteins across bacterial species.

Keywords:

Francisella tularensis, tularemia, virulence, HU protein, Gp46

OBSAH

1	Úvod.....	11
2	<i>Francisella tularensis</i>	12
2.1	Charakteristika	12
2.2	Taxonomie.....	12
2.3	Laboratorní diagnostika.....	13
2.4	<i>F. tularensis</i> jako biologická zbraň.....	15
3	Tularémie.....	17
3.1	Epidemiologie	17
3.2	Patogeneze a imunita.....	19
3.2.1	Vstup do hostitelských buněk	20
3.2.2	Fagosom	20
3.2.3	Cytosol	21
3.2.4	Reakce hostitele na infekci.....	22
3.3	Klinický obraz.....	23
3.4	Léčba	24
3.5	Očkování	26
4	Faktory virulence.....	27
4.1	Lipopolysacharid.....	27
4.2	Kapsule.....	27
4.3	Pili typu IV	27
4.4	FPI proteiny.....	28
4.5	Regulátory transkripce	28
4.6	HU protein.....	29
5	Protein Gp46	31
6	Cíle práce.....	32
7	Experimentální část.....	33
7.1	Návrh primerů	33

7.2	Syntéza Gp46	34
7.2.1	Overlap PCR	34
7.2.2	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	36
7.2.3	Izolace PCR produktů z gelu.....	37
7.2.4	Měření koncentrace izolovaných fragmentů	38
7.3	Izolace plazmidové DNA	38
7.4	Restrikční štěpení	38
7.5	Klonování <i>gp46</i> do vektoru.....	39
7.6	Dezintegrace bakteriálních buněk	42
7.7	Izolace HU_HA z <i>F. tularensis</i> a Gp46 z <i>E. coli</i>	43
7.8	SDS-PAGE, western blot, imunodetekce	45
7.9	EMSA – HU_HA a Gp46.....	48
7.10	Klonování <i>gp46</i> do <i>F. tularensis</i>	50
7.11	Elektroporace	51
7.12	Měření růstových křivek	53
7.13	Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů (BMMs).....	54
7.14	Proliferace <i>F. tularensis</i> v BMMs	55
7.15	Infekce myši BALB/c.....	57
8	Výsledky.....	59
8.1	Syntéza částí genu <i>gp46</i>	59
8.2	Syntéza celého genu <i>gp46</i>	60
8.3	Izolace plazmidové DNA	60
8.4	Restrikční štěpení plazmidu pET28b a <i>gp46</i>	61
8.5	Klonování <i>gp46</i> do vektoru.....	62
8.6	Purifikace Gp46 z <i>E. coli</i>	64
8.7	SDS-PAGE, western blot a imunodetekce	65
8.8	EMSA.....	66

8.9	Klonování <i>gp46</i> do <i>F. tularensis</i>	69
8.10	Elektroporace	71
8.11	Růstové křivky	72
8.12	Proliferace v BMMs	73
8.13	Infekce myši BALB/c.....	74
9	Diskuze.....	76
10	Závěr.....	79
11	Seznam citované literatury	80
12	Seznam obrázků a tabulek.....	89
13	Seznam zkratk	91
14	Přílohy	93
14.1	Publikovaný vědecký článek (Spidlova et al., 2023)	93

1 Úvod

Gramnegativní, intracelulární patogen *Francisella tularensis* způsobuje onemocnění zvané tularémie. Bakterie je snadno šířitelná formou aerosolu, může způsobovat závažný průběh onemocnění až smrt a k nákaze stačí jen velmi malá infekční dávka. Tato fakta z ní dělají jednoho z nejvíce infekčních mikroorganismů, který známe. Tularémie je považována za zoonotické onemocnění, které se vyznačuje velkou škálou hostitelů. Diagnostika bývá obtížná, protože *F. tularensis* se špatně kultivuje. Onemocnění se vyskytuje v různých formách s rozdílným průběhem a zpravidla na tularémii není v první řadě pomýšleno. Pro úspěšnou terapii je zásadní rychlé nasazení účinných antibiotik. Antibiotická rezistence však představuje do budoucna velký problém. Dle Centers for Disease Control and Prevention (CDC) byla *F. tularensis* klasifikována do kategorie A, kam spadají mikroby s nejvyšším rizikem zneužití jako biologická zbraň. Díky možnému využití v bioterorismu zájem o studium této bakterie v posledních letech rapidně vzrostl. *F. tularensis* svým intracelulárním životním cyklem obchází mechanismy přirozené imunity a většina kmenů je vysoce virulentní. Faktorů virulence, proteinů, jež jsou zodpovědné za virulenci a schopnost unikát obranným mechanismům hostitele, byla doposud popsána celá řada a výzkum v této oblasti neustále pokračuje.

Ve své diplomové práci se zabývám studiem ovlivňování jednoho z faktorů virulence, tzv. HU proteinu. Jedná se o DNA vazebný protein, který ovlivňuje širokou škálu molekulárních procesů v buňkách. V nedávné době ve své práci Zhang et al. popsali protein Gp46, který je kódován v genomu bakteriofága SPO1 *Bacillus subtilis*, jako inhibitor HU proteinu *B. subtilis*. Autoři článku zde zmínili také myšlenku, že by Gp46 mohl fungovat jako univerzální inhibitor všech HU proteinů (Zhang et al., 2022). Vzhledem k tomu, že *F. tularensis* postrádající HU protein je velmi oslabená a ztrácí virulenci, mohl by protein Gp46 sloužit jako terapeutická látka proti tularémii.

2 *Francisella tularensis*

2.1 Charakteristika

Francisella tularensis je charakterizována jako opouzdřená, gramnegativní, fakultativně intracelulární bakterie, která způsobuje zoonotické onemocnění zvané tularémie (McLendon et al., 2006). Tento patogen není schopný pohybu, nevytváří spóry a vyžaduje aerobní prostředí. Mikroskopické zařazení není jednoznačné. Nejčastěji se uvádí, že má tyčinkovitý tvar, velikostně o průměru 0,8-1 μm x 0,4-0,6 μm (Bednář, 1996). Diagnostika *F. tularensis* není jednoduchá, obtížně se kultivuje a pro svůj růst vyžaduje obohacená média. Kultivace bývá doplněna metodami sérologickými a molekulárně-biologickými (Ellis et al., 2002). *F. tularensis* se vyznačuje vysokou schopností virulence s nízkou infekční dávkou při přenosu vzduchem a představuje tak vysoké riziko nákazy pro zdravotnický personál. V současné době se dostává neustále do popředí zájmu, jelikož je brána jako potenciální biologická zbraň (Cronquist, 2004).

Roku 1911 v Tulare County v Kalifornii došlo u syslů k vypuknutí nemoci podobné moru s neznámou etiologií. Později byl původce nemoci pojmenován jako *Bacterium tularense* podle lokace nálezu. Postupem času se zjistilo, že patogen dokáže v životním prostředí přetrvávat delší dobu a může vyvolat onemocnění i u lidí. První infekce u člověka byla popsána v roce 1913 (Petersen, Schriefer, 2005). Výzkumem tularémie se hojně zabýval Dr. Edward Francis, který se během svého bádání i sám touto nemocí nakazil. Na jeho počest byla bakterie rodově přejmenována právě jako *Francisella* (Jellison, 1972).

2.2 Taxonomie

Taxonomická historie *F. tularensis* je složitá a často se různě měnila. Zpočátku byla bakterie zařazena do rodu *Bacterium*, později do rodu *Pasteurella*, následně pak provizorně do rodu *Brucella*. V roce 1947 se rozhodlo, že bude jako první zástupce zařazena do nového rodu *Francisella* (Ellis et al., 2002).

Rod *Francisella* je jediným zástupcem spadající do čeledi *Francisellaceae*, která je členem γ -podtřídy proteobakterií podle sekvenční podobnosti malých RNA podjednotek (Svensson et al., 2005). V rámci rodu *Francisella* rozlišujeme na základě podobnosti DNA a složení mastných kyselin dva hlavní druhy: *F. tularensis* a *F. philomiragia* (McLendon et al., 2006). *F. philomiragia* je pro člověka patogenní jen zřídka, a to především pro osoby s oslabenou imunitou, a vyznačuje se nižší růstovou náročností než *F. tularensis* (Larsson et al., 2009).

F. philomiragia subsp. *noatunensis*, známý také jako patogen ryb, byl klasifikován jako samostatný druh *F. noatuensis* (Ottem et al., 2009). Huber et al. navrhli vytvoření dalšího druhu *F. hispaniensis* izolovaného z krve pacientky ve Španělsku (Huber et al., 2010).

Druh *F. tularensis* byl dříve členěn do pěti poddruhů: subsp. *tularensis* (nazývaný také jako typ A), *holarctica* (typ B), *novicida*, *mediasiatica* a japonská varianta poddruhu *holarctica* (McLendon et al., 2006). Později bylo navrženo, aby byl poddruh *novicida* zařazen jako samostatný druh *F. novicida* (Kingry, Petersen, 2014), nicméně toto zařazení není striktně dodržováno, a i v novějších publikacích se můžeme setkat s oběma názvy: *F. tularensis* subsp. *novicida* i *F. novicida*. Pro účely této diplomové práce bude používán název *F. tularensis* subsp. *novicida*. Jednotlivé poddruhy se liší svou virulencí, patogenitou a geologickým výskytem (McLendon et al., 2006). Pro člověka jsou patogenní a klinicky nejdůležitější poddruhy *tularensis* (typ A) a *holarctica* (typ B). Typ A byl izolován pouze v Severní Americe, je vysoce virulentní a způsobuje velmi závažné až život ohrožující infekce. Typ B se vyskytuje po celé Evropě a Asii, vykazuje nižší virulenci a průběh infekce je naopak mírný. Poddruh *tularensis* se dále člení do dvou subpopulací: A₁ a A₂. Výskyt poddruhu *mediasiatica* byl popsán ve střední Asii a jeho virulence je srovnatelná s typem B (Larsson et al., 2009). *F. tularensis* subsp. *novicida* je evolučně nejstarší a vykazuje nejnižší virulenci ze všech výše zmiňovaných poddruhů. Pro člověka je tento poddruh patogenní velmi zřídka, infekce byla zjištěna u imunokompromitovaných jedinců a osob po tonutí (Svensson et al., 2005). Jednotlivé poddruhy *F. tularensis* lze laboratorně odlišit na základě biochemické struktury nebo pomocí PCR v rozdílné genové oblasti, např. *fopA* nebo *tul4*, porovnáním velikostí amplifikovaných fragmentů (McLendon et al., 2006).

2.3 Laboratorní diagnostika

Laboratorní průkaz *F. tularensis* je možný několika různými způsoby. Řadíme mezi ně metody kultivační, sérologické (např. ELISA, aglutinační testy, imunofluorescence) či molekulárně-biologické (např. PCR, sekvenování). Pro určení správné diagnózy se obvykle využívá kombinace těchto technik (Haristoy et al., 2003).

Nejčastěji používaným biologickým materiálem pro detekci *F. tularensis* jsou biopticky odebrané vzorky infikovaných měkkých tkání nebo lymfatických uzlin a sputum. Při podezření na septickou formu tularémie se k diagnostice využívají také hemokultury (Doern, 2000). Izolace patogenu z moči či stolice se prakticky neprovádí (Ellis et al., 2002).

F. tularensis je kultivačně velmi náročná bakterie, proto tato metoda není vhodná pro její rutinní diagnostiku. Pro svůj růst vyžaduje obohacená kultivační média, nejčastěji o cystein. Mezi tradičně používané pevné půdy řadíme krevní agar s cysteinem a glukózou, čokoládový agar obohacený o cystein či neselektivní pufrovaný agar s kvasnicovým extraktem (Doern, 2000). Dále lze použít ovčí krevní agar a Thayer-Martin agar (Mueller-Hinton agar s přidavkem 5% ovčí krve a antibiotiky). Ideální kultivační podmínky *F. tularensis* jsou při teplotě 37 °C, avšak *F. tularensis* subsp. *novicida* a poddruh *philomiragia* vyžadují teplotu nižší a rostou dobře při 28 °C. Zvolením vhodného média a nanesením silného inokula můžeme první viditelný růst zaznamenat po 18 hodinách inkubace. Pro přesné rozlišení jednotlivých kolonií je ideální doba kultivace delší, a to 2-4 dny. Na cystein-glukozovém krevním agaru můžeme pozorovat kolonie zelenobílé, kulaté, hladké, s lehce slzovitým tvarem a velikostně se pohybují od 2 do 4 mm. Pokud navíc médium obsahuje plnou krev, může být kolem kolonií znatelná lehká zóna alfa-hemolýzy. *F. tularensis* se naopak růstově nedaří v tekutém médiu, ani i když je obohaceno o cystein. Viditelný růst kultur můžeme pozorovat po 24 hodinách. Pro pomnožení se využívají bujóny – Mueller-Hinton, mozkový a thioglykolátový. Nejvhodnějším syntetickým médiem je Chamberlainovo (Ellis et al., 2002).

Vzhledem k omezením kultivace se diagnostika tularémie opírá také o sérologické metody. Jedná se o nejběžnější techniku průkazu nemoci, která je založena na detekci protilátek proti *F. tularensis*. Ale ani tyto metody nejsou bezchybné. Jejich velkou nevýhodou je opožděný nástup hladiny protilátek u infikovaných, které lze detekovat nejdříve za 2 týdny od nákazy (Bevanger et al., 1994). V roce 1926 Francis a Evans popsali aglutinační reakci, kterou nazvali jako tzv. TAT test. Jako antigen byla použita obarvená bakterie *F. tularensis* a princip testu spočíval v měření hladiny sérových imunoglobulinů, které se navázaly na antigen. Později byla tato technika nahrazena rychlejším mikroaglutinačním testem (tzv. MAT) (Maurin, 2020). Další výhodou MAT bylo použití menšího množství antigenu *F. tularensis* a tento test byl obecně snadnější na provedení a interpretaci výsledků (Sato et al., 1990). Mezi další sérologickou metodu řadíme imunofluorescenci (IFA). Ta nám ve srovnání s aglutinačními testy umožňuje rozlišit titry jednotlivých tříd imunoglobulinů, nejčastěji IgG, IgM a IgA. Nicméně literární údaje uvádí srovnatelnou specifitu a citlivost IFA s MAT (Maurin, 2020). Novější sérologický průkaz imunoglobulinů představuje ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Několik studií ukázalo, že významné titry protilátek jsou u infikovaných osob detekovány dříve

pomocí ELISA než staršími testy – TAT, MAT či IFA (Yanes et al., 2018). Jako antigen je nejčastěji využíván lipopolysacharid vnější membrány *F. tularensis* (Maurin, 2020).

V neposlední řadě je cenným nástrojem pro průkaz tularémie metoda PCR (polymerázová řetězová reakce, z angl. Polymerase Chain Reaction). Ta je vhodná pro přímou diagnostiku infekčních agens, která se obtížně kultivují. Většina PCR testů využívá primery, které jsou namířené proti genům kódujícím proteiny vnější membrány, např. *fopA* nebo *lpnA* kódující 17-kDa lipoprotein, protože jsou vysoce specifické (Ellis et al., 2002) (Johansson et al., 2004). PCR lze také aplikovat pro identifikaci kmenů a jejich rozlišení na úrovni rodu, druhu a poddruhu (Forsman et al., 1994). Doplnkem PCR může být metoda sekvenování v oblasti ribozomální DNA (16S rDNA) (Johansson et al., 2004).

2.4 *F. tularensis* jako biologická zbraň

F. tularensis je zařazena mezi potenciální biologické zbraně. Význam pojmu bioterorismus se zdroj od zdroje liší. Dle Spencera je definice následující: „Bioterorismus je použití mikroorganismů (patogenů) nebo produktů živých organismů (toxinů) jako zbraní s katastrofickým účinkem, které lze popsat jako: kategorie nebo způsob použití systému zbraní, jehož následkem je negativní dopad na fyzické, psychické nebo ekonomické zdraví národa, což způsobuje zásadní modifikaci rutinní činnosti“ (Spencer, 2007). Bioterorismus představuje do budoucna velké riziko, proto americká organizace CDC kategorizovala potenciální bioteroristické činitele (Tab.1). *F. tularensis* je zařazena do kategorie A, kam spadají mikroby s největším rizikem možného zneužití (Cronquist, 2004).

Tab. 1 – CDC klasifikace potenciálních infekčních agens bioterorismu

Kategorie	Definice kategorie	Příklady mikroorganismů
A	<ul style="list-style-type: none"> • Vysoké riziko pro národní bezpečnost • Snadná šířitelnost • Mezilidský přenos (u <i>F. tularensis</i> není popsán) • Vysoká úmrtnost • Obtížná léčba 	<i>Bacillus anthracis</i>
		<i>Clostridium botulinum</i>
		<i>Yersinia pestis</i>
		<i>Francisella tularensis</i>
		Filoviry (např. Ebola, Marburg)
		Arenaviry (např. Lassa, Machupo)
		Variola virus (major)
B	<ul style="list-style-type: none"> • Méně nebezpečné • Středně snadno šířitelné • Bez mezilidského přenosu • Nízká mortalita • Léčba existuje 	<i>Brucella spp.</i>
		<i>Clostridium perfringens</i>
		<i>Salmonella spp.</i>
		<i>Escherichia coli</i> O157:H7
		<i>Shigella spp.</i>
		<i>Rickettsia prowazekii</i>
		<i>Vibrio cholerae</i>
		<i>Chlamydia psittaci</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Coxiella burnetii</i>		
C	<ul style="list-style-type: none"> • Nově objevené patogeny • Jejich zneužití málo pravděpodobné, ale možné • Vysoká mortalita a morbidita • Obtížná léčba 	Virus Nipah
		Hantavirus
		Virus žluté zimnice
		Viry klíšťové encefalitidy
		Viry klíšťové hemoragické horečky
		Multirezistentní <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Zdroj: (Christian, 2013)

F. tularensis je jedna z nejvíce infekčních bakterií, které známe. Důvody zařazení mezi potenciální biologické zbraně jsou její vysoká virulence, snadné šíření, a především nízká infekční dávka. Inhalace pouhých 10 CFU (z angl. Colony Forming Units) aerosolem stačí k vyvolání onemocnění, z toho 30-60 % neléčených infekcí vysoce virulentním kmenem může končit smrtí (McLendon et al., 2006).

V letech 1932-1945 byla *F. tularensis* studována japonskými válečnými jednotkami v Mandžusku jako jeden z možných patogenů bioterorismu. Bývalý odborník na výzkum zbraní Ken Alibek naznačoval úmyslné použití *F. tularensis* během 2. světové války, kdy tularémií údajně onemocnělo více než 10 tisíc německých a sovětských vojáků. Po válce výzkum této bakterie pokračoval. V 50. a 60. letech 20. století probíhaly studie zejména v USA a Sovětském svazu. V průběhu těchto let se americkým vědcům podařilo vyvinout biologické zbraně se šířením aerosolu *F. tularensis*. Zároveň byl prováděn výzkum zaměřený na lepší pochopení patofyziologie tularémie s cílem vyvinout očkování a antibiotickou terapii. Studie byly úspěšné a vznikla živá atenuovaná vakcína částečně chránící proti virulentnímu kmenu SchuS4. Současně byla objevena i účinná antibiotika – streptomycin, tetracyklin a chloramfenikol, která

bylo možno použít jako profylaxi i léčbu. Roku 1970 bylo vydáno nařízení, aby Spojené státy americké ukončily svůj biologický vývoj zbraní a do roku 1973 byl všechn jejich materiál zneuzitelný pro bioterorismus zničen (Dennis et al., 2001). V Sovětském svazu výzkum údajně pokračoval až do počátku 90. let minulého století a podařilo se jim vyvinout kmeny *F. tularensis* rezistentní vůči antibiotikům a vakcínám. Tento historický fakt zvyšuje potenciální riziko hrozby (Foley, Nieto, 2010).

3 Tularémie

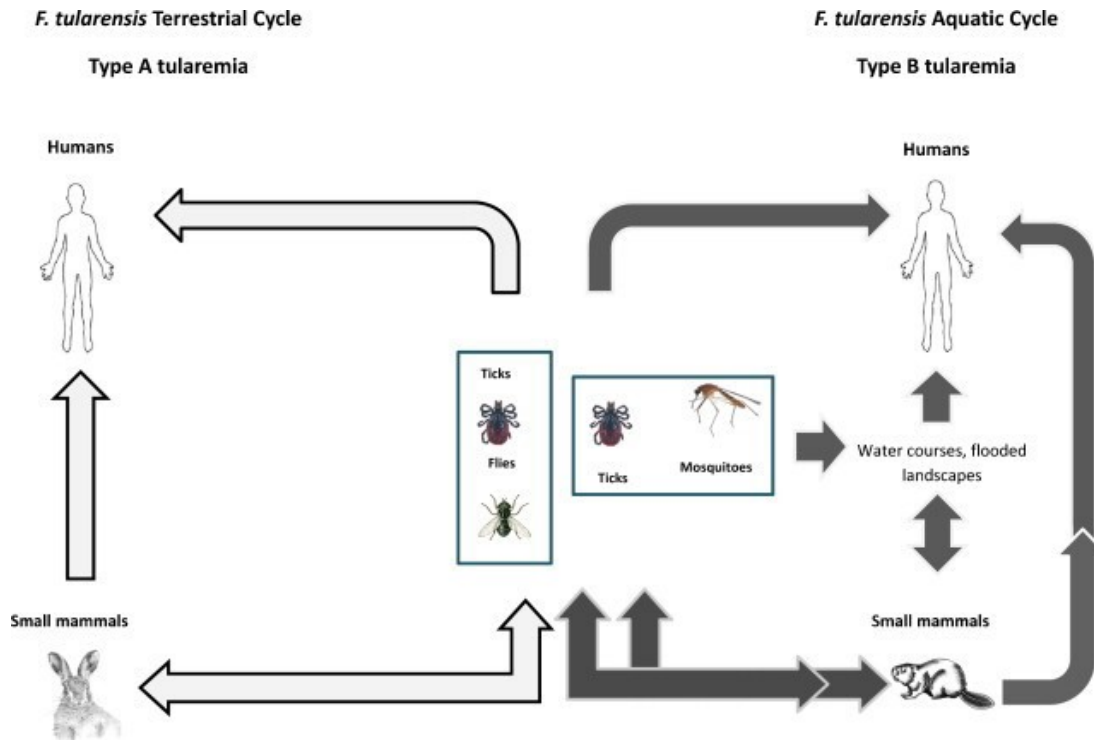
3.1 Epidemiologie

Tularémie, obecně známá také jako zaječí nemoc, nemoc lovců, horečka jelenů či horečka klíšťat, je poměrně běžné zoonotické onemocnění (Gurcan, 2014). *F. tularensis* se vyznačuje širokou škálou hostitelů. Infikuje více než 100 druhů divokých a domácích obratlovců a více než 100 druhů bezobratlých. Primárně se jedná o onemocnění hlodavců (hlavně hrabošů, myší, krys a veverek), zajíců a králíků, kteří jsou považováni za hlavní přenašeče infekce. Mezi riziková domácí zvířata řadíme ovce, kočky, psy, prasata a koně (Yeni et al., 2021). Infekce je mezi savčími hostiteli přenášena řadou členovců. Za nejvýznamnější jsou považováni komáři rodů *Aedes*, *Culex*, *Anopheles* a *Ochlerotatus excrucians*, klíšťata rodů *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Ixodes* a *Ornithodoros* a mouchy z čeledi *Tabanidae* (*Tabanus* spp., *Chrisozona* spp. a *Chrisops* spp.) (Carvalho et al., 2014). Především klíšťata jsou klinicky velmi důležitá, jelikož zajišťují přetrvání *F. tularensis* v přírodě a některé druhy jsou rezervoáry bakterie po celý život. Klíšťata přenáší infekci především v období od jara do podzimu, s vrcholem v letních měsících, kdy je jejich aktivita nejvyšší (Gurcan, 2014). V poslední době je rovněž potvrzeno, že *F. tularensis* může přetrvávat ve vodním prostředí pomocí volně žijících améb, které bakterie využívá pro své přežití (Hennebique et al., 2021).

K přenosu tularémie na člověka může dojít buď přímým kontaktem s infikovaným zvířetem nebo nepřímo – tj. kousnutím vektory, konzumací kontaminované vody a potravin nebo vdechováním aerosolů (Carvalho et al., 2014). Přenos *F. tularensis* z člověka na člověka nebyl dosud potvrzen. Klinickou formu onemocnění určuje místo vstupu a cesta přenosu infekce (Yeni et al., 2021).

U *F. tularensis* rozlišujeme dva různé životní cykly. Tularémie typu A je nejčastěji spojována se suchozemským cyklem onemocnění, u kterého jsou za nákazu lidí zodpovědní především

malí obratlovci společně se členovci, přenašeči infekce. Druhým typem životního cyklu *F. tularensis* je cyklus vodní. Ten je častěji spojován s *F. tularensis* typu B, i když byl zaznamenán i u poddruhu typu A. Vodní životní cyklus je zapříčiněn především kontaminací vodních toků z mrtvých těl nakažených hlodavců. Kontaminovaná voda je pak zdrojem nákazy jak pro lidi, tak členovce (Carvalho et al., 2014) (Obr.1).



Obr. 1 – Schéma životních cyklů *F. tularensis* (Carvalho et al., 2014)

První hlášený případ tularémie byl popsán ve Spojených státech v Kalifornii. V USA toto onemocnění u lidí podléhá oznamovací povinnosti a od té doby byly hlášeny ve všech státech kromě Havaje (Feldman, 2003). Tularémie se postupně rozšířila i do ostatních oblastí světa, včetně Evropy. Za hlavní endemické oblasti jsou považovány země severní polokoule, zřídka kdy bývá nález nemoci hlášen na polokouli jižní (Gurcan, 2014).

V USA v první polovině 20. století byla nákaza *F. tularensis* poměrně častá. V roce 1939 zde vypukla velká epidemie, při které byl zaznamenán nejvyšší počet hlášených případů, a to 2 291 (Feldman, 2003). V roce 1950 čísla nakažených výrazně klesla a data uvádějí asi 900 případů ročně (Gurcan, 2014). Od 50. let 20. století se počty infikovaných postupně snižovaly a mezi lety 1993 a 2005 bylo zaznamenáno pouze 125 pacientů s tularémií (Foley, Nieto, 2010). Vysvětlení drastického poklesu infekcí není k dispozici, nicméně jedním z předpokladů je méně

častá expozice lidí hostiteli. Tento fakt může souviset s úbytkem populace žijící v této době na venkově (Stidham et al., 2018). Roku 2010 čísla mírně stoupla, nikterak dramaticky, bylo hlášeno kolem 100 infikovaných jedinců (Gurcan, 2014). V současné době se většina případů tularémie v USA vyskytuje v jiho-centrálních státech, z toho více než 50 % hlášených infekcí je v Arkansasu, Missouri, Kansasu, Nebrasce a Oklahomě (Stidham et al., 2018).

Tularémie je široce rozšířena také v Evropě, kromě Velké Británie, Albánie, Řecka, Islandu a Lichtenštejnska. Za hlavní endemické oblasti jsou považovány severské země – Švédsko a Finsko (Yeni et al., 2021). V červenci 2019 vypukla ve Švédsku největší epidemie tularémie za více než 50 let. Hlavním důvodem přenosu infekce bylo komáří kousnutí. K 40. týdnu od vypuknutí epidemie bylo hlášeno téměř 1000 případů, což bylo minimálně čtyřikrát více než průměrný počet mezi lety 2000-2018 (Dryselius et al., 2019). Významný výskyt infekce *F. tularensis* byl zaznamenán také ve východní Evropě a Rusku. V těchto oblastech byly nákazy popsány hlavně v období 2. světové války (Yeni et al., 2021). V letech 1999-2000 se objevila ohniska v Kosovu jako negativní důsledek tehdejší války. V období 2001-2010 mělo Kosovo nejvyšší roční incidenci tularémie v Evropě, následovalo Švédsko, Finsko, Slovensko, Česká republika, Norsko a další (Gurcan, 2014). *F. tularensis* se vyskytuje i v některých asijských oblastech. Případy byly hlášeny například v Japonsku, Číně, Íránu či Turecku. Právě Turecko je považováno za zemi spojovanou s vysokým rizikem přenosu infekce požitím kontaminované vody, většina případů je zde hlášena právě v oblastech venkova. V roce 1953 zde vypukla největší epidemie tularémie v historii země (Yeni et al., 2021). Zajímavé je, že v Africe, Jižní Americe a Antarktidě nikdy nebyly případy tularémie detekovány a Austrálie měla pouze dva případy výskytu (Gurcan, 2014).

Tularémie byla hlášena ve všech věkových kategoriích, muži vykazují vyšší prevalenci než ženy. Tento fakt souvisí s výkonem profesí vykonávaných hlavně muži, u kterých je vyšší riziko kontaktu s rezervoáry nebo přenašeči (Carvalho et al., 2014). Mezi ohrožené skupiny řadíme lesníky, myslivce, farmáře, veterináře, laboratorní pracovníky a obecně osoby manipulující s masem a zvířaty (Gurcan, 2014).

3.2 Patogeneze a imunita

F. tularensis se vyznačuje intracelulárním životním cyklem se schopností vstoupit, množit se a přetrvávat uvnitř různých typů fagocytujících (makrofágy, dendritické buňky a neutrofilů) i nefagocytujících (hepatocyty, endoteliální buňky a fibroblasty) hostitelských buněk. U savců

představují primární cíl replikace makrofágy. Makrofágy jsou buňky označované jako tzv. profesionální fagocyty a zároveň se jedná o antigen prezentující buňky. Za normálních okolností jsou schopny aktivovat mechanismy vrozené imunitní odpovědi, která vede k likvidaci mikroorganismu. *F. tularensis* využívá svou intracelulární strategii k potlačení těchto mechanismů a umí se tak vyhýbat obraně přirozené imunity (Barel et al., 2015).

3.2.1 Vstup do hostitelských buněk

Ke vstupu *F. tularensis* do hostitelských makrofágů dochází unikátní formou fagocytózy, která je nazývána jako tzv. „pseudopod loops“. Makrofágy vytváří na své plazmatické membráně asymetrické prostorové smyčky (tzv. panožky) a pomocí nich obklopují patogen (Clemens et al., 2005). Pro vstup bakterie je zásadní také přítomnost a povaha opsonizace, která významně zvyšuje vycytávání patogenů a určuje, který z receptorů se účastní fagocytózy (Celli, Zahrt, 2013). Během invaze *F. tularensis* do hostitelských buněk se zapojuje celá řada receptorů. Mezi nejvýznamnější řadíme komplementový receptor CR3, scavengerový receptor A (SRA), manózoový receptor (MR), Fc γ receptor, nukleolin a plicní surfaktantový protein A (SP-A) (Moreau, Mann, 2014). Hovoří se rovněž o důležitosti tzv. lipidových raftů pro vstup *F. tularensis* do hostitele. Tyto lipidové domény jsou bohaté na cholesterol a představují oblast s vysokým množstvím receptorů a signalizačních molekul, které interagují s patogenem. Předpokládá se, že vyčerpání cholesterolu by mohlo inhibovat vstup bakterie do hostitelské buňky (Strašková, Stulík, 2012).

3.2.2 Fagosom

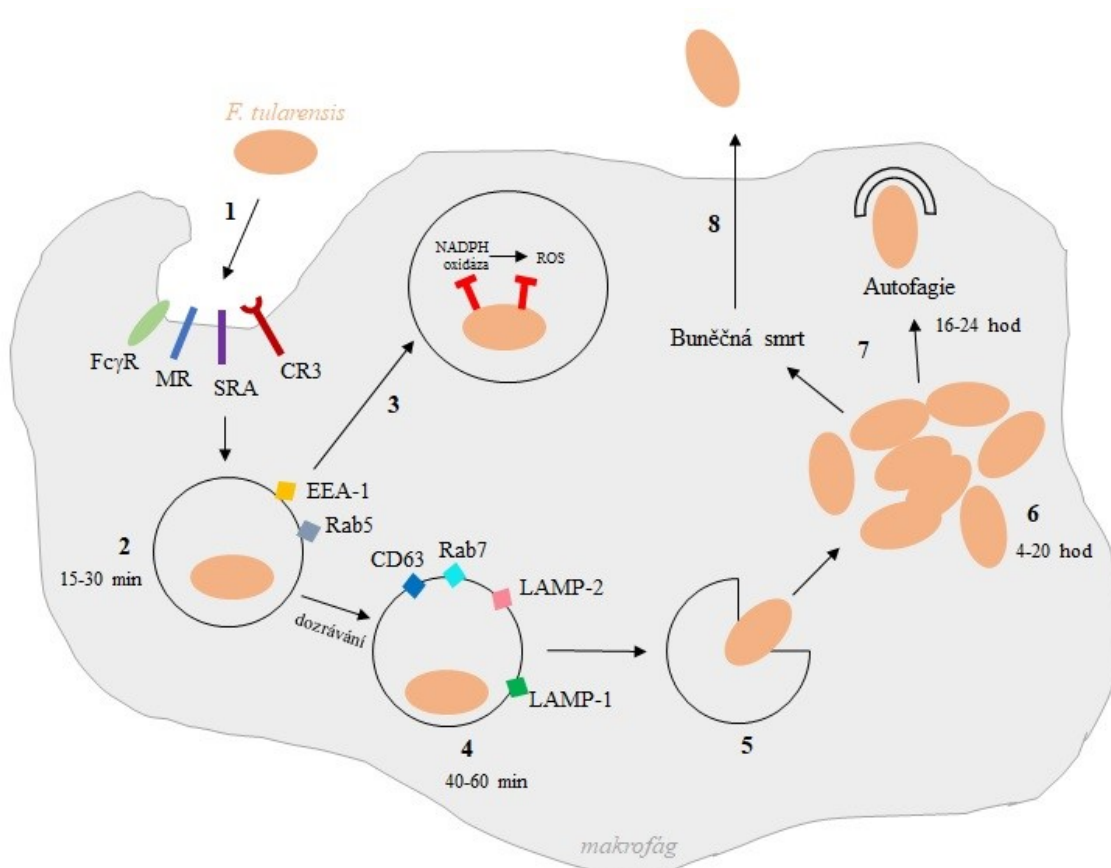
Za normálních okolností se během fagocytózy tvoří nová organela – tzv. fagosom. Ten postupem času dozrává a v pozdní fázi endosomálního stádia dochází k jeho okyselení, které je závislé na aktivitě ATPázy. Acidifikace vyvolá fúzi pozdního endosomu s lysosomem, vzniká fagolysosom a celý proces vrcholí degradací pohlcených bakterií. *F. tularensis* umí tento obranný mechanismus obejít a fúze fagosom-lysosom je inhibována (Strašková, Stulík, 2012).

Po pohlcení dochází u této bakterie ke vzniku tzv. *Francisella*-containing phagosome (FCP). Nově vytvořený FCP postupně získává znaky časných (např. EEA-1, Rab5) a pozdních (např. LAMP-1, LAMP-2, CD63, Rab7) endosomů. Na druhou stranu obsahuje malé/žádné množství katepsinu D, který zodpovídá za fúzi s lysosomy (Bröms et al., 2010). *F. tularensis* narušuje fagosomální membránu a uniká do cytosolu hostitelské buňky, kde se replikuje (Barel et al.,

2015). Bylo identifikováno několik strategií, které přispívají k fagosomálnímu úniku a intracelulárnímu přežití *F. tularensis*, avšak základní mechanismus zůstává do jisté míry stále neznámý. Nicméně velká škála studií identifikovala geny přítomné na tzv. ostrovu patogenity (*Francisella* Pathogenicity Island; FPI) jako jedny z klíčových hráčů pro modulaci zrání fagosomů a unikání *F. tularensis* do cytosolu hostitelských buněk (Bröms et al., 2010). Před tím, než *F. tularensis* unikne do cytosolu, musí čelit mikrobicidním účinkům reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou tvořeny během respiračního vzplanutí pomocí enzymu NADPH oxidázy (Celli, Zahrt, 2013). I zde intracelulární patogeny, včetně *F. tularensis*, vyvinuly různé strategie na odolnost vůči ROS. Jedním z mechanismů je například blokáce aktivace NADPH oxidázy na nově vytvořeném FCP (Chong, Celli, 2010).

3.2.3 Cytosol

Zhruba 4-20 hodin po infekci se začne *F. tularensis* hojně množit v cytosolu hostitelské buňky (Pechous et al., 2009). Během replikace se však musí adaptovat na metabolismus a získání živin v cytosolu (Meibom, Charbit, 2010). Zmnožení *F. tularensis* nakonec vede ke smrti hostitelské buňky prostřednictvím apoptózy či pyroptózy (Kopping et al., 2019). *F. tularensis* následně uniká a dochází k jejímu šíření a infekci dalších hostitelských buněk (Chong, Celli, 2010). U myších makrofágů bylo prokázáno, že *Francisella* sídlí ve vezikulách podobných autolysosomům a u části bakterií dochází místo buněčné smrti k opětovnému vstoupení do endocytární dráhy prostřednictvím autofagie hostitelské buňky. Zatím není jisté, zda je tento mechanismus součástí ochrany buněčné imunity proti infekci, nebo se jedná o adaptivní proces patogenu (Pechous et al., 2009).



Obr. 2 – Intracelulární život *F. tularensis* v makrofázích (inspirováno: (Pechous et al., 2009), (Jones et al., 2012), (Celli, Zahrt, 2013)).

1 – vstup *F. tularensis* do hostitelské buňky přes makrofágové receptory; 2 – vznik FCP se znaky časných endosomů (EEA-1, Rab5); 3 – *F. tularensis* využívá mechanismu blokace NADPH oxidázy k potlačení mikrobicidních účinků ROS; 4 – dozrávání fagosomu a vznik pozdních endosomů (znaky: CD63, Rab7, LAMP-1 a LAMP-2); 5 – fagosomální únik do cytosolu; 6 – replikace v cytosolu; 7 – buněčná smrt hostitelské buňky nebo její autofagie (opětovný vstup do endosomálního stádia); 8 – uvolnění *F. tularensis* z usmrcené hostitelské buňky, následuje její šíření do okolí a infekce dalších buněk

3.2.4 Reakce hostitele na infekci

Obrana proti intracelulárním bakteriím, včetně *F. tularensis*, je závislá na buněčně zprostředkované imunitní odpovědi. V počáteční fázi infekce se uplatňují mechanismy vrozené imunity a dochází téměř k okamžité zánětlivé odpovědi produkcí cytokinů (Tärnvik, Berglund, 2003). Za tyto děje jsou zodpovědné makrofágy, dendritické buňky a NK buňky (přirození zabijáci), které indukují sekreci prozánětlivých cytokinů typu Th1, a to především IL-12, TNF- α a INF- γ . Mechanismy vrozené imunity jsou důležité pro počáteční kontrolu infekce a

aktivace fagocytujících buněk hraje roli ve zpomalení nástupu infekce, jelikož slouží jako primární cíl replikace *F. tularensis* a šíření nemoci (Pechous et al., 2009). V pozdější fázi infekce hraje klíčovou roli adaptivní imunita zprostředkovaná zejména T-lymfocyty. Na obraně se podílejí CD4+ (pomocné) i CD8+ (cytotoxické) T-lymfocyty, které proliferují a diferencují se na efektorové buňky produkující především INF- γ . CD4+ T-lymfocyty se zdají být důležitější pro obranu proti infekci, zatímco funkce CD8+ T-lymfocytů je závislá na pomoci CD4+ a jejich schopnosti produkovat cytokin INF- γ (Tärnvik, Berglund, 2003). T-buněčnou imunitní odpověď lze prokázat *in vitro* přibližně 2 týdny po nástupu tularémie na základě produkce specifických cytokinů (Cowley, Elkins, 2011).

3.3 **Klinický obraz**

Klinický průběh infekce je velmi různorodý, může být asymptomatický až po závažné či dokonce smrtelné následky. Život ohrožující stavy nastávají zejména u imunokompromitovaných jedinců a při nedostatečné léčbě pacientů. Symptomy se v průměru objevují po 3-5 dnech od expozice, inkubační doba se však může prodloužit až na 21 dní (Wawszczak et al., 2022). Průběh tularémie závisí na místě vstupu infekce do těla, infekční dávce a virulenci kmene (Troha et al., 2022). Na základě cesty přenosu *F. tularensis* jsou rozlišovány tyto formy onemocnění: ulceroglandulární, glandulární, okuloglandulární, orofaryngeální, pneumonická a tyfoidní (CDC, 2018). Počáteční klinický obraz je pro všechny formy velmi podobný a prvotním symptomem bývá náhlá vysoká horečka (38-40 °C) často doprovázená třesavkou, malátností, myalgií, únavou a bolestí hlavy (Carvalho et al., 2014).

Nejběžnějším typem je **ulceroglandulární** tularémie, která se objevuje až u 80 % případů. Obvykle se vyskytuje po kousnutí členovcem nebo přímým kontaktem s infikovaným zvířetem (např. škrábnutí) (Troha et al., 2022). Nejprve se projevuje chřipkovými příznaky, následně se v místě vstupu bakterie do těla objevuje malá bolestivá papula. Ta po několika dnech nekrotizuje a stává se z ní kožní vřed (Wawszczak et al., 2022). Tento projev je doprovázen zvětšením lymfatických uzlin, obvykle v oblasti třísel nebo podpaží (CDC, 2018). Vřed se brzy zhojí a zůstává po něm jizva (Wawszczak et al., 2022).

Glandulární forma je velmi podobná ulceroglandulární a společně tyto dva typy převládají v Evropě (až 95 % případů) (Wawszczak et al., 2022). Zásadním rozdílem glandulární formy je nerozpoznatelná primární kožní léze. Výskyt nemoci je stejný jako u předchozího typu (Hestvik et al., 2015).

Okuloglandulární tularémie nastává při proniknutí bakterie okem. K této situaci může dojít např. při dotyku nakaženého zvířete během porážky s následnou kontaminací vlastního oka (CDC, 2018). Tato forma se projevuje jednostrannou konjunktivitidou, která je u některých jedinců doprovázena žlutými vředy či papulami na spojivce, fotofobií, nadměrným slzením a lymfadenopatií krčních uzlin (Carvalho et al., 2014) (Troha et al., 2022).

Orofaryngeální forma tvoří asi 5 % případů a vzniká požitím kontaminované vody nebo potravy. Pacienti s tímto typem tularémie trpí bolestí v krku, vředy v ústech, tonzilitidou a velkým otokem krčních lymfatických uzlin (obvykle na jedné straně). Tato forma bývá často při diagnostice zaměňována se streptokokovou faryngitidou (Wawszczak et al., 2022).

Za nejzávažnější je považována **pneumonická** forma. Pokud tento typ neléčíme, může až v 60 % končit smrtí (Troha et al., 2022). Vzniká vdechováním prachu nebo aerosolů patogenních bakterií nebo jako komplikace jiných forem (např. ulceroglandulární) při šíření *F. tularensis* krevním řečištěm do plic (CDC, 2018). Projevuje se kašlem, dušností či bolestí na hrudi. Tyto symptomy mohou progredovat v těžký zápal plic (Carvalho et al., 2014). Na rentgenu hrudníku bývá typickým nálezem zvětšení mízní lymfatické uzliny (Hestvik et al., 2015). Na CT hrudi bývají přítomny plicní léze, které jsou typicky nodulární a mnohočetné s neostrým ohraničením. Tularémie typu A má zpravidla horší průběh této formy, než typ B (Wawszczak et al., 2022).

Tyfoidní forma se vyznačuje vysokou úmrtností, až kolem 50 %, v Evropě je její výskyt vzácný (Wawszczak et al., 2022). Jedná se o závažné systémové a febrilní onemocnění, které je charakterizováno jako kombinace celkových příznaků s absencí lokálních příznaků jiných forem (Carvalho et al., 2014) (CDC, 2018).

3.4 Léčba

Hlavní strategií úspěšné terapie tularémie představuje rychlá a přesná diagnostika s následným nasazením účinných antibiotik. Včasná a vhodná léčba výrazně snižuje morbiditu tohoto onemocnění. Výběr adekvátního antibiotika závisí především na stavu a věku pacienta (Troha et al., 2022). Mezi klinicky účinná antibiotika řadíme aminoglykosidy (streptomycin a gentamicin), tetracykliny (doxycyklin), fluorochinolony (ciprofloxacin) a chloramfenikol. Naopak betalaktamy, makrolidy, linkosamidy a trimoxazol nejsou pro léčbu tularémie vhodné

(Tärnvik, Chu, 2007). Rezistence na účinná antibiotika nebyla doposud popsána, proto se testování citlivosti v klinické praxi standardně neprovádí (Troha et al., 2022).

Pro mírný až středně těžký průběh infekce u dospělých pacientů jsou lékem volby perorální fluorochinolony, druhé místo zastupují tetracyklinová antibiotika. Nevýhodou tetracyklinů je vyšší riziko relapsu nemoci než při léčbě chinolony. Naopak jsou vhodnější u pacientů, kteří se tularémií nakazili kousnutím klíštětem. Doxycyklin totiž empiricky léčí i jiná onemocnění související s nákazou klíšťaty (např. lymfskou boreliózu) a mimo jiné má menší vedlejší účinky než ciprofloxacin (Rojas-Moreno et al., 2018). U dětských pacientů byla popsána kontraindikace tetracyklinu z důvodu poškození kostí a svalů, jinak je terapie podobná jako u dospělých, s výjimkou úpravy dávkování (Tärnvik, Chu, 2007). U těžkých případů tularémie jsou první volbou aminoglykosidy zastoupené streptomycinem a gentamicinem. Tato skupina antibiotik se vyznačuje bakteriocidním účinkem a jejich hlavní výhodou je nízká míra relapsů. Naopak velkým negativem je jejich ototoxicita a nefrotoxicita a nutnost parenterálního podání. Gentamicin lze aplikovat intramuskulárně i intravenózně, streptomycin pouze do svalů (Troha et al., 2022). Tyto druhy antibiotik je také doporučeno indikovat u pacientů s nejasnou diagnózou. Aminoglykosidová terapie trvá obvykle 7-10 dnů, v závislosti na klinickém stavu infikovaných (Klementa et al., 2022). U jedinců se vzácnými komplikacemi, jako je endokarditida nebo meningitida, je počáteční terapie kombinovaná, často se využívá spojení aminoglykosidu s chloramfenikolem. U těhotných žen se jako lék volby využívá streptomycin nebo chloramfenikol (Troha et al., 2022).

Rezistence *F. tularensis* na výše zmíněnou terapii nebyla doposud popsána, přesto je nutné hledat nové terapeutické alternativy. Za hlavní důvody považujeme potenciální toxicitu léčiv první volby, vysokou míru relapsů, a především možné zneužití případných rezistentních kmenů v bioterorismu. Nové terapeutické strategie zahrnují vývoj zcela nových druhů antibiotik či vylepšení mechanismů těch stávajících, potlačení virulence *F. tularensis* nebo imunoterapii (Wawszczak et al., 2022). Právě imunoterapie představuje do budoucna velký potenciál. Hlavním principem je posílení vrozené i adaptivní imunity hostitele a potlačení mechanismů patogeneze bakterie. Jedná se např. o efektorové mechanismy imunoterapeutik na úrovni fagocytózy proti *F. tularensis*, cytokinové terapie nebo zvýšení protilátkové odpovědi proti *F. tularensis* (Skyberg, 2014).

3.5 Očkování

Ačkoliv existuje účinná léčba tularémie, antibiotická rezistence je do budoucna velkým rizikem, proto je potřeba účinné vakcíny proti *F. tularensis* neustále velmi zdůrazňována. Navzdory rozsáhlým výzkumům na vývoji vakcíny během posledních let, stále ještě neexistuje žádná očkovací látka schválená FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv; z angl. Food and Drug Administration) pro bezpečné humánní použití (Sunagar et al., 2016).

První z možných výzkumných směrů představuje **živá atenuovaná** vakcína (LVS; z angl. Live Vaccine Strain). Tento typ je připravován z živých mikroorganismů oslabených ve virulenci, ale stále imunogenních. Atenuovaný kmen *F. tularensis* vykazuje omezenou schopnost přežití a množení *in vivo*, který má za úkol vyvolat obrannou reakci imunitního systému, avšak bez potenciálu vzniku skutečné infekce (Putzova et al., 2016). Principem výroby těchto typů vakcín je cílená mutace v genech zapojených do metabolických drah a drah souvisejících s virulencí, které jsou nezbytně nutné pro intracelulární život bakterie (Barry et al., 2014).

Další možnost ochrany představuje **usmrcená (inaktivovaná) celobuněčná** vakcína. Očkovací látka se skládá z částic patogenu, který byl vykultivován a následně usmrcen (např. teplem či chemicky) (Hong et al., 2013). Tomuto typu vakcinace byla hlavní pozornost věnována v minulosti, a to především v 40. letech, kdy Lee Foshay a jeho vědecká skupina vyvinuli první usmrcenou vakcínu proti tularémii. Imunizace tímto typem zapříčinila rozvoj mírnější reakce, ale očkování vykazovali lokální reakce jako nekrotické léze či regionální lymfadenopatie (Sunagar et al., 2016).

Poslední z hlavních typů mechanismu imunizace představují **podjednotkové** vakcíny. Jedná se o bezbuněčnou očkovací látku, které se skládá ze syntetizovaných nebo izolovaných antigenních složek *F. tularensis* (např. LPS). Antigeny jsou následně rozpoznány T-lymfocyty, které indukují obrannou imunitní odpověď. Zásadní výhodou je jejich neinfekčnost (Wayne Conlan, Oyston, 2007). Z hlediska výroby, bezpečnosti a schválení FDA by byla tato možnost ideální. Nicméně doposud nebyly identifikovány bakteriální antigeny, které by byly schopny vyvolat dostatečně silnou obrannou reakci imunitního systému proti infekci (Sunagar et al., 2016).

4 Faktory virulence

4.1 Lipopolysacharid

Lipopolysacharid (LPS), nazývaný také jako endotoxin, je jednou z hlavních složek vnější membrány u většiny gramnegativních bakterií. Významně se podílí na interakci s toll-like receptorem 4 (TLR4) na hostitelských buňkách, která spouští imunitní odpověď organismu a vede k produkci prozánětlivých cytokinů (McLendon et al., 2006). LPS se skládá ze tří základních složek: lipid A, jádrový oligosacharid a O-antigen. Lipid A se vyznačuje vysoce imunostimulačním účinkem a je jedním ze základních mechanismů virulence G- bakterií (Rowe, Huntley, 2015). *F. tularensis* má oproti ostatním gramnegativním agens rozdílný LPS, který se liší svými biologickými a strukturálními vlastnostmi. Jedná se především o atypický lipid A, u kterého dochází k modifikaci délky, polohy a počtu řetězců mastných kyselin, včetně změn fosforylace. Vlivem této změny ve struktuře LPS dochází k úniku imunitní odpovědi a lipid A není rozpoznatelný TLR4 (Dueñas et al., 2006).

4.2 Kapsule

Divoké kmeny *F. tularensis* (např. SchuS4) a LVS obsahují na svém povrchu kapsuli, která je bohatá na sacharidy a chrání bakterii před lyzí zprostředkovanou komplementem v séru, čímž podporuje její intracelulární přežití (McLendon et al., 2006). Kapsule dále napomáhá odolnosti *F. tularensis* vůči různým stresovým podmínkám vyvolaným prostředím či hostitelem (Pechous et al., 2009). Bylo taktéž prokázáno, že polysacharidové pouzdro je totožné s O-antigenem z LPS. Je vědecky dokázáno, že opouzdřené mikroorganismy jsou plně virulentní. Naopak bakterie bez kapsule postrádají virulenci a ztrácí schopnost vyvolat imunitní reakci (Rowe, Huntley, 2015).

4.3 Pili typu IV

Pili typu IV (Tfp, z angl. Type Four Pili) představují další zásadní faktor virulence pro gramnegativní bakterie, včetně *F. tularensis*. Jejich přítomnost byla poprvé zjištěna v roce 2004, kdy byly pozorovány při kultivaci LVS. Následně byla jejich exprese popsána také u SchuS4 a *F. tularensis* subsp. *novicida*, což dokazuje jejich mezidruhovou přítomnost (Rowe, Huntley, 2015). Mezi hlavní funkce pili typu IV patří zajištění pohyblivosti na povrchu, tvorba agregátů a biofilmu, adheze hostitelské buňky a transformaci DNA. Narušení Tfp má u většiny bakterií za následek snížení jejich virulence (Chakraborty et al., 2008).

4.4 *FPI proteiny*

Francisella pathogenicity island (FPI), v překladu jako ostrov patogenity, je významná oblast v genomu bakterie, která byla poprvé identifikována v roce 2004 (Nano, Schmerk, 2007). Velikost FPI se pohybuje kolem 33 kb a obsahuje 16-19 otevřených čtecích rámců (ORF) o různé velikosti. Ostrov patogenity se od zbytku genomu liší nízkým podílem obsahu nukleových bází cytosinu a guaninu (Bröms et al., 2010). Bylo také dokázáno, že kóduje sekreční systém typu VI (Pechous et al., 2009). V genomu poddruhů *tularensis*, *holarctica* a *mediasiatica* se nacházejí dvě identické kopie FPI, naopak u *F. tularensis* subsp. *novicida* a *F. philomiragia* je přítomna pouze jediná kopie (Bröms et al., 2010).

Geny přítomné v oblasti FPI jsou indukovány během intracelulárního růstu *F. tularensis* a ukázalo se, že jsou nezbytně nutné pro vznik fagosomu a následný únik bakterie do cytosolu. Porucha v FPI-kódovaných genech vede k defektu v růstu bakterie uvnitř hostitelských buněk, čímž dochází k potlačení virulence. V oblasti FPI se vyskytují dva důležité operony – *igl* (z angl. Intracellular Growth Locus) a *pdp* (z angl. Pathogenicity Determinant Protein) (Bröms et al., 2010). IglA a IglB jsou interagující proteiny v cytoplazmě a jejich hlavní funkcí je sekrece efektorových proteinů. IglC potlačuje dozrávání fagosomu a podporuje únik *F. tularensis* do cytosolu. Z druhé transkripční jednotky je za nejdůležitější gen považován *pdpA*, který je nezbytný pro virulenci, ale jeho přesná funkce zůstává doposud neobjasněná, jako u ostatních *pdp* genů (Pechous et al., 2009).

4.5 *Regulátory transkripce*

Regulátory zastávají v bakteriální buňce důležitou roli. Některé mají zásadní vliv na modifikaci transkripce virulentních genů, čímž se stávají nepostradatelné pro patogenitu bakterií. Za jeden z nejlépe popsaných transkripčních regulátorů *F. tularensis* je považován protein MglA nacházející se na tzv. makrofágovém růstovém lokusu. Tento transkripční faktor reguluje až 100 různých genů, včetně těch nacházejících se na FPI (Spidlova et al., 2020). Ukázalo se, že delece MglA má za následek potlačení intracelulární replikace v hostitelských buňkách a také *F. tularensis* není schopná narušit fagosom a uniknout do cytosolu (Strašková, Stulík, 2012). Významná a zároveň jedinečná je interakce MglA s proteinem SspA, který reguluje transkripci v odpovědi na stresové podmínky, obzvláště při hladovění (Cuthbert et al., 2017). Vzájemná interakce MglA a SspA vede ke vzniku komplexu s RNA polymerázou, která je nezbytná pro aktivaci genů na ostrově patogenity (Baron, Nano, 1998).

Po objevu komplexu MglA/SspA byly prokázány podrobné mechanismy interakce s DNA. Jako další významný regulační faktor byl objeven FevR, označován také jako PigR. Bylo prokázáno, že PigR interaguje s komplexem MglA/SspA za podpory guanosintetrafosfátu (ppGpp) a tato asociace je důležitá pro kontrolu koordinace virulencních genů (Spidlova et al., 2020). PigR hraje zásadní roli pro replikaci *F. tularensis* v makrofázích a u myši (Strašková, Stulík, 2012).

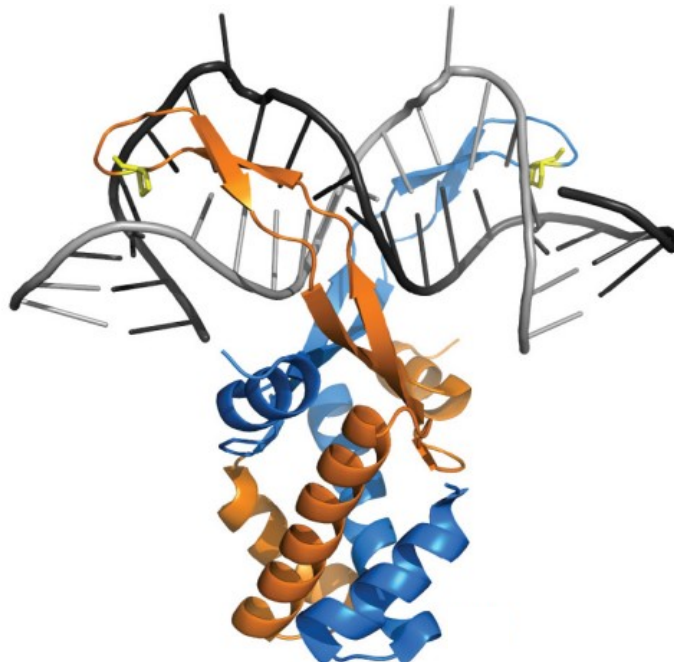
MigR je regulátor intracelulárního růstu popsáný u *iglABCD* promotoru, který je kódovaný uvnitř FPI. Postrádá ovšem DNA-vazebnou doménu, proto je jeho účinek nepřímý. Mimo jiné hraje zásadní roli pro růst kmene LVS v makrofázích a podílí se na blokaci aktivity NADPH oxidázy v neutrofilech (Buchan et al., 2009).

4.6 HU protein

HU protein byl poprvé popsán v roce 1975, kdy byl izolován z kmene *E. coli* U93 (Rouvière-Yaniv et al., 1979). Nejprve byl nazýván jako Faktor U, později na základě podobnosti s eukaryotickými histony jako HU (Drlica, Rouvière-Yaniv, 1987). Řadí se mezi tzv. proteiny asociované s nukleoidy (NAPs, z angl. Nucleoid-Associated Proteins), tento název primárně souvisí s jejich lokalizací (Kamashev, Rouvière-Yaniv, 2000). Na základě stupně homologie sekvence aminokyselin obsahuje skupina NAPs další tři zástupce: H-NS (z angl. Histone-like Nucleoid Structuring), IHF (z angl. Integration Host Factor) a FIS (z angl. Factor for Inversion Stimulation) (Stojkova, Spidlova, 2022). Velká většina NAPs se váže na DNA s nízkou sekvenční specificitou a způsobuje její lokální deformaci a ohyby (Gruber, 2014). Většina druhů bakterií však nesdílí všechny typy NAPs. Avšak u HU proteinu se zdá, že je kódován prakticky všemi bakteriemi a byl také objeven u archebakterií a v chloroplastech (Grove, 2011). HU sdílí některé důležité funkce s histony u eukaryot, proto jsou někdy také nazývány jako proteiny podobné histonům (z angl. Histone-like Proteins), strukturou se však od eukaryotického histonu značně odlišují (Pettijohn, 1988).

Jedná se o malé, bazické, kladně nabitě a tepelně stabilní bakteriální proteiny, které ovlivňují širokou škálu molekulárních procesů v buňkách (Kamashev, Rouvière-Yaniv, 2000). Jsou vysoce konzervované a strukturálně jsou tvořeny kompaktním jádrem, které je propleteno monomery. Z každého monomeru vychází dva spirálovité segmenty tvořící proteinové těleso, které je zakončeno β -řetězcí objímajícími šroubovici (Grove, 2011). β -řetězce obsahují prolinové zbytky, které se vmezeřují do DNA a způsobují její strukturální deformace (Gruber,

2014). V nepřítomnosti DNA jsou β -řetězce po většinou neuspořádané a skládají se pouze z důvodu vazby na příslušnou DNA. Strukturu HU proteinu dále doplňuje krátký C-terminální α -helix (Grove, 2011).



Obr. 3 – Struktura HU proteinu znázorněná v ohnuté rovině DNA (Gruber, 2014)

Modrá a oranžová barva – monomery proplétající kompaktní jádro
Černá a šedá barva – ohnutá rovina DNA
Žlutá barva – prolinové zbytky

HU proteiny existují ve formě homo- nebo heterodimerů. Dominantní formou u bakterií, např. u *E. coli* a dalších enterobakterií, je struktura heterodimeru, která se skládá ze dvou podjednotek – HU- α a HU- β kódovaných geny *hupA* a *hupB*. U jiných bakterií, jako je např. *M. tuberculosis* nebo *F. tularensis*, se HU protein vyskytuje ve formě homodimeru. Ten se na rozdíl od heterodimeru skládá pouze z jedné podjednotky, a to HU- β kódované genem *hupB* (Stojkova et al., 2018).

Bylo prokázáno, že HU proteiny hrají důležitou funkci v mnoha bakteriálních procesech souvisejících s DNA. Velmi často se vyznačují vysokou mírou afinity k poškozené DNA. K poškození bakteriální DNA dochází během překonávání obranných mechanismů hostitele za účelem následné bakteriální prosperity. Následně je spuštěna produkce faktorů virulence (Stojkova et al., 2018). Vliv HU proteinu na expresi virulencních genů byl popsán u řady

patogenních bakterií, včetně *F. tularensis*, *M. tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Porphyromonas gingivalis* nebo *Streptococcus pneumoniae*. Bylo zjištěno, že HU protein interaguje s LPS na vnější membráně gramnegativních bakterií. U grampozitivních bakterií se předpokládá vazba HU proteinu na jinou záporně nabitou molekulu, nejspíše na kyselinu lipoteichoovou. Kromě vazby na LPS se vyznačuje i vazbou na extracelulární DNA. Výskyt HU proteinu v extracelulárním prostoru byl prokázán u *M. tuberculosis* a ukázalo se, že HU protein zde hraje významnou roli při podpoře mykobakteriální infekce (Stojkova, Spidlova, 2022). Tento fakt ukazuje, že by HU protein mohl být potenciálním cílem pro vývoj terapeutik proti TBC. U *E. coli* zastává HU protein důležitou roli při zahájení replikace DNA, buněčného dělení, SOS odpovědi a metabolismu galaktózy (Stojkova et al., 2018). Úloha HU proteinu v bakteriálních buňkách je neustále intenzivně studována, ale mechanismus interakce mezi hostitelem a patogenem je do značné míry stále velká neznámá (Stojkova, Spidlova, 2022).

5 Protein Gp46

Protein Gp46 je kódován v genomu bakteriofága SPO1 *Bacillus subtilis*. Obecně lze bakteriofágy charakterizovat jako viry, které infikují a následně lyzují bakterie, čímž pozitivně regulují průběh bakteriální infekce. Lytický fág SPO1 *B. subtilis* obsahuje komplexní genom kódující více než 200 proteinů, včetně tzv. modulu pro převzetí hostitele (HTM, z angl. Host Takeover Module). HTM je tvořen během rané fáze převzetí hostitele, a právě gen *gp46* je v této oblasti lokalizován. V nedávné době Zhang et al. (2022) popsali Gp46 jako inhibitor HU proteinu *B. subtilis*. Nadměrná exprese Gp46 u *B. subtilis* vedla ke snížení jeho růstu, buněčné filamentaci a blokování segregaci chromozomů. Tento fenotyp se podobal fenotypu kmene s deletovanými geny pro HU protein u *E. coli*. Autoři publikace taktéž prokázali, že Gp46 interaguje s HU proteinem v místě jeho vazby na DNA a zmínili zde myšlenku, že by Gp46 mohl fungovat jako mezidruhový inhibitor všech HU proteinů (Zhang et al., 2022).

Otázkou univerzálnosti inhibice se zabývám v experimentální části mé diplomové práce, a to na modelu bakterie *F. tularensis*, která HU protein obsahuje.

6 Cíle práce

Cílem práce je zjistit, zda protein Gp46 bakteriofága SPO1 bakterie *Bacillus subtilis* funguje jako inhibitor DNA vazebného proteinu (HU protein) *Francisella tularensis*.

V diplomové práci byly stanoveny následující dílčí cíle:

1. Složení a amplifikace genu *gp46*
2. Příprava kmene *Escherichia coli* exprimujícího protein Gp46
3. Izolace proteinů Gp46 a HU_HA (HU protein značený HA epitopem)
4. Studium vlivu Gp46 na funkci HU proteinu *F. tularensis*

7 Experimentální část

7.1 Návrh primerů

Pro amplifikaci genu *gp46* byly navrženy dva typy oligonukleotidů (Tab. 2): a) sloužící jako templátová DNA genu *gp46*, jelikož genomová DNA bakteriofága SPO1 nebyla k dispozici, a b) sloužící pro amplifikaci částí genu *gp46* a následnou overlap PCR. Pokud to bylo možné, byla dodržena standardní pravidla pro návrh primerů: délka 18-24 bp, obsah GC 40-60 %, teplota tání (T_m , z angl. Melting Temperature) v rozmezí 50-60 °C, teplota tání daného páru oligonukleotidů se nelišila o více než 5 °C.

Tab. 2 – Návrhy oligonukleotidů

Název	Sekvence (5' - 3')	Restrikční místo	Účel
<i>gp46_1_Fw</i>	ATGATGACAGAAGACCAAAAATTTAAGTACCTGACTAAA ATTGAGGAATTGGAAGCGGGATGCTTTAGTGA	-	Templát pro 1. část genu <i>gp46</i>
<i>gp46_1_Rev</i>	TTCTTAAGGTATTTGAGGTCACCTGTAATATCCTCCTTCGT CCAATCACTAAAGCATCCCGCTTC	-	Templát pro 1. část genu <i>gp46</i>
rGP46_Fw1_ <i>NcoI</i>	ATACCATGGCCATGATGACAGAAGACCAAAAATT	<i>NcoI</i>	Amplifikace 1. části genu <i>gp46</i> , overlap PCR
rGP_1_Rev	TTCTTAAGGTATTTGAGGTCACCTGTAATATCCTCCTTCGT CCAATCACTAAAGCATCCCGCTTC	-	Amplifikace 1. části genu <i>gp46</i>
<i>gp46_2_Fw</i>	GGGCATCATAGAGGAGTCTATTGAATTAATCCGTGCTGTA AATGGTCTAACGTATAGTGAAGAGTT	-	Templát pro 2. část genu <i>gp46</i>
<i>gp46_2_Rev</i>	TAGTGGGCTGATGTCTAGTTCTTCTATAATTCCTGAGTG AAGTCATGCAACTCTTCACTATACGTTAGACC	-	Templát pro 2. část genu <i>gp46</i>
rGP46_2_Fw	ATACCTTAAGAAGGGCATCATAGAGGAGTCTAT	-	Amplifikace 2. části genu <i>gp46</i>
rGP46_Rev2 _HA_ <i>XhoI</i>	ATATCTCGAGTTA <u>AGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTA</u> TAGTGGGCTGATGTCTAGTTC	<i>XhoI</i>	Amplifikace 2. části genu <i>gp46</i> , overlap PCR

Kurzíva – komplementární „ocásky“

Tučně – rozpoznávací místo pro endonukleázu

Podtrženo – sekvence kódující HA epitop

7.2 *Syntéza Gp46*

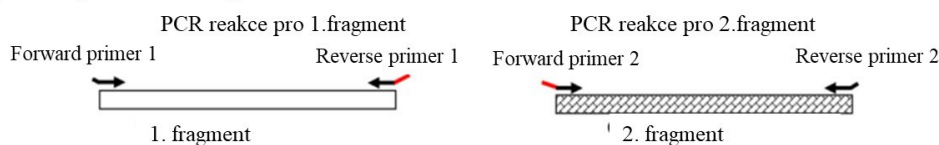
Nejprve byla zvlášť provedena syntéza první a druhé části genu *gp46* pomocí PCR s využitím enzymu *PfuUltra II* polymerázy, templátových a amplifikačních oligonukleotidů. Poté se tyto dvě části genu spojily metodou overlap PCR a byl syntetizován celý gen *gp46*, taktéž s využitím *PfuUltra II* polymerázy a primerů rGP46_Fw1_*NcoI* a rGP46_Rev2_HA_*XhoI*.

7.2.1 *Overlap PCR*

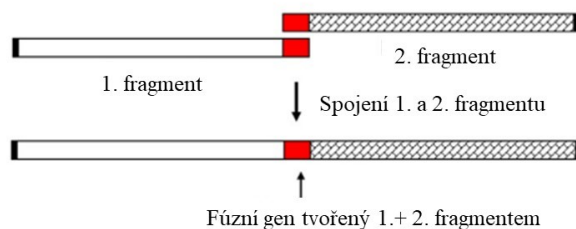
Obecně PCR je molekulárně-biologická metoda sloužící k amplifikaci DNA. Základním principem je cyklické namnožení vybraných úseků DNA, které probíhá při opakovaných změnách teplot. První krok se nazývá denaturace, při které dochází k rozvolnění vodíkových můstků, rozestoupení dvoušroubovice a vzniku jednovláknové DNA. Druhým krokem je tzv. annealing, během kterého nasedají primery na jednovláknovou DNA za snížení teploty reakční směsi. Posledním krokem je elongace, při které se syntetizuje nový řetězec DNA pomocí enzymu DNA polymerázy a dochází opět k zvýšení teploty reakční směsi. Výsledkem těchto reakčních kroků je zmnožení původní sekvence DNA.

Overlap PCR (z angl. Overlap Extension Polymerase Chain Reaction; OE-PCR) je variantou klasické PCR a využívá se pro spojení dvou či více menších fragmentů DNA do jedné větší sekvence. V našem případě se jedná o fúzi první a druhé části genu *gp46* do celého genu. Princip a popis metody je znázorněn na Obr. 4.

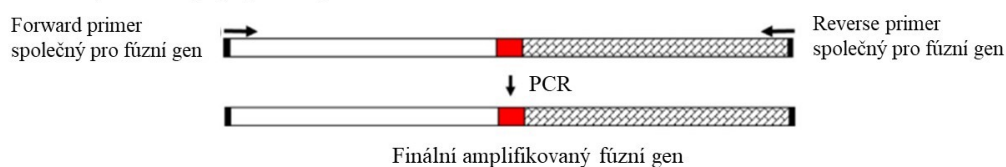
Krok 1: Amplifikace primárních fragmentů



Krok 2: Overlap PCR



Krok 3: Finální amplifikace spojených fragmentů



Obr. 4 – Schéma principu overlap PCR (upraveno dle (Hilgarth, Lanigan, 2020))

Materiál, reagentie, přístroje:

- Komponenty reakce (popsány viz Tab. 3 a Tab. 4)
- PTC-200 Peltier Thermal Cycler, BioTech

Postup:

Pro syntézu první/druhé poloviny genu *gp46* byla použita následující reakční směs (Tab. 3) a její příprava probíhala po celou dobu na ledu. Zkumavka s reakční směsí byla poté vložena do termocykleru, kde byla po nastavení příslušného programu (Tab. 4) zahájena reakce. Syntéza celého genu *gp46* probíhala obdobně. Množství templátové DNA (1. a 2. část genu) přidané do reakce bylo vypočítáno na základě měření koncentrace DNA (Tab. 5) tak, aby byl zachován poměr 1:1. Nastavení programu bylo stejné (Tab. 4).

Tab. 3 – Složení PCR reakční směsi pro syntézu první/druhé části genu *gp46*

Komponenty reakce	Objem [μ l]
Templát – oligonukleotid Fw (10mM)	2
Templát – oligonukleotid Rev (10mM)	2
Primer Fw (10mM)	1,25
Primer Rev (10mM)	1,25
dNTPs (10mM)	1
Pufř pro <i>Pfu</i> Ultra II polymerázu (10x)	5
Voda	36,5
<i>Pfu</i> Ultra II polymeráza	1

Tab. 4 – Nastavení programu na termocykleru

Fáze	Podmínky		
	Teplota	Čas	
Denaturace	95 °C	2 min	40 cyklů
	95 °C	20 s	
Annealing	57 °C	20 s	
Elongace	72 °C	30 s	
	72 °C	3 min	

Tab. 5 – Složení PCR reakční směsi pro syntézu celého genu *gp46*

Komponenty reakce	Objem [μ l]
Templát – první polovina genu <i>gp46</i>	2,7
Templát – druhá polovina genu <i>gp46</i>	2,25
Primer Fw (10mM)	1,25
Primer Rev (10mM)	1,25
dNTPs (10mM)	1
Pufř pro <i>Pfu</i> Ultra II polymerázu (10x)	5
Voda	35,55
<i>Pfu</i> Ultra II polymeráza	1

7.2.2 Elektroforéza v agarózovém gelu

Pomocí gelové elektroforézy můžeme separovat makromolekuly, jako jsou nukleové kyseliny (DNA a RNA) a proteiny. Základní princip metody je založen na rozdílné pohyblivosti molekul v gelu v elektrickém poli, která závisí na náboji a velikosti částic. U nukleových kyselin využíváme skutečnosti, že se jedná o záporně nabitě molekuly, které se pohybují ke kladně nabitému pólu (anodě). Čím jsou molekuly menší a konfirmačně jednodušší, tím dále od startu v gelu doputují (tzn., že se pohybují rychleji). Z toho vyplývá, že rychlost pohybu je nepřímo úměrná velikosti částic. Agarózový gel se připravuje o různé hustotě v závislosti na druhu separovaných částic, pro zviditelnění molekul DNA se do gelu přidává interkalační barvivo

(nejčastěji ethidiumbromid). Pro odhad velikosti separovaných DNA fragmentů se minimálně do jedné pozice v gelu nanáší tzv. DNA ladder neboli velikostní marker/standard.

Materiál, reagensie, přístroje:

- 2% agarózový gel (0,4 g agarózy na 20 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (TAE Buffer (50x) molecular biology grade, Serva))
- Interkalační činidlo – SybrSafe, Invitrogen (1 μ l/10 ml gelu)
- Vzorková barva – Orange DNA Loading Dye (6x), Thermo Scientific
- DNA ladder – HyperLadderTM 50 bp, Meridian BIOSCIENCE
- Elektroforetická vana s kompletním příslušenstvím – Mupid-One, Advance

Postup:

Nejprve byl připraven 2% agarózový gel smícháním agarózy a TAE pufru v daném poměru (0,4 g agarózy na 20 ml TAE pufru). Takto připravená směs byla krátce povařena v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza zcela nerozpustila. Do směsi byla přidána interkalační barvička a směs byla přelita do plastové vany s hřebínkem, který nám sloužil jako pomůcka pro vytvoření jamek pro vzorky/standard. Gel byl ponechán minimálně 30 minut zatuhnout. Po zatuhnutí byl pomocný hřebínek vyjmut a gel byl přemístěn do elektroforetické vany, kde byl opatrně ponořen do 1x koncentrovaného TAE pufru. Do vzniklých jamek byly aplikovány vzorky smíchané s vzorkovou barvou/DNA ladder. Elektroforetická aparatura byla nastavena na 100 V a 20 minut (1. a 2. část genu *gp46*) nebo 100 V a 30 minut (celý gen *gp46*). Následné zviditelnění DNA separované v agarózovém gelu bylo provedeno pomocí systému Infinity 3026 WL (firma Schoeller).

7.2.3 Izolace PCR produktů z gelu

Materiál, reagensie, přístroje:

- QIAquick[®] Gel Extraction Kit, Qiagen
- Centrifuga, Thermo Scientific
- Vodní lázeň, Assistent 3180, Karl Hecht
- Vortex Wizard, VELP Scientifica

Postup:

Po zviditelnění DNA v agarózovém gelu byly z gelu vyříznuty PCR produkty správné velikosti, které byly následně zváženy. Izolace DNA probíhala dle návodu komerční soupravy Qiagen.

Objemy reagensí odpovídaly poměru 100 mg agarózového gelu s cílovou DNA ~ 100 µl pufrů (dle hmotnosti zvážených fragmentů). DNA byla eluována destilovanou vodou.

7.2.4 Měření koncentrace izolovaných fragmentů

Koncentrace izolovaných DNA fragmentů byla změřena na spektrofotometru NanoPhotometer od firmy Implen oproti blanku (destilovaná voda).

7.3 Izolace plazmidové DNA

Materiál, reagentie, přístroje:

- QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen
- Třepačka Infors HT Ecotron, Biotrade
- Centrifuga, Thermo Scientific
- NanoPhotometer, Implen
- LB médium
- Kanamycin sulfát, Serva

Postup:

Izolace plazmidu pET28b z kultury *E. coli* XL1

Kultura *E. coli* XL1 exprimující plazmid pET28b byla zaočkována do 10 ml LB média s kanamycinem (zásobní roztok kanamycinu je 50 mg/ml a pracovní koncentrace 50 µg/ml média → bylo přidáno 10 µl kanamycinu do 10 ml LB média). Kultivace probíhala na třepačce (37 °C, přes noc, 200 rpm). Druhý den byla kultura centrifugována (17 000xg, 3 min, RT) a peleta použita pro izolaci plazmidové DNA pomocí komerční soupravy Qiagen (dle návodu). Koncentrace izolované plazmidové DNA byla změřena na spektrofotometru.

7.4 Restrikční štěpení

Jedná se o proces, při kterém dochází ke štěpení DNA pomocí restrikčních enzymů (restrikční endonukleázy, restriktázy). Konkrétně se štěpí fosfodiesterová vazba, která spojuje dva sousední nukleotidy v řetězci nukleové kyseliny. Restrikční enzymy štěpí v tzv. rozpoznávacím místě, nejčastěji se jedná o palindromovou oblast (čtení je stejné zepředu i zezadu). Restriktázy se využívají při klonování, v naší práci byly konkrétně použity nejprve enzymy *NcoI*-HF a *XhoI*, později i enzymy *NdeI* a *SacI*-HF (kapitola 7.10).

Materiál, reagentie, přístroje:

- Restriční endonukleázy *NcoI*-HF a *XhoI*, New England Biolabs
- QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen
- Vodní lázeň, Assistent 3180, Karl Hecht
- Vybavení na gelovou elektroforézu – stejné jako v kapitole 7.2.2
- GeneRuler 1kb DNA Ladder, Sigma-Aldrich
- NanoPhotometer, Implen
- Quick Ligation™ Kit, New England Biolabs

Postup:

Restriční štěpení plazmidu pET28b a genu *gp46*

Restriční směsi byly připravovány zvlášť pro plazmid pET28b a gen *gp46* (Tab. 6). Restrikce probíhala ve vodní lázni při 37 °C přes noc. Druhý den byla směs krátce stočena a byly k ní přidány 4 µl vzorkového pufru pro následnou elektroforézu. Na elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel (0,3 g agarózy na 20 ml TAE pufru, krátce rozvařit v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarózového prášku) a probíhala při 100 V, 30 minut. Po zviditelnění byly z gelu vyříznuty odpovídající DNA fragmenty a zváženy. Následovala izolace fragmentů DNA z gelu dle návodu komerční soupravy od firmy Qiagen. Nakonec byla změřena koncentrace izolovaných DNA fragmentů na spektrofotometru.

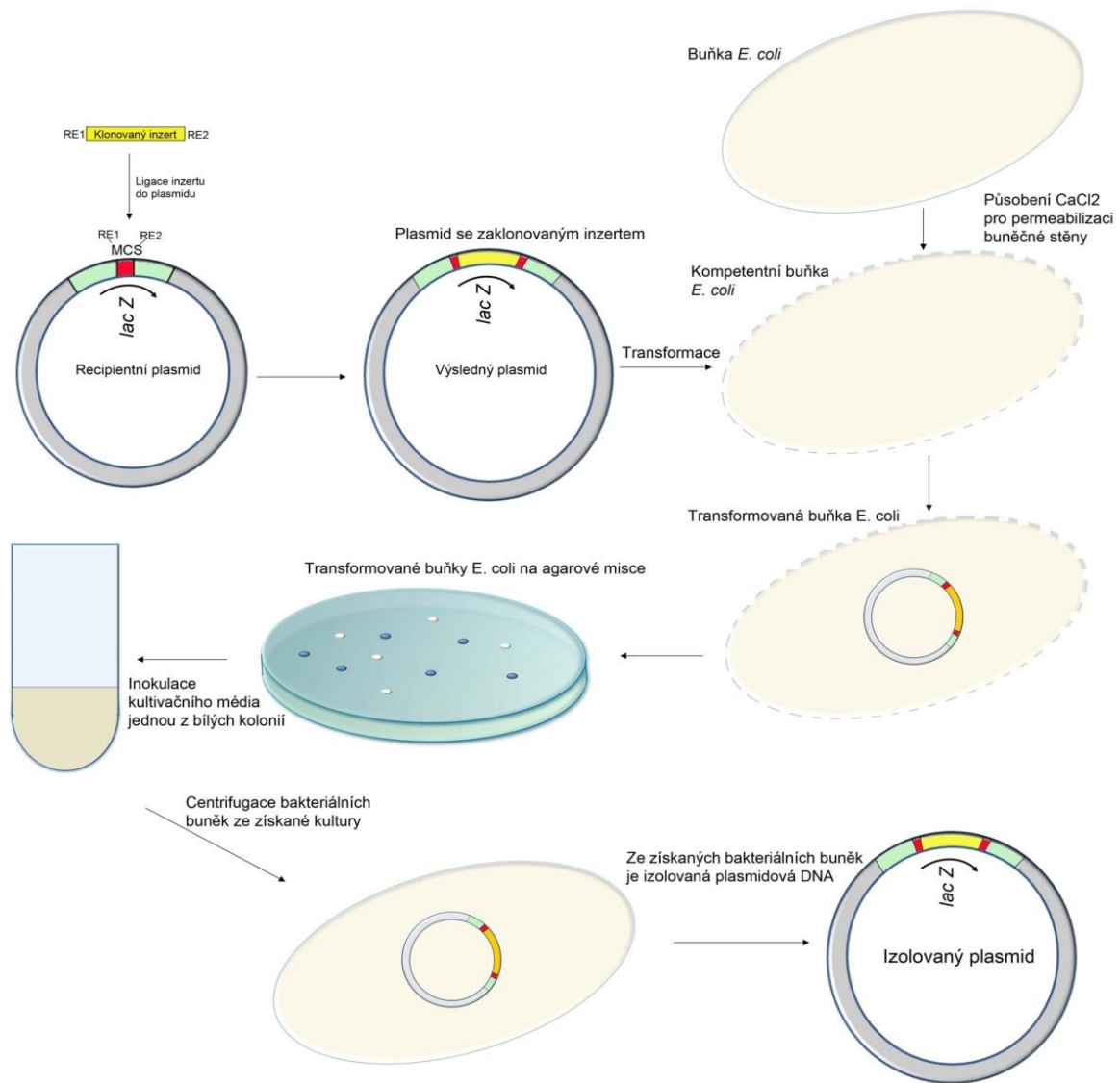
Tab. 6 – Reakční směs (plazmid pET28b/*gp46*) pro restriční štěpení

Komponenty reakce	Objem [µl]	Komponenty reakce	Objem [µl]
Plazmid pET28b	8	<i>gp46</i>	16
CutSmart pufr (10x)	2	CutSmart pufr (10x)	2
<i>NcoI</i> -HF	1	<i>NcoI</i> -HF	1
<i>XhoI</i>	1	<i>XhoI</i>	1
Voda	8	Voda	-

7.5 Klonování *gp46* do vektoru

Během molekulárního klonování obecně dochází k namnožení jedné jediné kopie DNA úseku do velkého množství kopií za využití replikačního aparátu hostitelské buňky, nejčastěji bakterie či kvasinky. Výchozím a stěžejním krokem klonování je ligace. Během té dochází ke spojování dvou fragmentů DNA pomocí kovalentní vazby. Konkrétně se jedná o začlenění studovaného DNA fragmentu, tzv. inzertu (v našem případě gen *gp46*) do příslušného vektoru (v našem

případě plazmidu pET28b). Celý proces je řízen enzymem DNA ligázou. Výsledný plazmid se začleněným inzertem je transformován do kompetentních buněk, ve kterých dochází během kultivace k jeho replikaci. V naší práci byly využity komerčně dostupné *E. coli* TOP10 chemokompetentní buňky (Invitrogen) a expresní kompetentní buňky BL21 (DE3) (New England Biolabs). Posledním krokem klonování je izolace výsledné plazmidové DNA.



Obr. 5 – Ilustrační schéma procesu klonování (4WORKS Solutions, 2024)

Ligace

Dle změřené koncentrace DNA fragmentů bylo vypočteno potřebné množství inzertu a vektoru pro ligační reakci a to tak, aby byla zachována koncentrace volných konců DNA v poměru 3:1 (inzert:vektor). Ligační směs byla připravena dle Tab. 7 s využitím komponent ze soupravy

Quick Ligation™ Kit od firmy New England Biolabs. Takto připravená směs se inkubovala 5 minut při pokojové teplotě.

Tab. 7 – Reakční směs pro ligaci

Komponenty reakce	Objem [μl]
Plazmid pET28b	2,7
Inzert – <i>gp46</i>	0,4
Ligační pufr (Quick Ligation Reaction Buffer, 2x konc.)	10
Ligáza (Quick Ligase)	1
Voda	5,9

Transformace *E. coli*

Materiál, reagenty, přístroje:

- One Shot® TOP10 Competent Cells, Invitrogen (chemokompetentní *E. coli* TOP10)
- S.O.C. médium, Invitrogen
- LB médium
- Kanamycin sulfát, Serva
- OneTaq® Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer, New England Biolabs
- T7 Forward Sequencing Primer, Invitrogen
- M13 Reverse Sequencing Primer, Invitrogen
- Termocycler, Sensoquest
- Centrifuga HeraeusPico 21, Thermo Scientific
- Třepačka Infors HT Ecotron, Biotrade
- Vodní lázeň Assistant 3180, Karl Hecht

Postup:

Do vialky s 50 μl chemokompetentních *E. coli* bylo napipetováno 10 μl ligační směsi a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Následoval teplotní šok (inkubace při 42 °C ve vodní lázni po dobu 30 sekund). Během tohoto procesu by mělo dojít k rozvolnění buněčné membrány a prostupu DNA do bakteriálních buněk. Po 2 minutovém ochlazení na ledu bylo do každé vialky přidáno 250 μl S.O.C. média a kultury byly inkubovány na třepačce (37 °C, 1 hod, 225 rpm). Transformační směs byla vyseta na LB agar s kanamycinem (selekční marker) a ponechána kultivovat přes noc při 37 °C.

Druhý den byly jednotlivé narostlé kolonie testovány pomocí PCR na koloniích (Tab. 8). Produkty reakce byly separovány pomocí gelové elektroforézy za použití 1,5% agarózového

gelu. Pozitivní kolonie byly zaočkovány do tekutého LB média s kanamycinem (37 °C, přes noc, 200 rpm). Následující den byla kultura použita pro přípravu bakteriální konzervy a pro izolaci plazmidu (*gp46pET28b*). Postup byl stejný jako v kapitole 7.3.

Tab. 8 – PCR na koloniích a podmínky reakce

Komponenty reakce	Objem [μl]	Fáze	Podmínky		
			Teplota	Čas	
DNA polymeráza 2X MM	6,25	Denaturace	94 °C	1 min	30 cyklů
Forward primer (T7 promoter)	0,25		94 °C	30 s	
Reverse primer	0,25	Annealing	55 °C	30 s	
Templát	1	Elongace	68 °C	30 s	
Voda	4,75		68 °C	3 min	

Transformace kompetentních buněk expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3)

Plazmid *gp46pET28b* byl ověřen sekvenací (Středisko sekvenování DNA, Mikrobiologický ústav AV ČR v.v.i.) a dále použit pro transformaci expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3) (New England Biolabs) za podmínek totožných s předchozí transformací s jedinou změnou a to, že bylo použito 100 ng izolovaného plazmidu. Pozitivní kolonie byly použity k vytvoření zásobní bakteriální konzervy.

7.6 Dezintegrace bakteriálních buněk

Základním principem této metody je narušení bakteriální buněčné stěny pomocí vysokého tlaku při průchodu vzorku celou lisu a zisku bakteriálního lyzátu s příslušnými proteiny. Celý proces probíhá v tzv. tlakovém buněčném lisu neboli French pressu. V naší práci byla tato metoda využita pro zisk lyzátu pro purifikaci proteinu HU_HA z *F. tularensis* a proteinu Gp46 z bakterie *E. coli*.

Materiál, reagentie, přístroje:

- Chamberlainovo médium
- LB médium
- Kanamycin sulfát, Serva
- IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) – induktor promotoru, Serva
- TBS pufr
- Inhibitory proteáz Complete EDTA free, Roche
- Benzonase® Nuclease, Sigma-Aldrich

- Bakterie *F. tularensis* FSC200/ Δ HU + HU_HApKK – Kanamycin rezistentní
- Bakterie *E. coli* BL21 (DE3)/gp46pET28b
- Centrifuga 5804 R, Eppendorf
- French Pressure Cell Press, Thermo Scientific
- Denzitometr CO 8000 Cell Density Meter, WPA Biowave

Postup:

E. coli

Z bakteriální konzervy byla část suspenze očkována do 10 ml LB média s kanamycinem a kultivována O/N při 37 °C. Druhý den byly bakterie přeočkovány do 100 ml čerstvého LB média s kanamycinem na optickou densitu OD_{600 nm} 0,2 a kultura byla kultivována při 37 °C a 250 rpm – dokud nebylo dosaženo OD_{600 nm} 0,7-0,8. Poté bylo ke kultuře přidáno indukční činidlo IPTG do konečné koncentrace 400 μ M (400 μ l zásobního roztoku o koncentraci 100 mM). Kultivace probíhala další 4 hodiny a poté byly bakterie stočeny při 7500 rpm, laboratorní teplotě, 15 minut. Vzniklá peleta byla promyta TBS a zamražena při -20 °C. Další den byla peleta resuspendována ve 2 ml TBS a k suspenzi bylo přidáno 40 μ l inhibitorů proteáz a 2 μ l benzonázy. Následně bylo provedeno rozbití buněk pomocí přístroje French press při 16 000 psi se 3 opakováními. Buněčný debris a nerozbité buňky byly odstraněny centrifugací při 6500 rpm, 15 minut, laboratorní teplota.

F. tularensis

U *F. tularensis* byl postup velmi podobný jako u *E. coli*. Kmen *F. tularensis* FSC200/ Δ HU + HU_HApKK exprimující HA-značený HU protein byl v laboratoři připraven dříve (Pavlik, Spidlova, 2022). Nejprve byly vysety bakterie *F. tularensis* z konzervy, zaočkovány do 10 ml Chamberlainova média na OD_{600 nm} 0,2 a kultivovány přes noc. Druhý den byly zaočkovány do 50 ml Chamberlainova média s kanamycinem a kultivovány přes den při 37 °C a 200 rpm do dosažení OD_{600 nm} 0,8. Po promytí pelety pomocí TBS byla peleta resuspendována v 1 ml TBS, s přídatkem 20 μ l inhibitorů proteáz a 1 μ l benzonázy. Lýza buněk probíhala přístrojem French press za totožných podmínek.

7.7 Izolace HU_HA z *F. tularensis* a Gp46 z *E. coli*

Materiál, reagentie, přístroje:

- antiHA Agarose, Pierce
- Pierce Spin Column Screw Cap, cat. no. 69705

- Qubit™ Protein Assay Kit, 100 Assays, Invitrogen
- TBS pufr
- TBS-T pufr (TSB obohacený o 0,05% TWEEN-20)
- 3 M NaSCN, Sigma-Aldrich
- 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl
- Centrifuga Heraeus Pico 21, Thermo Scientific
- MACS MIX minirotátor, Miltenyi Biotec
- Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, Thermo Scientific
- DEAE Support, Bio-Rad
- 2 ml centrifugační kolonky, Pierce
- Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices, Sigma Aldrich

Postup:

Do kolonek Pierce Spin Column Screw Cap bylo přidáno 150 µl antiHA agarose slurry (anti HA resin) a pomocí centrifugace (12 000x g, 1 min) byl odstraněn uchovávací roztok. Resin byl promyt 150 µl TBS, následovala opět centrifugace za stejných podmínek. Do každé kolonky bylo nanášeno 550 µl bakteriálního lyzátu (do jedné kolonky lyzát *E. coli*, do druhé kolonky lyzát *F. tularensis*) a směsi byly inkubovány O/N při 4 °C na rotátoru. Druhý den byl lyzát odstraněn centrifugací (12 000x g, 1 min) a jímán do mikrozkušavky a uschován (označen jako FT – z angl. Flow Through, proteklá frakce). Kolonky s resinem s navázaným proteinem byly 3 x promyty 500 µl TBS-T a promyté frakce byly vždy uschovány (označeno W1-W3, z angl. Wash, promývací frakce). Posledním krokem byla eluce – k resinu v kolonce bylo přidáno 200 µl 3 M NaSCN a následovala opět centrifugace. Eluce byla opakována 2x – vždy s těmi samými 200 µl eluátu. Eluát (=Gp46/HU) byl uschován a kolonka s resinem byla promyta 3 M NaSCN a poté TBS pro opětovné použití. Pro následné použití purifikovaných proteinů ve funkčních studiích byla nutná výměna pufru u eluátu. Tento proces byl proveden s využitím Zeba kolonek dle návodu výrobce a purifikované proteiny byly převedeny do pufru o složení 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl. Z důvodu možné vazby proteinu Gp46 k HU proteinu bakterie *E. coli*, byl purifikovaný protein Gp46 přečištěn pomocí iontově-výměnné chromatografie s využitím DEAE Support kuliček a 2 ml centrifugačních kolonek. Eluce proteinu pomocí pufrů se zvyšující se iontovou silou byla kontrolována pomocí refraktometru. Frakce obsahující Gp46 protein byla pomocí Zeba kolonek opět převedena do pufru o složení 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl. Následně byla změřena koncentrace (souprava Qubit™

Protein Assay Kit, 100 Assay) purifikovaných proteinů. Pokud byla koncentrace proteinu Gp46 nízká, následovalo koncentrování vzorku pomocí komerční soupravy Amicon, dle návodu výrobce.

7.8 SDS-PAGE, western blot, imunodetekce

SDS-PAGE je typ elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), která se používá pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti. Vlivem SDS dochází k denaturaci proteinů, které pak nesou negativní náboj. Polyakrylamidový gel se využívá jako médium pro pohyb molekul v elektrickém poli. Negativně nabitě proteiny obalené SDS (nositel náboje) putují ke kladně nabitě anodě. Menší molekuly migrují rychleji a doputují dále, z čehož vyplývá, že rychlost pohybu je nepřímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti. Separované molekuly mohou být následně přeneseny z gelu na membránu – tzv. western blot. Detekce proteinu na membráně je prováděna přidáním tzv. primární protilátky proti danému proteinu. V případě přítomnosti proteinu se na něj primární protilátka naváže a v dalším kroku je rozpoznána sekundární protilátkou. V této diplomové práci byla použita metoda přenosu tzv. suchou cestou (semi-dry). Jeho výhodou je homogenita elektrického pole, menší spotřeba transferového pufru a v závislosti na aparatuře možnost přenosu až 6 mini-gelů naráz. Naopak není vhodný pro přenos proteinů s vysokou molekulou hmotností. Konečná detekce proteinů je nejčastěji prováděna fluorescenčně nebo chemiluminiscenčně, v naší práci byla použita druhá možnost.

SDS-PAGE

Materiál, reagentie, přístroje:

- 3x koncentrovaný SDS pufr s β -ME (připravit těsně před použitím)
- TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12%, Bio-Rad
- TEMED, Sigma
- Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad
- Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, Bio-Rad
- GeLoader Tips 0,5-20 μ l, Eppendorf
- Termoblok, Grant
- Centrifuga Heraeus Pico 21, Thermo Scientific
- Vortex Wizard, VELP Scientifica

Postup:

Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny smícháním 20 µg proteinových frakcí s 3x koncentrovaným vzorkovým pufrem SDS s β-ME v poměru 2:1. Naředěné vzorky byly povařeny v termobloku při 95 °C po dobu 5 minut, poté ochlazeny na pokojovou teplotu a stočeny. Polyakrylamidový gel (12%) byl připraven dle návodu TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit (tloušťka gelu 1,0 mm). Elektroforetická souprava byla sestavena dle návodu komerční soupravy Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Skla s gely byla dle předepsaného postupu umístěna do elektroforetické aparatury. Horní pufr byl nalit asi 0,5 cm pod okraj aparatury a to tak, aby jamky se vzorky byly ponořeny. Dolní pufr byl do tanku nalit asi do 1/3 skel. Do jamek byly pomocí speciálních GELoader špiček pipetovány naředěné vzorky a standard. Tank byl uzavřen víkem s elektrodami, které byly připojeny ke zdroji za podmínek: napětí – 200 V, maximální proud 60 mA a délka separace cca 1 hod. Po dokončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut a umístěn do cca 100 ml transferového pufru, kde se nechal 10 minut promývat.

Western blot

Materiál, reagentie, přístroje:

- Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad
- PVDF Imobilon-P Transfer Membranes, Merck
- NOVEX (R) Stainer A, Colloidal Blue Stain Kit, Invitrogen
- NOVEX (R) Stainer B, Colloidal Blue Stain Kit, Invitrogen
- Methanol
- Transferový pufr
- Extra Thick Blot Paper mini blot size, Bio-Rad
- Filtrační papír Whatman 3 mm Chr Blotting Paper, Whatman

Postup:

Pro metodu blotování byla využita komerční souprava Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell od firmy Bio-Rad. Vystřížená PVDF membrána (o velikosti gelu) byla smočena na 1 minutu ve 100 ml methanolu a poté promývána ve 100 ml transferového pufru minimálně po dobu 20 minut na třepačce (během této doby byl transferový pufr min. 3x vyměněn). V transferovém pufru byly také namočené filtrační papíry. Následně byl složen semi-dry blotovací sendvič: na anodu extra silný filtrační papír → PVDF membrána → gel → 5 filtračních papírů. Sendvič byl přiklopen katodovou částí, víko bylo upevněno a přenos

proteinů byl spuštěn za podmínek: 25 V (konstantní), 170 mA, 20 minut. Po skočení procesu byly gel i membrána opláchnuty ve vodě. Membrána byla usušena a uchována v lednici do dalšího použití. Gel byl pro kontrolu obarven pomocí NOVEX Colloidal Blue Kit (20 ml Stainer A, 5 ml Stainer B, 20 ml methanolu a 55 ml destilované vody) přes noc a druhý den odbarven promytím v destilované vodě. Nakonec byl gel přenesen do uchovacího roztoku (20% síran amonný), zataven do fólie a uchováván v lednici.

Chemiluminiscenční detekce

Materiál, reagentie, přístroje:

- Blotting – Grade Blocker, Bio-Rad (tzv. mléko)
- TBS pufr
- 0,05% TWEEN 20
- Rabbit Polyclonal HA tag antibody - conjugated to HRP (HRP Anti-HA tag antibody), Abcam
- BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) kit, Roche
- Třepačka Infors HT Ecotron, Biotrade
- MACS-MIX minirotátor, Miltenyi Biotec
- Cytiva Amersham™ Hypercassette™ Autoradiography Cassette, Fisher Scientific
- Sekundární protilátka HRP, Dako
- Parafilm
- Medical X-Ray Film Blue, Agfa
- Methanol

Postup:

Byla provedena aktivace osušené membrány s přenesenými proteiny. PVDF byla smočena v methanolu a následně promyta v TBS na třepačce. Poté proběhla hodinová blokáce v misce na třepačce s 90-100 ml roztoku 5% mléka v TBS s 0,05 TWEEN 20. Takto připravená membrána byla inkubována s předem připravenou primární protilátkou HRP Anti-HA tag antibody naředěnou 1:5000 v roztoku 5% mléka v TBS s 0,05 TWEEN 20 v lednici O/N. Druhý den byla membrána opatrně vložena do 50 ml centrifugační zkumavky tak, aby proteiny směřovaly dovnitř zkumavky a membrána byla oplachována 6x9 minut 5-10 ml TBS s 0,05% TWEEN 20 a 1x5 minut v 5-10 ml TBS (na minirotátoru). Chemiluminiscenční detekce byla prováděna pomocí BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) kitu. Reakční směs byla

připravena 30 minut před koncem promývání. Bylo smícháno 1,6 ml roztoku A s 16 µl roztoku B z kitu BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) a směs byla inkubována 30 min za tmy. Po skončení inkubace byl roztok nakapán (1,6 ml/membrána) na parafilm a membrána byla vložena na 1 minutu do kapky roztoku ECL tak, aby proteiny směřovaly dolů do roztoku. Membrána byla lehce osušena a vložena do RTG kazety mezi fólii. V temné komoře byl k membráně v kazetě přiložen RTG film, který byl po stanovené době vložen do vyvolávacího přístroje dle předepsaného postupu.

7.9 EMSA – HU_HA a Gp46

EMSA (z angl. Electrophoretic Mobility Shift Assay) je elektroforetická metoda používaná k detekci proteinů vázajících DNA. Princip EMSA spočívá v rozdílné migraci volné a navázané DNA. DNA s navázaným proteinem migruje v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu pomaleji než volná DNA. V případě této diplomové práce tuto metodu využijeme pro potvrzení, zda protein Gp46 inhibuje DNA vazebnou aktivitu HU proteinu.

Materiál, reagentie, přístroje:

- DNA – PCR fragment *pigR* gen (105 ng/µl)
- HU_HA – převedený do pufru 50 mM Tris, 150 mM NaCl – koncentrace 0,25 µg/µl
- Gp46 – po iontově výměnné chromatografii, v pufru 50 mM Tris, 150 mM NaCl – koncentrace 0,296 µg/µl
- Vazebný pufr (20 mM Tris, pH 8, 0,1 mM EDTA-Na₂, 50 mM KCl, 10 µg/ml BSA, 5% glycerol, 0,1 mM DTT) – zásobní 10x koncentrovaný
- 10x Loading Dye, 10x koncentrovaný nanášecí pufr, Takara
- 1% agarózový gel v 0,33x TBE pufru (TBE Buffer 10x, Serva)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific
- Elektroforetická aparatura

Postup:

Již dříve bylo potvrzeno, že protein HU je schopný se vázat na DNA obsahující gen *pigR* (Pavlik, Spidlova, 2022). V této diplomové práci byl proveden experiment, jehož cílem bylo zjistit, zda protein Gp46 tuto aktivitu blokuje. Reakční směs byla připravena dle Tab. 9. Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 20 minut. Mezitím byl připraven agarózový gel (1% agaróza v 0,33 koncentrovaném TBE pufru) s interkalační barvou. Po skončení inkubace byla reakce

zastavena přidáním 2 μ l 10x koncentrovaného nanášecího vzorkového pufru a následně byla směs nanesena na gel. Elektroforéza probíhala v chladničce (4 °C) při 50 V po dobu 4 hodin, poté byl proud zvýšen na 100 V po dobu dalších 40 minut.

DNA fragment obsahující *pigR* gen pro EMSA experiment byl připraven pomocí PCR dle Tab. 10 a Tab. 11 a izolován z gelu po separaci v agarózovém gelu (viz kapitoly 7.2.2 a 7.2.3).

Tab. 9 – Reakční směs pro EMSA experiment

	1	2	3	4	5	6	7
	DNA	DNA+Gp46	DNA+HU	HU+Gp46+DNA			
H ₂ O	17,24	3,64	15,24	21,10	8,44	5,04	2,64
DNA (80 ng; <i>pigR</i> gen)	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
10x koncentrovaný zásobní pufr	2	2	2	2	2	2	2
HU	-	-	2	2	2	2	2
Gp46	-	13,6	-	3,4	6,8	10,2	13,6

Tab. 10 – PCR reakční směs pro amplifikaci fragmentu *pigR* (promotor *pigR*)

Komponenty reakce	Objem [μ l]
Templát = chromozomální DNA FSC200	1
<i>Pfu</i> Ultra II Buffer (10x), Agilent	5
PigR- Rev primer, Generi Biotech	1,25
PigR- Fw primer, Generi Biotech	1,25
10 mM dNTPs	1
<i>Pfu</i> Ultra II polymeráza	1
Voda	39,5

Tab. 11 – Podmínky PCR reakce pro amplifikaci fragmentu *pigR* genu

Fáze	Podmínky		
	Teplota	Čas	
Denaturace	95 °C	2 min	40 cyklů
	95 °C	20 s	
Annealing	55 °C	20 s	
Elongace	72 °C	30 s	
	72 °C	3 min	

7.10 Klonování *gp46* do *F. tularensis*

Materiál, reagenty, přístroje:

Tab. 12 – Oligonukleotidy pro amplifikaci genu *gp46* pro klonování do *E.coli/F.tularensis* shuttle vektoru

Název	Sekvence (5' - 3')	Tm	Restrikční místo	Účel
<i>gp46_Fw</i> (<i>NdeI</i>)	AAACATATGATGACAGAAGACCAAAAATT	60 °C	<i>NdeI</i>	Amplifikace genu <i>gp46</i> pro expresi ve <i>F. tularensis</i>
<i>gp46_Rev</i> (<i>SacI</i>)	AAAGAGCTCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTAT GGGTATAGTGGGCTGATGTCTAGTTC	62 °C	<i>SacI</i>	Amplifikace genu <i>gp46</i> pro expresi ve <i>F. tularensis</i>

Postup:

Pro expresi proteinu Gp46 ve *F. tularensis* bylo potřeba gen *gp46* klonovat do „shuttle“ vektoru pKK289KmGFP. Tento vektor obsahuje replikační počátek jak pro replikaci v *E. coli*, tak také pro replikaci ve *F. tularensis*. Sekvence kódující gen *gp46* byla do vektoru vložena místo sekvence kódující protein GFP pomocí restrikčních míst *NdeI* a *SacI*. Pomocí templátu *gp46pET28b* a páru primerů *gp46_Fw* (*NdeI*) a *gp46_Rev* (*SacI*) byl gen amplifikován včetně sekvence kódující HA epitop (podtržena) a rozpoznávacích míst pro dané restrikční endonukleázy (zvýrazněny tučně) (Tab. 12, Tab. 13).

Tab. 13 – Reakční směs a podmínky pro PCR reakci

Komponenty reakce	Objem [μl]	Fáze	Podmínky		
			Teplota	Čas	
Templát – <i>gp46pET28b</i>	1	Denaturace	94 °C	1 min	30 cyklů
Primer Fw (10mM)	1,25		94 °C	30 s	
Primer Rev (10mM)	1,25	Annealing	55 °C	30 s	
dNTPs (10mM)	1	Elongace	68 °C	30 s	
Pufř pro <i>PfuUltra II</i>	5		68 °C	3 min	
Voda	39,5				
<i>PfuUltra II</i> polymeráza	1				

Po PCR amplifikaci byl fragment správné velikosti izolován z agarózového gelu (viz kapitola 7.2.3) a následně opracován restrikčními enzymy *NdeI* a *SacI*-HF. Stejnými endonukleázami

byl štěpen i vektor pKK289KmGFP, který byl izolován z kultury *E. coli* XL1 –pKK289KmGFP postupem shodným jako v kapitole 7.3.

Tab. 14 –Reakční směs pro restrikci genu *gp46* a vektoru pKK289KmGFP

Komponenty reakce	Objem [μl]	Komponenty reakce	Objem [μl]
Vektor pKK289KmGFP	16	<i>gp46</i>	16
CutSmart pufr (10x)	2	CutSmart pufr (10x)	2
<i>NdeI</i> -HF	1	<i>NdeI</i> -HF	1
<i>SacI</i> -HF	1	<i>SacI</i> -HF	1
Voda	-	Voda	-

Fragmenty správných velikostí získané restrikčním štěpením byly izolovány z agarózového gelu a použity pro ligaci (Tab. 15). Ligační směs byla použita pro transformaci *E. coli* TOP10 (viz kapitola 7.5). Po ověření správnosti konstruktů *gp46*pKK289Km sekvenací byl plazmid použit pro elektroporaci bakterií *F. tularensis* FSC200.

Tab. 15 – Ligační směs

Komponenty reakce	Objem [μl]
Vektor pKK289Km <i>NdeI/SacI</i>	1,6
Inzert – <i>gp46 NdeI/SacI</i>	0,2
Ligační pufr (Quick Ligation Reaction Buffer, 2x konc.)	10
Ligáza (Quick Ligase)	1
Voda	7,2

7.11 Elektroporace

Materiál, reagenty, přístroje:

- Elektrokompentní buňky *F. tularensis* FSC200
- *gp46*pKK289Km
- Elektroporační kyvety 2 mm, Bio-Rad
- Chamberlainovo médium
- McLeod agar
- Kanamycin sulfát, Serva
- Elektroporátor GenePulser Xcell™, Bio-Rad
- GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder
- Centrifuga Eppendorf 5804 R, Eppendorf

Postup:

Elektrokompetentní buňky *F. tularensis* FSC200 (připraveny na pracovišti)¹ byly rozmrazeny na ledu a k buňkám byl přidán 1 μ l plazmidové DNA (*gp46pKK289Km*). Směs byla lehce promíchána a po inkubaci 10 minut na ledu přenesena do 2 mm elektroporačních kyvet. Elektroporace probíhala za podmínek: 2,5 kV, 600 Ω , 25 μ F. Poté byl k buňkám ihned přidán 1 ml přehřátého Chamberlainova média a suspenze byla přenesena do 15 ml zkumavky. Buňky byly kultivovány 4 hodiny za stálého třepání při 37 °C. Poté byla kultura centrifugována 3 minuty při 6000 rpm při laboratorní teplotě. Cca 700 μ l supernatantu bylo odstraněno, peleta byla resuspendována a suspenze byla vyseta na McLeod plotny s kanamycinem. Plotny byly inkubovány 5 dní při 37 °C.

Při ověřování klonů nesoucích inzertní DNA bylo v principu postupováno podle metodiky v kapitole 7.5. Templátová DNA do PCR na koloniích byla připravena odebráním části narostlé kolonie sterilním párátkem a resuspendováním v 10 μ l vody. Poté byly vzorky vystaveny po dobu 10 minut teplotě 95 °C a krátce centrifugovány. PCR byla provedena s primery *gp46_Fw (NdeI)* a *gp46_Rev (SacI)*. Pozitivní kolonie byly použity pro přípravu bakteriálních konzerv, které byly uchovávány při -150 °C.

1

Příprava elektrokompetentní buňek *F. tularensis* FSC200

F. tularensis FSC200 byla vyseta ze zásobní konzervy na dvě McLeod plotny bez antibiotika a kultivována 24-48 hodin (podle nárůstu bakterií) při teplotě 37 °C. Z ploten byla bakteriální kultura přeočkována do 10 ml přehřátého Chamberlainova média a kultivována při 37 °C do druhého dne. Narostlá kultura byla centrifugována 15 minut při 6500 rpm a 24 °C. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v přehřátém Chamberlainově médiu, buněčná suspenze byla zaočkována do 50 ml přehřátého Chamberlainova média na OD600 \approx 0,1 a kultivována do OD600 = 0,3-0,6.

Narostlá kultura byla centrifugována 15 minut ve vychlazené centrifuze při 7300 rpm. Od usazených buněk bylo důkladně odstraněno médium a buňky byly dvakrát promyty vychlazenou 0,5 M sacharózou při 7300 rpm. K usazeným promytým buňkám byl přidán 1 ml vychlazené 0,5 M sacharózy. Buňky byly důkladně resuspendovány, rozděleny po 100 μ l do vychlazených zkumavek a uchovávány při -80 °C.

7.12 Měření růstových křivek

Materiál, reagentie, přístroje:

- Chamberlainovo médium
- Synergy H1 Microplate Reader, BioTek
- Blank – čisté médium (B)
- Bakteriální suspenze kmenu FSC200 (FSC200)
- Bakteriální suspenze kmenu FSC200/ Δ HU (Δ HU)
- Bakteriální suspenze kmene FSC200 nesoucí plazmid *gp46pKK289Km* – kanamycin rezistentní (FSC200/Gp46, v Tab. 16 označen 200/Gp)

Postup:

Bakteriální kultury (FSC200, FSC200/Gp46 a FSC200/ Δ HU) byly zaočkovány do Chamberlainova média (v případě potřeby byl přidán kanamycin – 20 μ g/ml) na optickou densitu OD_{600 nm} 0,1 a kultivovány při 37 °C a 200 rpm přes noc. Druhý den byla změřena OD_{600 nm} noční kultury a v čerstvém médiu byly připraveny suspenze o OD_{600nm} 0,1 (v případě potřeby byl přidán kanamycin – 20 μ g/ml). Jednotlivé suspenze byly v pentaplikátu pipetovány do mikrotitrační destičky (96 jamek) dle schématu v Tab. 16. Do prázdných jamek bylo napipetováno 350 μ l vody jako ochrana před vyschnutím jamek se vzorky. Takto připravená destička byla vložena do přístroje Synergy H1 Microplate Reader, kde byla kultivována 24 hodin a každých 60 minut probíhalo měření OD_{600 nm}.

Tab. 16 – Pipetovací schéma mikrotitrační destičky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda
B	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda
C	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda
D	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda
E	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda
F	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda	B	FSC200	Δ HU	200/Gp	Voda
G	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda
H	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda	Voda

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

Materiál, reagentie, přístroje:

- Kultivační médium BMMs
 - ⇒ Kultivační médium DMEM, Invitrogen
 - ⇒ 10% teplotně inaktivované hovězí sérum, FBS, Sigma
 - ⇒ 10% supernatant získaný kultivací L929 bb
 - ⇒ 50 U/ml Penicilin + 50 µg/ml Streptomycin (jen pro první pasáž), Sigma Aldrich
- Myši BALB/c
- Ethanol (70%)
- Dual Fluorescence Cell Counter LUNA, Logos Biosystems
- Fluorescenční barva – akridinová oranž

Postup:

Po eutanázii myši BALB/c pomocí CO₂ provedené odpovědným pracovníkem proškoleným pro práci s pokusnými zvířaty byly z holenních a stehenních kostí získány kostně-dřeňové buňky dle následujícího postupu. Nejprve byla rozstříhnutá břišní dutina a stříh pokračoval dále k zadním nožičkám. V oblasti pánve byly nožky odděleny od těla a uchovány v DMEM médiu. Vypreparované nožičky byly ponořeny na 1-3 minuty do 70% ethanolu kvůli dezinfekci a poté byly přemístěny opět do DMEM média. Následně byla důkladně odstraněna svalová hmota a byly odděleny stehenní a holenní kosti (důležité je nepřestříhnout kost, aby se buňky z kostní dřeni neznečistily, případně úplně nevyplavily). Vypreparované kosti byly opět umístěny do DMEM média. Konce kostí byly s velkou opatrností odstříhnuty těsně nad kloubem a každá kost byla z obou stran propláchnuta cca 2 ml média pomocí jehly do 50 ml zkumavky. Následná inkubace 1 minutu vedla k usazení větších kusů tkáně či dřeni a poté byl supernatant přenesen do nové 50 ml zkumavky. Buněčná suspenze byla centrifugována 5 minut, 400x g, RT. Po stočení byl odstraněn supernatant a buňky byly rozředěny v 10 ml BMMs média s antibiotiky. Množství buněk bylo spočítáno pomocí přístroje Dual Fluorescence Cell Counter LUNA v přítomnosti akridinové oranže. Na bakteriální Petriho misky bylo přidáno 15 ml BMMs média s antibiotiky, následně buňky o koncentraci 6×10^6 a suspenze na misce byla kultivována při 37 °C, 5 % CO₂. Po 4 dnech byla provedena výměna média (odebráno 7,5 ml a přidáno 7,5 ml čerstvého). Po týdnu byly makrofágy diferencovány.

7.14 Proliferace *F. tularensis* v BMMs

Materiál, reagentie, přístroje:

- Kultivační médium DMEM + 10% FBS (DMEM + FSB)
- Kultivační médium DMEM + 10% FBS + 5 µg/ml gentamicinu
- PBS
- McLoad agar (cca 70 ploten McLoad a 60 ks McLoad + kanamycin)
- 0,1% deoxycholát sodný (0,01 g/10 ml PBS)
- *F. tularensis* FSC200 (pozitivní kontrola)
- *F. tularensis* FSC200/ΔHU
- Kmen FSC200/Gp46 KAN rezistentní
- Dual Fluorescence Cell Counter LUNA, Logos Biosystems
- Fluorescenční barva – akridinová oranž

Postup:

Bakterie

Každý druh bakterie byl masivně naočkován na 1 McLoad plotnu a inkubován 16-24 hodin při 37 °C a 5 % CO₂. Po nárůstu bakterií byly připraveny bakteriální suspenze FSC200 a jednotlivých mutantů o OD_{600 nm} 1. Z připravených suspenzí byl odebrán 1 ml do eppendorff zkumavky a stočen 3300 x g, 7 minut, RT. Supernatant byl odsát a bakterie byly resuspendovány v 1 ml kultivačního DMEM média s FBS. Pro kontrolu byly bakteriální suspenze vysety na McLeod agar (50 µl suspenze od každé bakterie (v duplikátu) v CFU ředění 10⁻⁷).

Buňky

Buňky připravené v kapitole 7.13 byly promyty cca 10 ml předeřátého PBS. Poté bylo k buňkám přidáno studené PBS (cca 4 ml/plotna) a buňky byly důkladně seškrábnuty a přeneseny do centrifugační zkumavky typu falcon. Následovala centrifugace 250 g, 5 min, RT. PBS bylo odstraněno a buňky byly resuspendovány v 1 ml DMEM + FBS a poté doplněny do 10 ml DMEM + FBS. Ze zkumavky bylo odebráno 18 µl buněk, přidaly se 2 µl fluorescenční barvičky a počet buněk byl spočítán na přístroji LUNA. Na 24-jamkový panel byly nasazeny buňky – 5x10⁵ buněk/jamku do 1 ml DMEM + FBS. Buňky v takto připraveném panelu byly ponechány adherovat do druhého dne v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂.

Infekce kostně-dřeňových myších makrofágů

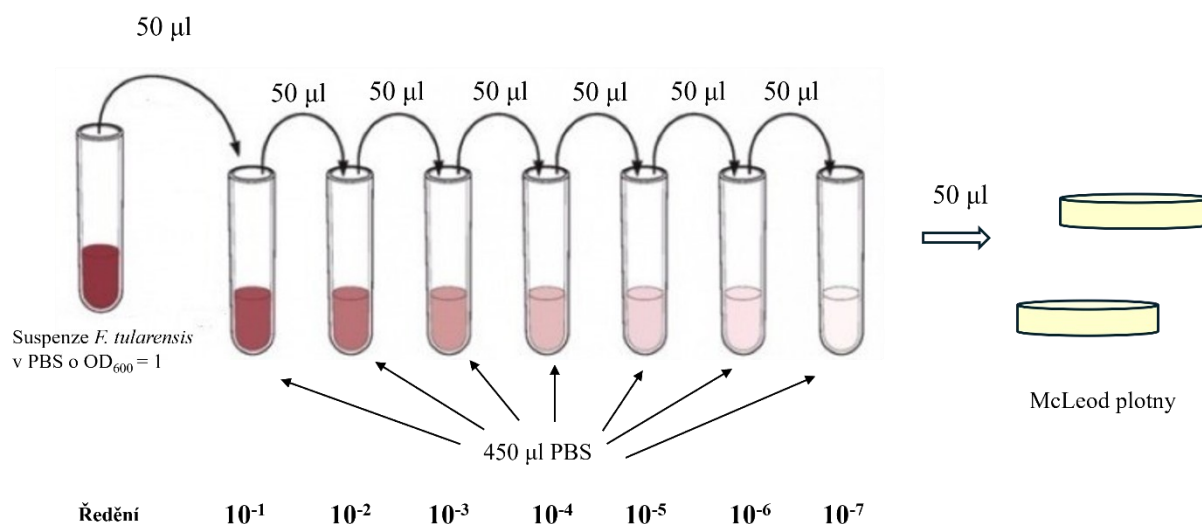
Další den bylo z jamek odsáto médium tak, aby zůstalo jen 250 μ l. Do každé jamky byla pipetována bakteriální suspenze o MOI (multiplicita infekce, poměr infekčních částic (bakterií) na 1 eukaryotní buňku) = 50. Centrifugací v čase 0 za podmínek 400 x g, 5 min, RT byla umožněna synchronní fagocytóza. Následovala inkubace 30 minut v inkubátoru: 5 % CO₂, 37 °C v kompletním DMEM médiu (DMEM + FBS). Poté byly jamky 3x promyty teplým PBS. Do každé jamky byl přidán 1 ml DMEM média (DMEM + FBS) s 5 μ g/ml gentamicinu a buňky byly inkubovány 30 minut, 5 % CO₂, 37 °C (během této inkubace by mělo působením gentamicinu dojít k odstranění zbývajících extracelulárních bakterií). Poté byly buňky opět 3x promyty PBS. Následně byla provedena inkubace buněk v jednotlivých časových intervalech, tj. 1 hod/6 hod/24 hod., v 1 ml kompletního kultivačního média DMEM (DMEM + FBS) (5 % CO₂, 37 °C). Ve zvolených časových intervalech byl vždy odstraněn supernatant, buňky byly 3x (1 hod, 6 hod) nebo 1x (24 hod) promyty přehřátým PBS a poté lyzovány vychlazeným 0,1% deoxycholátem sodným po dobu 5 minut na ledu. Buněčná suspenze byla doplněna 900 μ l PBS (ředění 10⁻¹) a následně byla pro každý kmen připravena ostatní ředění dle Tab. 17 podle schématu desítkové ředící řady (Obr. 6). Pro každý zvolený časový interval bylo vyseto 50 μ l naředěné buněčné suspenze (v duplikátu) na McLeod plotny pro odečet CFU. Tento experiment byl proveden celkem 2x. Aby byl výsledek mezi jednotlivými časovými intervaly více znatelný, při druhém experimentu byl přidán časový interval 18 hod a byla poupravena ředění (Tab. 18).

Tab. 17 – Ředění pro CFU jednotlivých bakterií – 1. experiment

Čas odběru CFU	Ředění		
	FSC200	FSC200/ Δ HU	FSC200/Gp46 KAN rezistentní
1 hod	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
6 hod	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	10 ⁻³ , 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
24 hod	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶

Tab. 18 – Ředění pro CFU jednotlivých bakterií – 2. experiment

Čas odběru CFU	Ředění		
	FSC200	FSC200/ Δ HU	FSC200/Gp46 KAN rezistentní
1 hod	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
6 hod	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴ , 10 ⁻⁵
18 hod	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶
24 hod	10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶



Obr. 6 – Příprava desítkové ředící řady (Zdroj: vlastní)

7.15 Infekce myši *BALB/c*

Materiál, reagensie, přístroje:

- *F. tularensis* FSC200 (ředění: 3×10^2)
- *F. tularensis* FSC200/ Δ HuB (ředění: 3×10^2)
- *F. tularensis* FSC200/Gp46 (ředění: 3×10^2)
- Myši
 - Celkový počet myši na 1 skupinu: 5
 - Celkový počet skupin: 3 (1x FSC200, 1x FSC200/ Δ HuB, 1x FSC200/Gp46)
 - Počet infikovaných typů bakterií: 3
 - Celkový počet myši na pokus: 15
- McLeod agar
- Fyziologický roztok
- PBS

Postup:

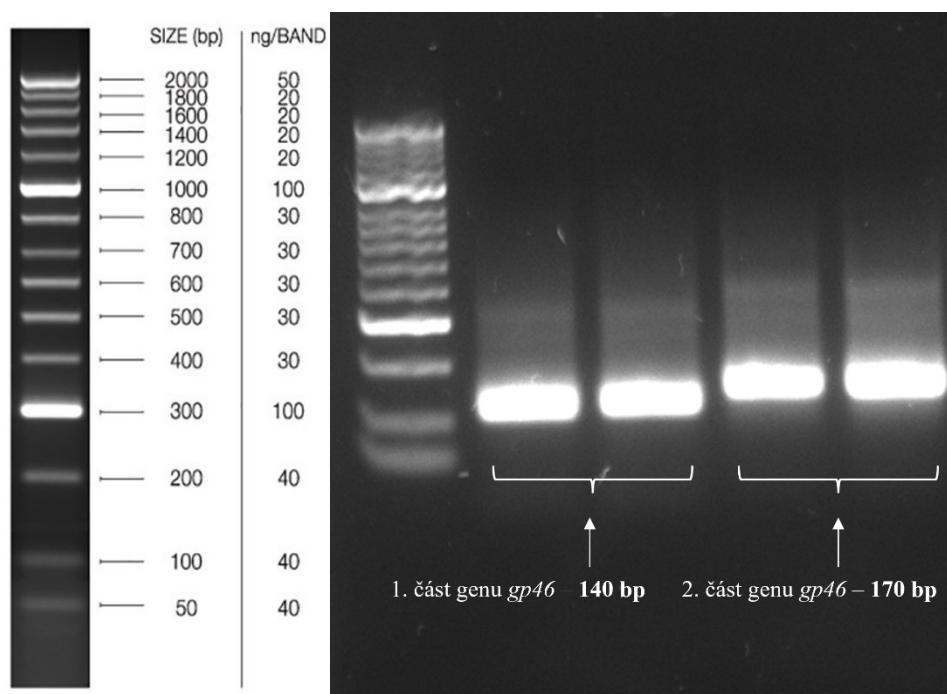
Nejprve byla připravena příslušná ředění jednotlivých bakteriálních suspenzí FSC200 a mutantů. Suspenze FSC200 o $OD_{600 \text{ nm}} 1$ (což odpovídá cca $3\text{--}5 \times 10^9$ bakterií/ml) byla postupně desítkovým ředěním (Obr. 6) ředěna tak, aby suspenze obsahovala $3\text{--}5 \times 10^4$ bakterií v 1 ml. Z této suspenze bylo odebráno 0,2 ml a přidáno k 3,8 ml fyziologického roztoku, což ve výsledku odpovídalo infekční dávce $3\text{--}5 \times 10^2/0,2$ ml. Obdobným způsobem byly připraveny ostatní suspenze bakterií. Skupinám po 5 myších byla subkutánně (s.c.) aplikována dávka 3×10^2

CFU/myš jednotlivých bakteriálních kmenů v 0,2 ml fyziologického roztoku. Skutečný aplikovaný počet CFU byl určen výsevem na McLeod plotny takto: FSC200 3×10^2 CFU/myš, FSC200/ Δ HU $4,8 \times 10^2$ CFU/myš, FSC200/Gp46 $1,4 \times 10^2$ CFU/myš. Jednotlivé skupiny infikovaných myší byly sledovány po dobu 21 dní, během této doby byla zaznamenávána případná nemoc nebo úmrtí.

8 Výsledky

8.1 Syntéza částí genu *gp46*

Dle navržených oligonukleotidů (Tab. 2) byla provedena syntéza první a druhé části genu *gp46* pomocí overlap PCR s využitím enzymu *PfuUltra II* polymerázy. Následně byla úspěšnost PCR reakce ověřena metodou gelové elektroforézy. Jako referenční standard pro určení velikosti syntetizovaných částí (bp) byl použit HyperLadder™ 50 bp (Meridian BIOSCIENCE) (na Obr. 7 znázorněn vlevo, v gelu první pozice). Na Obr. 7 můžeme pozorovat přítomnost PCR produktů odpovídajících první i druhé části genu *gp46*, tzn., že syntéza byla úspěšná. Velikost 1. části genu *gp46* je cca 140 bp a délka 2. části genu *gp46* je přibližně 170 bp.



Obr. 7 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření PCR reakce 1. a 2. části *gp46*

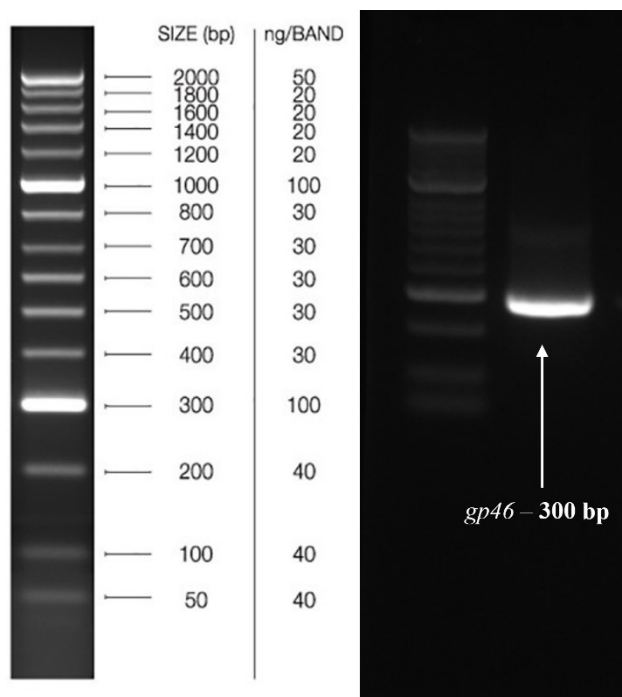
Koncentrace fragmentů izolovaných z agarózového gelu byla změřena na spektrofotometru NanoPhotometer od firmy Implen oproti blanku (destilovaná voda). Hodnoty koncentrací jsou uvedeny v Tab. 19.

Tab. 19 – Koncentrace DNA fragmentů odpovídajících 1. a 2. části genu *gp46*

Izolovaný fragment	Koncentrace [ng/μl]
1. část <i>gp46</i>	37,0
2. část <i>gp46</i>	44,5

8.2 Syntéza celého genu *gp46*

Fragmenty kódující první a druhou část genu *gp46* byly v poměru 1:1 použity jako templát pro overlap PCR. Produkt reakce byl separován pomocí gelové elektroforézy. Jako referenční standard byl opět použit HyperLadder™ 50 bp (na Obr. 8 znázorněn vlevo, v gelu první pozice). Na Obr. 8 je patrná přítomnost PCR produktu a jeho velikost odpovídá přibližně 300 bp, což znamená, že jsme potvrdili úspěšnou syntézu výsledného *gp46*.



Obr. 8 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření PCR amplifikace celého genu *gp46*

Na spektrofotometru NanoPhotometer byla změřena koncentrace DNA genu *gp46* izolovaného z gelu. Její hodnota je zaznamenána v Tab. 20.

Tab. 20 – Koncentrace DNA genu *gp46*

Izolovaný fragment	Koncentrace [ng/μl]
<i>gp46</i>	34,5

8.3 Izolace plazmidové DNA

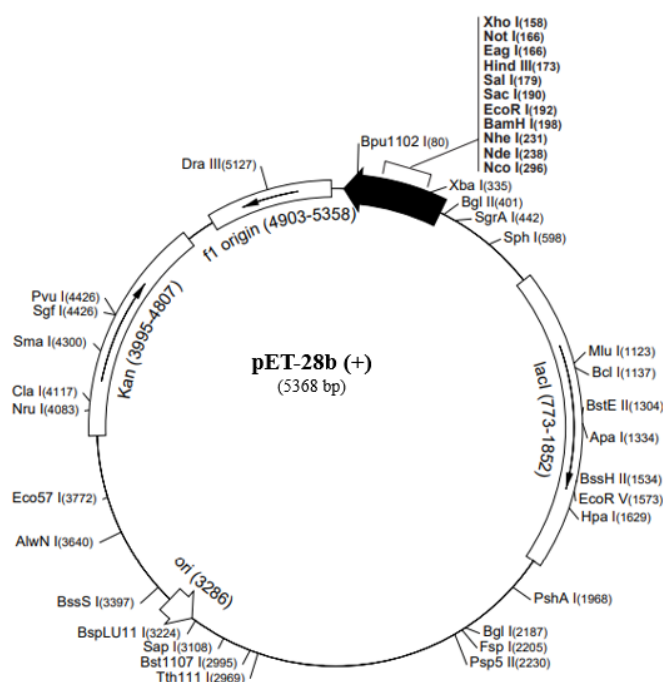
Pro další fáze experimentu bylo třeba izolovat plazmid pET-28b z kultury *E. coli* XL-1. Koncentrace izolované plazmidové DNA byla změřena na NanoPhotometer od firmy Implen a její hodnota je zaznamenána v Tab. 21.

Tab. 21 – Koncentrace plazmidové DNA pET-28b

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
Plazmidová DNA	170

8.4 Restriční štěpení plazmidu pET28b a gp46

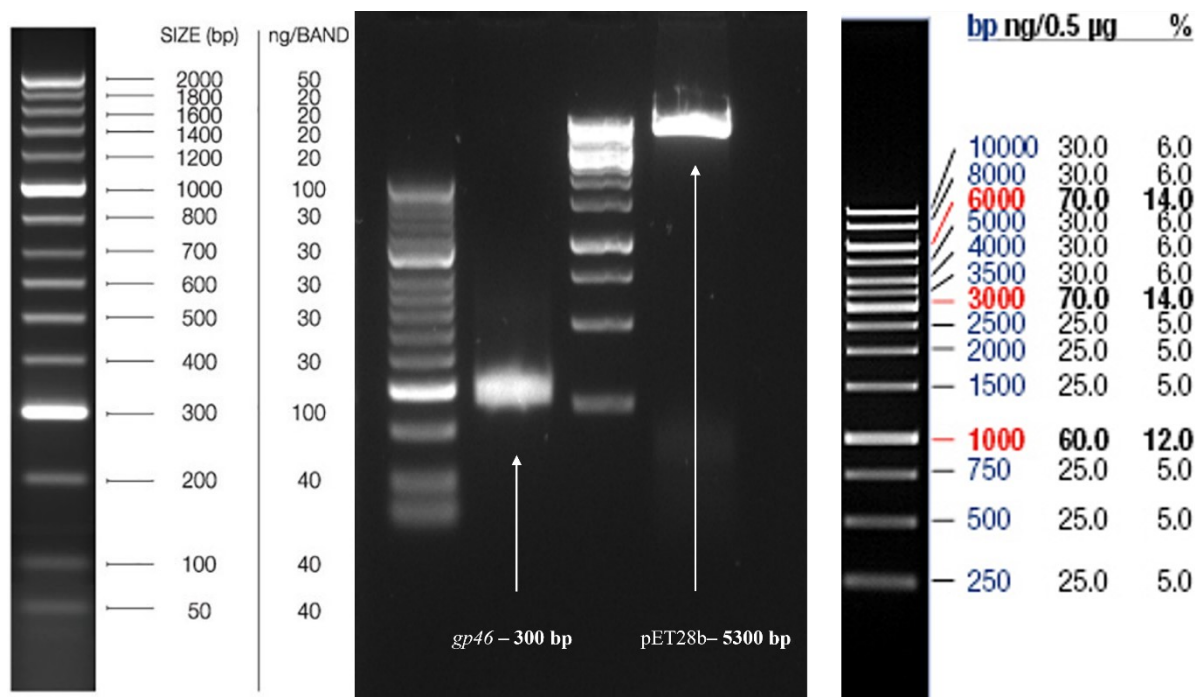
Na Obr. 9 je znázorněna mapa plazmidu pET-28b, včetně mnohočetného klonovacího místa, které lze využít pro klonování do plazmidu. V naší diplomové práci byly využity restriční enzymy *NcoI* a *XhoI*, které štěpí v oblastech 296 bp a 158 bp od replikačního počátku. Stejně restriční enzymy byly použity pro opracování fragmentu genu *gp46*.



Obr. 9 – Schématická mapa plazmidu pET-28b (+) o velikosti 5368 bp

Po skončení restričního štěpení byla provedena gelová elektroforéza s využitím referenčních standardů HyperLadder™ 50 bp (na Obr. 10 znázorněn vlevo, v gelu první pozice) a GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (na Obr. 10 znázorněn vpravo, v gelu třetí pozice). Na Obr. 10 můžeme pozorovat pozitivní výsledek restriktce. DNA odpovídající genu *gp46* o délce cca 300 bp a DNA odpovídající linearizovanému plazmidu pET-28b o velikosti přibližně 5300 bp. Produkty restričního štěpení správné délky byly izolovány z gelu a následně byla

spektrofotometricky změřena jejich koncentrace. Hodnoty koncentrací jsou zaznamenány v Tab. 22.



Obr. 10 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření délky fragmentů získaných restrikčním štěpením

Tab. 22 – Koncentrace izolovaných DNA fragmentů (*gp46* a pET28b)

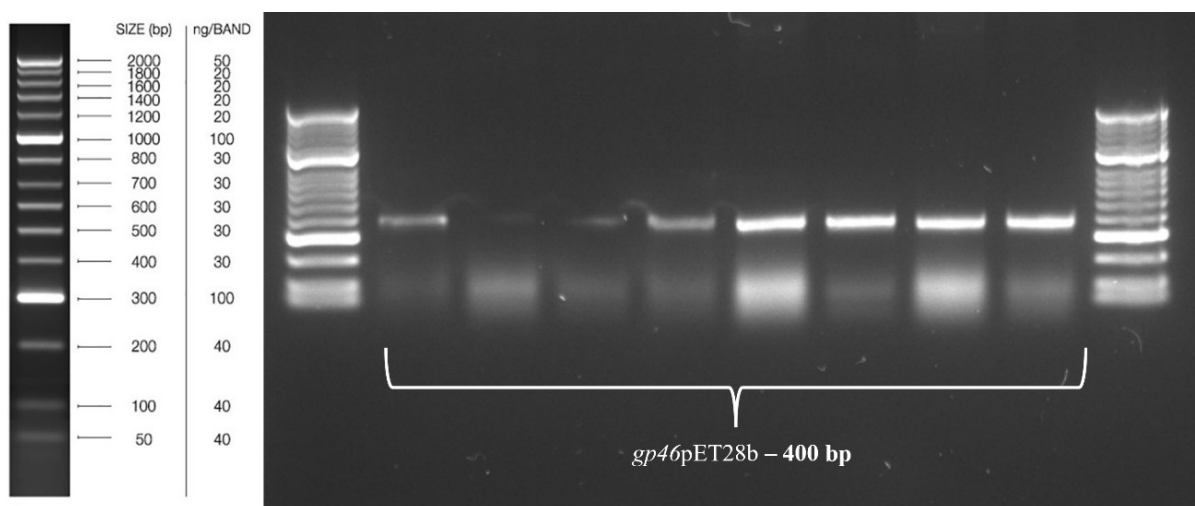
Izolovaný DNA fragment	Koncentrace [ng/µl]
<i>gp46</i>	20,5
pET-28b	18,5

8.5 Klonování *gp46* do vektoru

Izolované fragmenty byly použity pro ligační reakci v poměru inzerť:vektor = 3:1 a ligační směs byla použita pro transformaci chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10. Ověření správného zaklonování bylo provedeno metodou PCR na koloniích s využitím oligonukleotidu komplementárního k sekvenci plazmidu (T7 promoter primer) a oligonukleotidu komplementárního k sekvenci genu *gp46* (rGp46_Rev2_HA_XhoI). Pro testování bylo náhodně vybráno 8 izolovaných bakteriálních kolonií. Produkty reakce byly separovány v agarózovém gelu a DNA byla zviditelněna (očekávaný produkt délky cca 400 bp – gen *gp46* + část sekvence plazmidu pET-28b). Z Obr. 11 je patrné, že klonování bylo úspěšné, a že většina

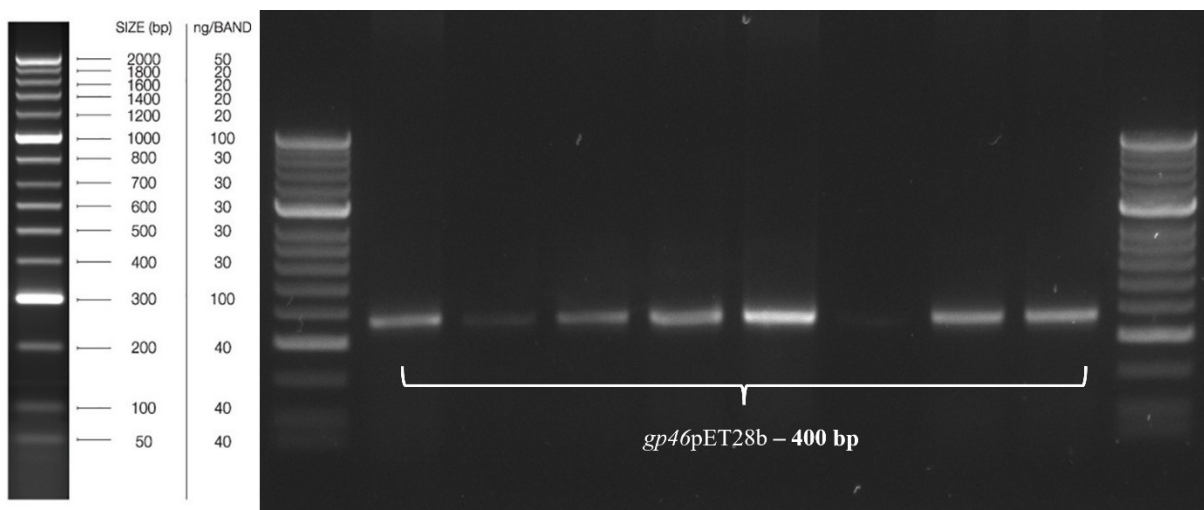
testovaných kolonií *E. coli* TOP10 obsahuje inzert, tedy plazmid pET-28b s genem *gp46* (standard – HyperLadder™ 50 bp).

Vektor *gp46pET28b* byl z bakteriální kolonie č. 8 vyizolován a správnost sekvence byla potvrzena ve Středisku sekvenování DNA v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v.v.i., abychom měli jistotu, že nedošlo k žádným mutacím, které by mohly ovlivnit další fáze experimentu.



Obr. 11 – Elektroforetické ověření délky produktů PCR na koloniích (klonování *gp46pET-28b* do *E. coli* TOP10)

Plazmid *gp46pET28b* byl dále využit pro transformaci expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3). Ověření správného zaklonování bylo provedeno opět pomocí PCR na koloniích za použití stejného páru primerů (očekávaný produkt délky cca 400 bp – gen *gp46* + část sekvence plazmidu pET-28b) s následnou vizualizací metodou gelové elektroforézy. Na Obr. 12 můžeme pozorovat DNA fragment o velikosti cca 400 bp, což potvrzuje úspěšné zaklonování *gp46pET28b* do *E. coli* BL21 (DE3).



Obr. 12 – Elektroforetické ověření délky produktů PCR na koloniích (klonování *gp46pET-28b* do *E. coli* BL21 (DE3))

8.6 Purifikace Gp46 z *E. coli*

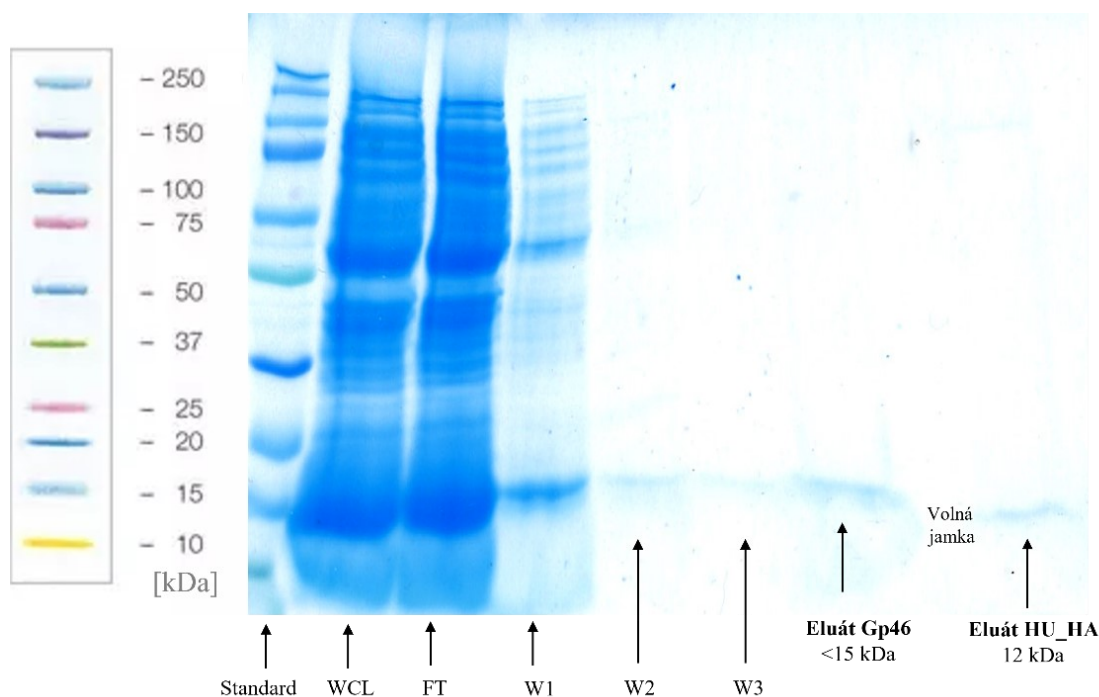
Bakteriální kultura *E. coli* BL21 (DE3) s vloženým plazmidem *gp46pET-28b* byla použita pro indukci produkce proteinu Gp46 (fúzaného s HA kotvou) a jeho následnou purifikaci pomocí agarózových kuliček nesoucích protilátku proti HA epitopu. Všechny frakce získané během purifikace byly uchovány. Následně byla změřena koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích (Tab. 23) pomocí soupravy Qubit™ Protein Assay Kit, 100 Assays od firmy Invitrogen s využitím kalibrační křivky (tvořená řadou standardů od výrobce). Výsledný objem měřených vzorků musel být 200 μ l, přesné poměry pipetovaných reagentů do směsi jsou zaznamenány v Tab. 23, výsledné hodnoty koncentrací jsou uvedeny tamtéž.

Tab. 23 – Pipetované objemy a změřené koncentrace purifikovaných proteinů a frakcí

Název vzorku	Objem [μ l]		Výsledná koncentrace [μ g/ μ l]
	Qubit working solution	Vzorek	
FT	199	1	> 5 mg/ml
Wash 1 (TBS-T 0,05%)	199	1	1,9800
Wash 2 TBS-T 0,05%)	195	5	0,4640
Wash 3 TBS-T 0,05%)	195	5	0,3240
Eluční frakce (3 M NaSCN)	199	1	0,79

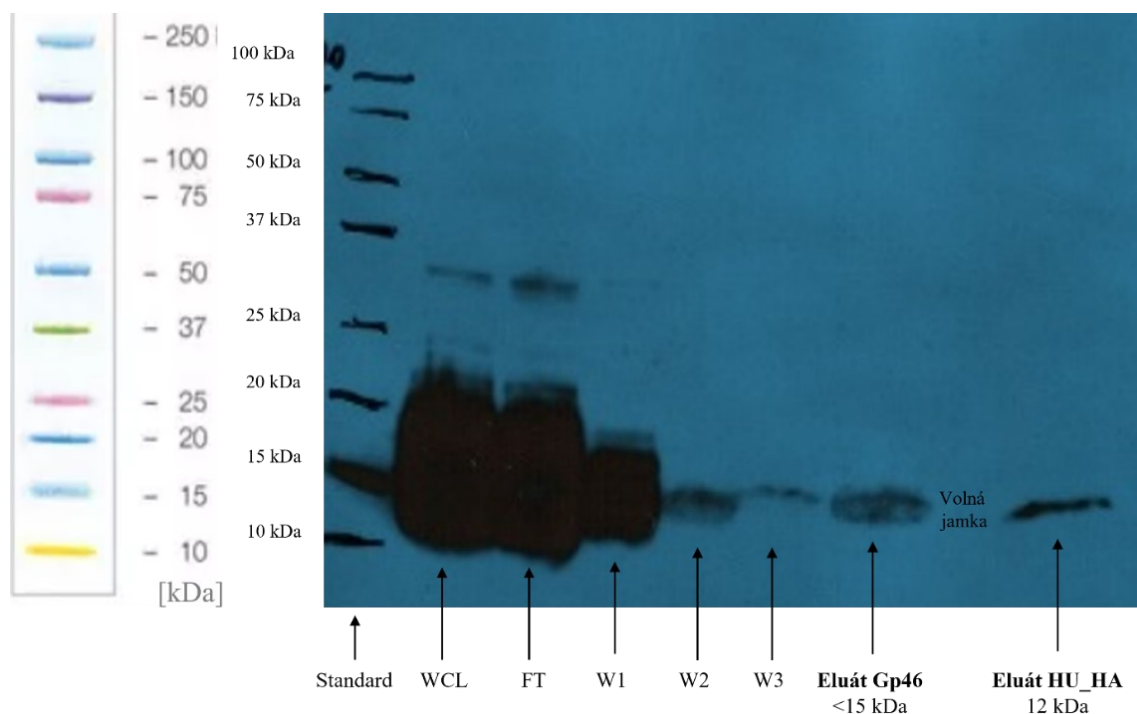
8.7 SDS-PAGE, western blot a imunodetekce

Z jednotlivých frakcí byly připraveny vzorky pro kontrolní SDS-polyakrylamidovou elektroforézu (Standard Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, Bio-Rad – na Obr. 13 znázorněn vlevo). Separace proteinů v gelu potvrdila, že došlo k expresi proteinu Gp46 (Obr. 13). Dále můžeme pozorovat, že izolovaný protein Gp46 je poměrně čistý a jeho molekulová velikost odpovídá předpokládané hmotě pod 15 kDa. Na stejný polyakrylamidový gel byl nanesen i vzorek eluovaného HU_HA proteinu, jehož purifikace probíhala stejným způsobem. Z dřívějších experimentů v laboratoři bylo zřejmé, že HU_HA protein je purifikován čistý s molekulovou hmotou cca 12 kDa (z tohoto důvodu nejsou na gel nanášeny všechny frakce získané během purifikace). Pro zobrazení proteinů byl gel po elektroforetické separaci obarven koloidním modřením pomocí soupravy NOVEX Colloidal Blue Staining. Jako druhý kontrolní krok byla provedena chemiluminiscenční imunodetekce separovaných frakcí pomocí protilátky namířené proti HA epitopu, se kterým byly oba proteiny fúzovány. Výsledek imunodetekce je zaznamenán na Obr. 14 a lze pozorovat obdobný výsledek jako při koloidním modření.



Obr. 13 – SDS-PAGE elektroforéza obarvená koloidním modřením

(WCL – celobuněčný lyzát; FT - proteklá frakce; W1-3 – promývací frakce)

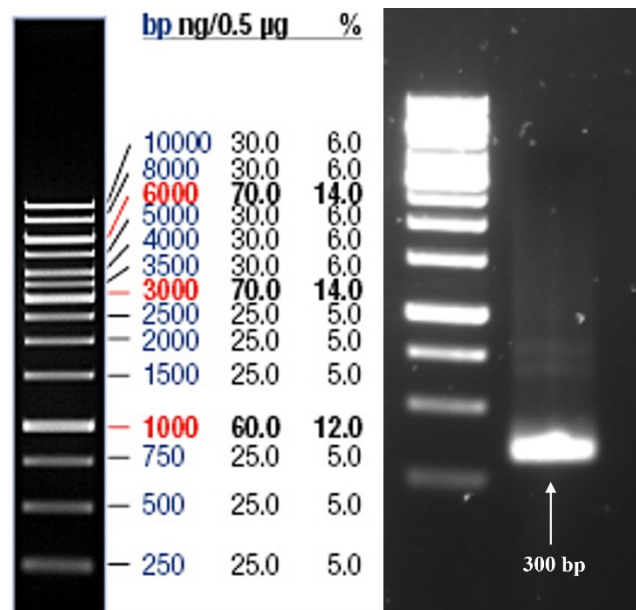


Obr. 14 – Imunodetekce purifikovaných proteinů a jednotlivých frakcí (RTG film)

(WCL – celobuněčný lyzát; FT - proteklá frakce; W1-3 – promývací frakce)

8.8 EMSA

Dalším krokem bylo ověření hypotézy, zda protein Gp46 inhibuje DNA vazebnou aktivitu HU_HA proteinu na modelu *F. tularensis*. Již dříve bylo v laboratoři metodou EMSA zjištěno, že se HU_HA protein silně váže k DNA kódující oblast před *pigR* genem (označena jako *pigR* promotor) a i k DNA kódující samotný *pigR* gen. Této skutečnosti bylo využito během testování vazby HU_HA proteinu k této DNA v přítomnosti proteinu Gp46. Nejprve bylo cílovou DNA sekvencí amplifikovat pomocí PCR. Poté byl PCR produkt pomocí elektroforézy separován, fragment z gelu izolován a použit pro EMSA experiment. Na Obr. 15 lze pozorovat, že amplifikovaná DNA odpovídá očekávané délce produktu *pigR* genu cca 300 bp (standard – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder – Obr. 15 vlevo).



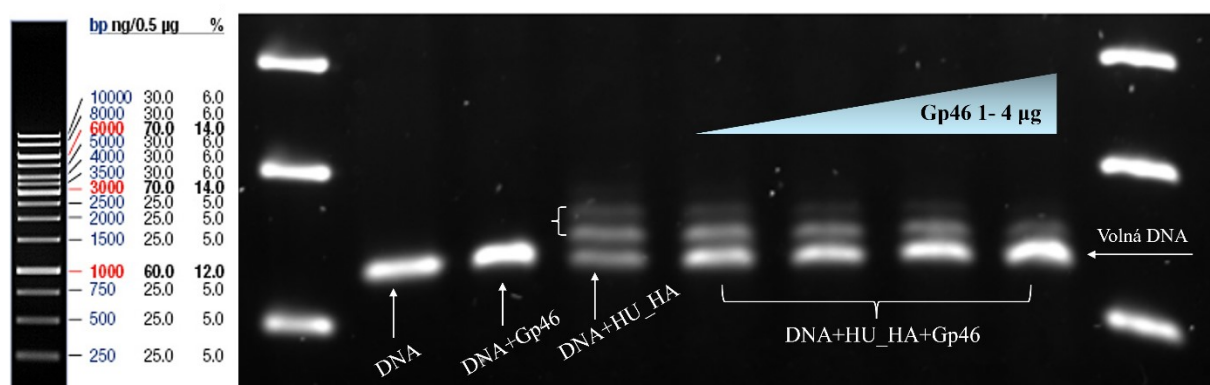
Obr. 15 – Elektroforetická separace PCR reakce (DNA kódující *pigR* gen)

Z prvotních experimentů se zdálo, že protein Gp46 žádným způsobem neovlivňuje vazbu HU_HA proteinu k cílové DNA (neuveďeno). Možným vysvětlením bylo, že protein Gp46 není funkční v prostředí s velkou iontovou silou (jako eluční pufr byl použit 3 M NaSCN). Z tohoto důvodu byl protein Gp46 převeden do jiného pufru (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl), což se na aktivitě ale také neprojevovalo. Dále byla provedena iontově-výměnná chromatografie s využitím DEAE Support částic, aby byla ošetřena i případná vazba Gp46 na HU protein *E. coli* BL21 (DE3), ze kterých byl protein Gp46 purifikován. Pomocí SDS – polyakrylamidové elektroforézy bylo zjištěno, že k uvolnění proteinu Gp46 z DEAE částic dochází v pufru 4 (400 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl) (neuveďeno), tato frakce pak byla používána do dalších experimentů. Frakce získané promytím částic pomocí pufrů 5 a 6 obsahovaly kromě proteinu Gp46 i další protein podobné velikosti, pravděpodobně HU protein z *E. coli*. Frakce, která obsahovala čistý Gp46 protein, byla opět převedena do pufru o složení 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl. Po tomto kroku byla proměřena koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích (Tab. 24) a byly připraveny vzorky pro nový EMSA experiment. Přechištěný protein Gp46 byl v různých koncentracích (1-4 µg) přidán do reakce s DNA kódující *pigR* gen a DNA vazebným HU_HA proteinem (Obr. 16).

Tab. 24 – Objemy a koncentrace frakcí po iontově-výměnné chromatografii pro EMSA

Název vzorku	Objem [μl]		Výsledná koncentrace [μg/μl]
	Qubit working solution	Vzorek	
FT2	190	10	0,0680
Pufř 2 (100 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)	190	10	0,0968
Pufř 3 (200 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)	190	10	0,0816
Gp46 v pufřu 4 (400 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)	199	1	0,2960
Pufř 5 (750 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)	199	1	0,5040
Pufř 6 (1 M Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)	199	1	0,6200

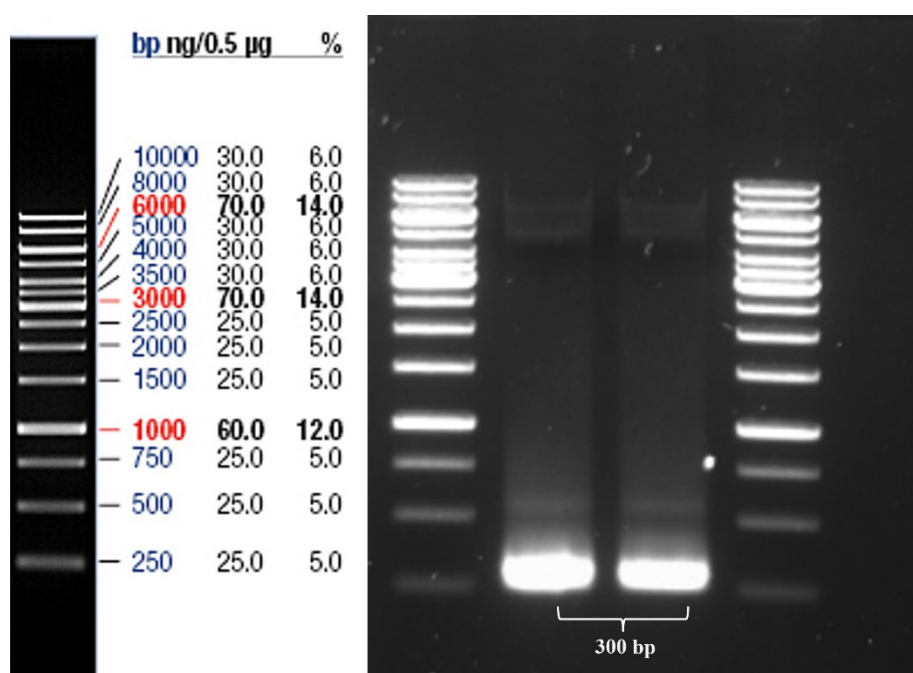
Na Obr. 16 můžeme pozorovat výsledek EMSA experimentu. V jamce č. 2 byl nanesen vzorek obsahující pouze DNA. V jamce DNA+Gp46 máme důkaz o tom, že protein Gp46 se sám o sobě na DNA neváže a žádným způsobem neovlivňuje mobilitu DNA v gelu. V jamce č. 4 je nanesen vzorek sloužící jako pozitivní kontrola (DNA+HU_HA), kde můžeme pozorovat tvorbu DNA-HU_HA proteinových komplexů (na obrázku dva horní bandy – označeny svorkou). V jamkách č. 5 – 8 (DNA+HU_HA+Gp46) pozorujeme zřetelné vytěšňování DNA z komplexu s HU_HA proteinem způsobené přítomností proteinu Gp46. Je viditelné, že se zvyšující se koncentrací Gp46 se snižuje množství komplexů DNA+HU_HA a zvyšuje se množství volné DNA. Z toho vyplývá, že Gp46 vytěšňuje DNA z vazby s HU_HA proteinem a lze říct, že Gp46 inhibuje DNA vazebnou aktivitu HU_HA proteinu u bakterie *F. tularensis* *in vitro*.



Obr. 16 – Výsledek EMSA experimentu

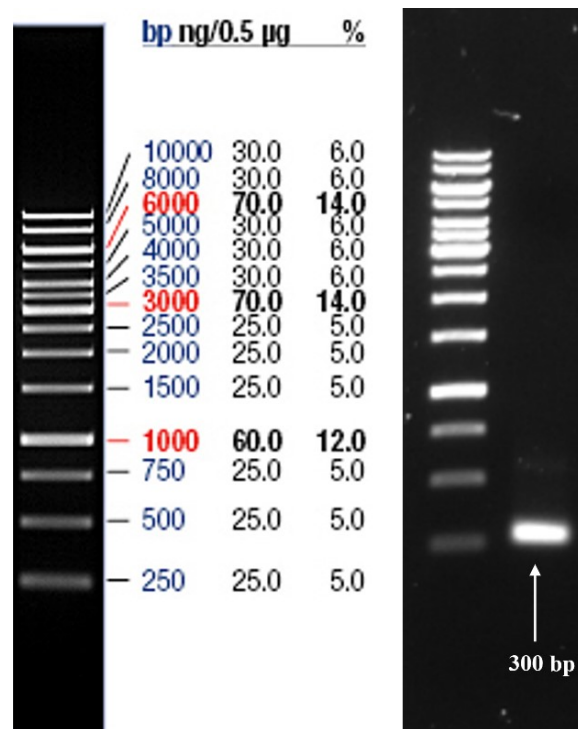
8.9 Klonování *gp46* do *F. tularensis*

V další fázi experimentální práce bylo ověřováno, zda protein Gp46 funguje jako inhibitor HU proteinu *F. tularensis* *in vivo*. Z tohoto důvodu bylo nutné připravit kmen *F. tularensis*, který by exprimoval protein Gp46. Nejprve byly navrženy nové primery pro amplifikaci genu *gp46* (Tab. 12), tak aby výsledný DNA fragment mohl být opracován restriktaázami *NdeI* a *SacI*-HF a následně vložen do tzv. shuttle vektoru pKK289KmGFP místo genu *gfp*. Obr. 17 ukazuje úspěšně provedenou PCR reakci genu *gp46*. Velikost PCR produktu odpovídala cca 300 bp, což koresponduje s velikostí *gp46* genu (standard – GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder). Koncentrace izolovaného PCR produktu činila 115 ng/ul (spektrofotometricky změřena).

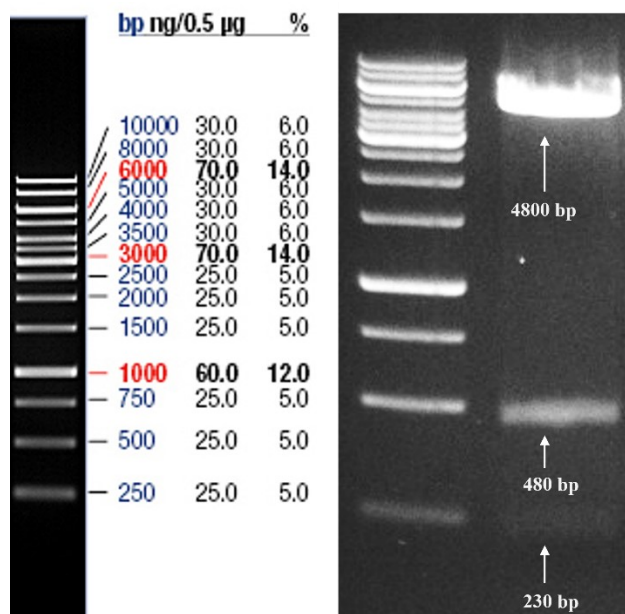


Obr. 17 – PCR reakce genu *gp46* pro klonování do shuttle vektoru pKK289Km

Izolované fragmenty DNA (*gp46* a plazmid pKK289KmGFP) byly dále opracovány restriktaázami *NdeI* a *SacI*-HF. Obr. 18 ukazuje produkt reakce o velikosti cca 300 bp, tj. *gp46* po restrikci. Na Obr. 19 můžeme pozorovat výsledek restrikce plazmidu pKK289KmGFP, který dané restriktaázy štěpí na 3 fragmenty o délce cca 230 bp (na Obr. 19 je vidět pouze slabě), 480 bp a 4800 bp. První dva štěpy odpovídají genu *gfp* a třetí nejdelší linearizovanému plazmidu, do kterého můžeme ligací vložit náš inzert. Na spektrofotometru byla změřena koncentrace restrikčních fragmentů, jejich hodnota je zaznamenána v Tab. 25.



Obr. 18 – *gp46* po restrikci

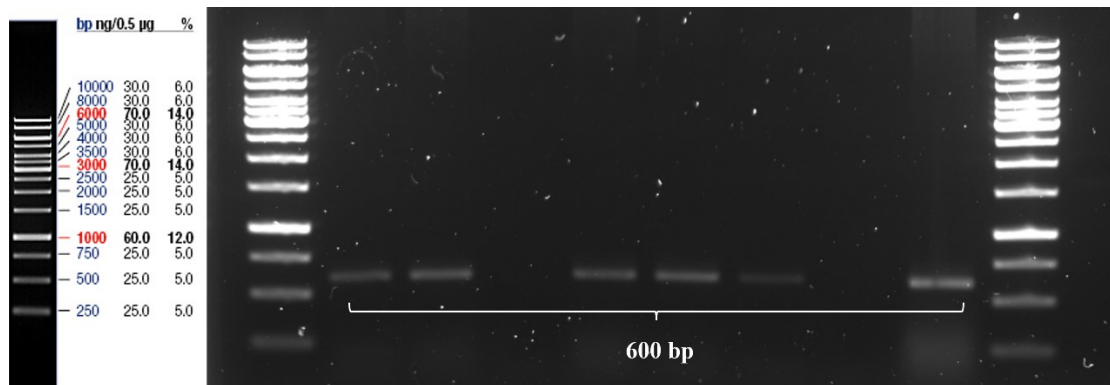


Obr. 19 – pKK289KmGFP po restrikci

Tab. 25 – Koncentrace DNA fragmentů po restrikci

PCR produkt	Koncentrace [ng/µl]
<i>gp46</i>	44
pKK289Km	30,5

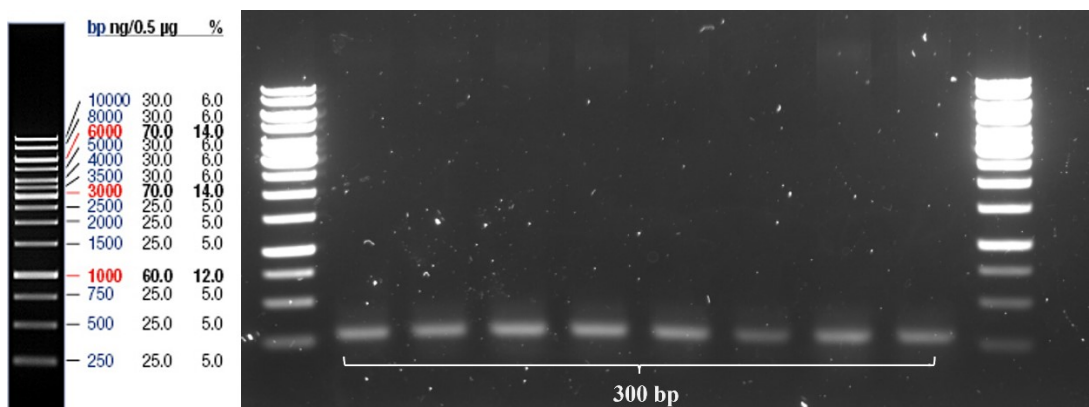
Izolované fragmenty byly použity pro ligační reakci v poměru inzerť:vektor = 3:1 a ligační směs byla použita pro transformaci chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10. Získaní transformanti byli testováni pomocí PCR na koloniích (Obr. 20) s využitím primerů komplementárních k sekvenci plazmidu (očekávaný fragment při pozitivním výsledku cca 600 bp). Dále byl z jedné pozitivní kolonie izolován plazmid *gp46pKK289Km*, jehož sekvence byla ověřena metodou sekvenování.



Obr. 20 – PCR na koloniích *E. coli* TOP10

8.10 Elektroporace

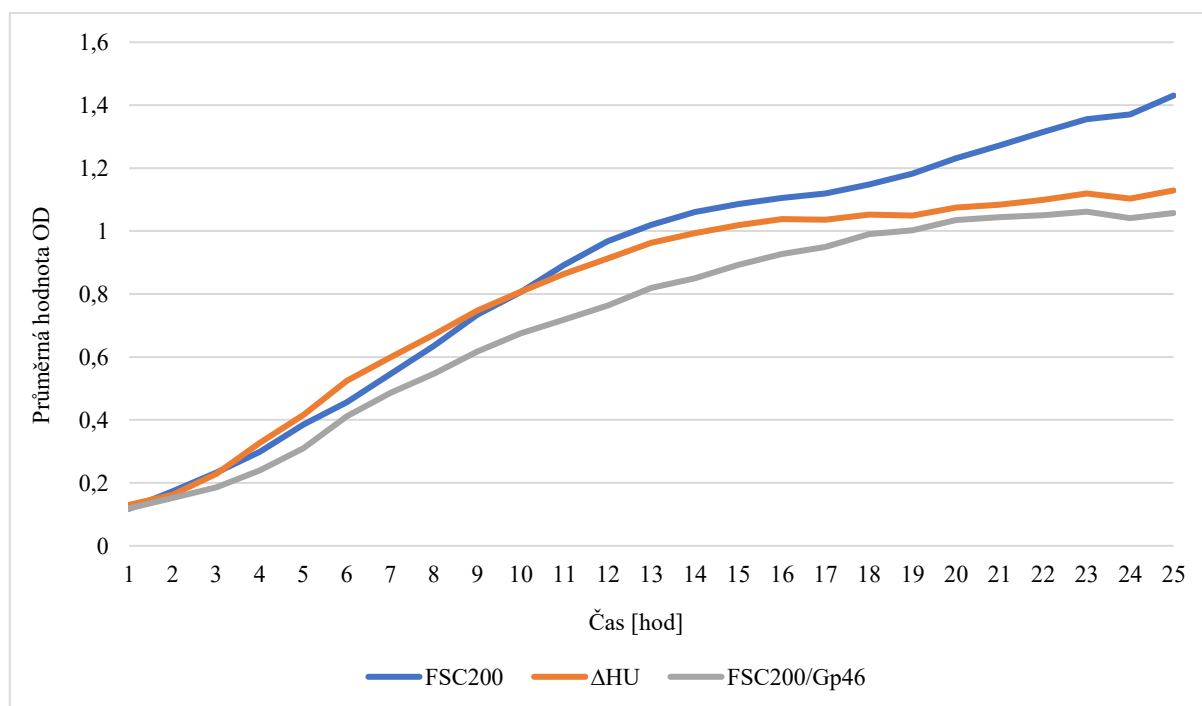
Plazmid *gp46pKK289Km* byl poté vložen do elektrokompetentních buněk *F. tularensis* FSC200 pomocí elektroporace. Úspěšnost elektroporace byla otestována metodou PCR na koloniích s následným zviditelněním pomocí elektroforézy (primery použité pro reakci jsou komplementární k sekvenci *gp46*). Na Obr. 21 můžeme pozorovat velikost testovaných fragmentů o délce cca 300 bp. Z jedné pozitivní kolonie byly vytvořeny zásobní konzervy mutantního kmene, který byl označen *F. tularensis* FSC200/Gp46.



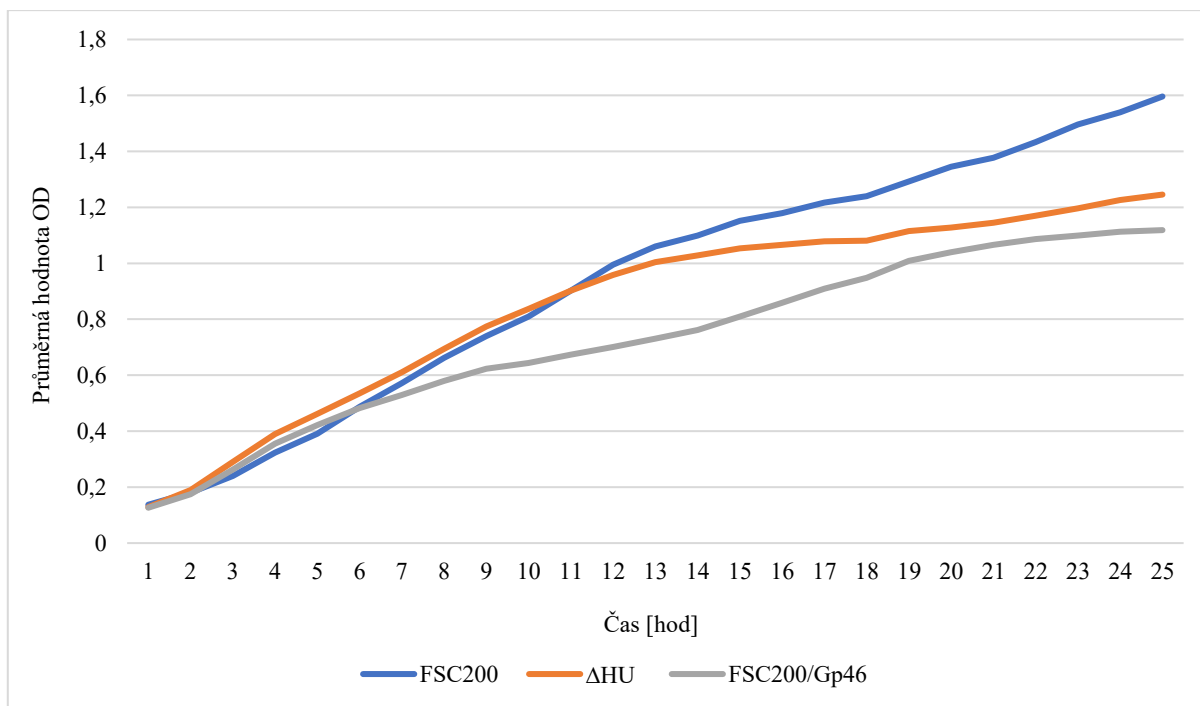
Obr. 21 – PCR na koloniích *F. tularensis* pro ověření úspěšnosti elektroporace

8.11 Růstové křivky

Nejprve bylo testováno, zda se exprese Gp46 projeví na růstové rychlosti *F. tularensis* FSC200. Byl porovnáván růst nově vytvořeného mutantního kmene FSC200/Gp46 s růstem divokého kmene FSC200 a delečního mutantního kmene FSC200/ Δ HU. Z grafů růstových křivek (Obr. 22 a 23) jasně vyplývá, že růst kmene FSC200/Gp46 se liší od růstu divokého kmene FSC200 a připomíná růst kmene FSC200/ Δ HU. Tento fakt podporuje naši hypotézu a naznačuje, že protein Gp46 blokuje funkci HU proteinu, tudíž fenotyp kmene FSC200/Gp46 připomíná fenotyp kmene FSC200/ Δ HU. Dodatečně byl kolegy v laboratoři testován růst kmene FSC200, který nesl plazmid pKK289KmGFP. Bylo potvrzeno, že změna růstu kmene FSC200/Gp46 nesouvisí s kultivací v přítomnosti kanamycinu, jehož rezistenci plazmid pKK289KmGFP/*gp46*pKK29Km kóduje (neuveďeno) (Spidlova et al., 2023).



Obr. 22 – Růstové křivky 1



Obr. 23 – Růstové křivky 2

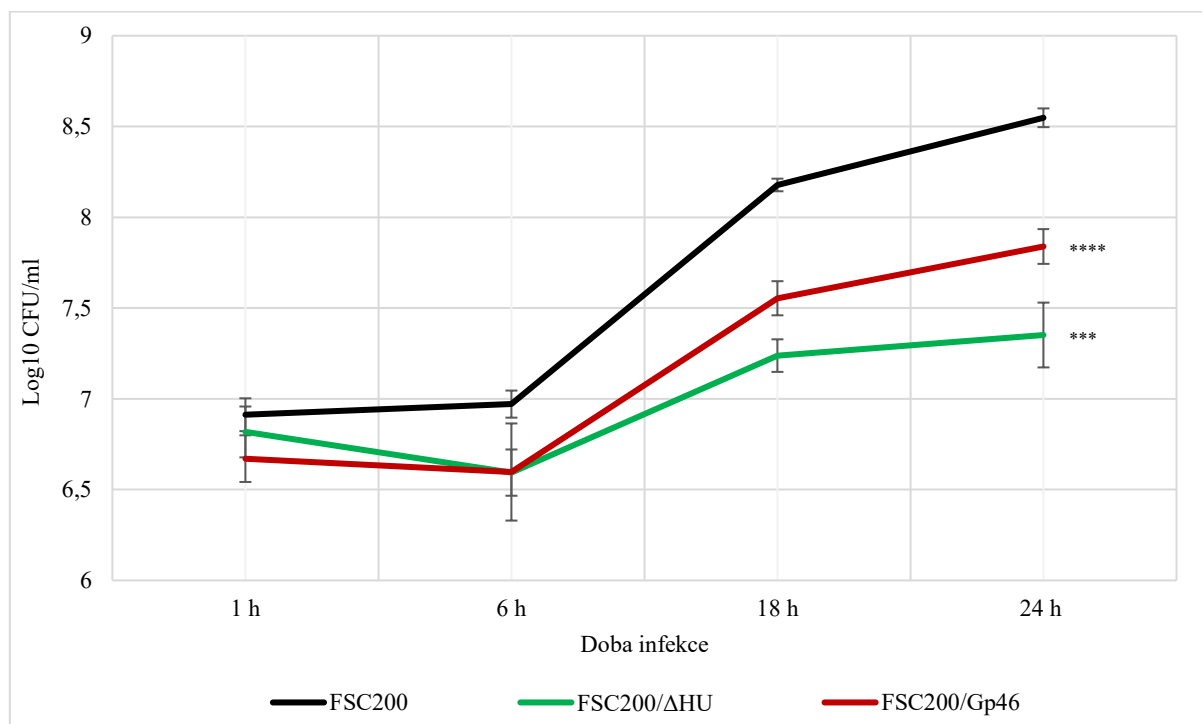
8.12 Proliferace v BMMs

Dalším experimentem, který měl otestovat vliv proteinu Gp46 na funkci HU proteinu *F. tularensis*, bylo ověření schopnosti testovaných kmenů *F. tularensis* množit se v myších kostně-dřeňových makrofázích. Experiment byl proveden dvakrát, v diplomové práci jsou zaznamenány pouze průměrné hodnoty z obou experimentů. Infikované makrofágy byly ve zvolených časových intervalech lyzovány a lyzát byl v daných ředěních vyšetřován na McLeod plotny. Po pěti dnech byl proveden odečet CFU (tzn. počtu narostlých kolonií). Výsledné odečty CFU byly dále zpracovány v programu MS Excel následujícím způsobem: hodnoty průměrného počtu CFU byly přepočteny na 1 ml neředěné suspenze, logaritmovány a logaritmické hodnoty zprůměrovány (Tab. 26). Z těchto výsledných hodnot byl vytvořen graf pro porovnání proliferace FSC200, FSC200/ΔHU a FSC200/Gp46.

Tab. 26 – Průměr logaritmů CFU z obou experimentů

Čas odběru CFU	FSC200	FSC200/ΔHU	FSC200/Gp46 KAN rezistentní
	Průměrný logaritmus CFU		
1 hod	6,9127	6,8178	6,6708
6 hod	6,9710	6,5938	6,5971
18 hod	8,1781	7,2383	7,5542
24 hod	8,5482	7,3517	7,8392

V grafu (Obr. 24) můžeme pozorovat již po 1 hodině sníženou hodnotu CFU u kmene FSC200/Gp46 oproti divokému kmeni FSC200. V časových intervalech 6, 18 a 24 hodin po infekci se tento trend opakuje. Na základě toho můžeme konstatovat, že Gp46 negativně ovlivňuje proliferaci FSC200 v myších makrofázích. Z grafu je vidět, že kmen FSC200/Gp46 se množí v kostně-dřeňových makrofázích obdobně jako kmen FSC200/ Δ HU a proliferace obou mutantních kmenů je signifikantně odlišná oproti divokému kmeni FSC200. Tato data potvrzují naši hypotézu, že protein Gp46 inhibuje HU protein *F. tularensis* a signifikantně zpomaluje proliferaci kmene FSC200/Gp46 v myších kostně-dřeňových makrofázích.



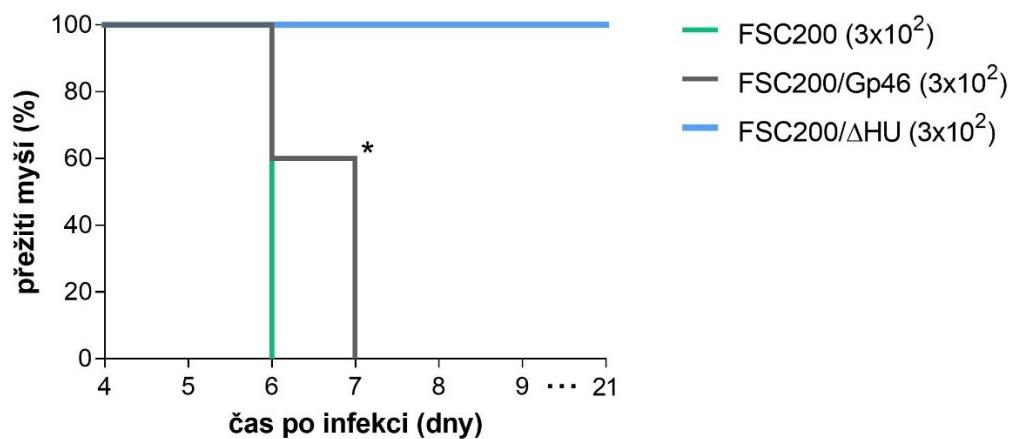
Obr. 24 – Proliferace kmenů *F. tularensis* uvnitř myších kostně-dřeňových makrofágů – průměrná data ze dvou experimentů
($p < 0,001$ ***, $p < 0,0001$ ****)

8.13 Infekce myši BALB/c

Posledním experimentem, který testoval vliv proteinu Gp46 na funkci HU proteinu *F. tularensis*, byla *in vivo* infekce na modelu myši typu BALB/c. Z dřívějších výsledků laboratoře vyplývá, že kmen s delecí genu kódujícího HU protein je oslaben a nevyvolává u myši onemocnění. Předpokládali jsme, že vlivem působení inhibitoru Gp46 by i kmen FSC200/Gp46 mohl být atenuován. Myši byly sledovány po dobu 21 dní a následně bylo

v programu GraphPad Prism 10 provedeno grafické a statistické vyhodnocení experimentu (Obr. 25).

Z grafu (Obr. 25) vyplývá, že 100 % myši infikovaných kmenem FSC200/ Δ HU přežilo. Všechny myši infikované kmenem FSC200 uhynuly 6. den po infekci. 40 % myši infikovaných kmenem FSC200/Gp46 uhynulo taktéž 6. den po infekci, zbylých 60 % uhynulo 7. den po infekci. Ačkoliv se jedná pouze o jednodenní posun v úhynu a pouze u 60% testovaných myší, přesto jde o signifikantní změnu (v Obr. 25 znázorněno *, $p < 0,05$).



Obr. 25 – Přežití infikovaných myší BALB/c

9 Diskuze

F. tularensis je intracelulární patogen způsobující tularémii. Jedná se o vysoce infekční onemocnění, které může představovat velké bezpečnostní riziko. Z tohoto důvodu je nutné, co nejlépe pochopit mechanismus infekce a detailně popsat bakteriální faktory virulence. V posledních letech zájem o studium *F. tularensis* roste a v současné době je popsána již celá řada mechanismů virulence (Degabriel et al., 2023). Velkým průlomem bylo objevení genomové oblasti označované jako tzv. ostrov patogenity, která kóduje významné geny nezbytné pro intracelulární růst a virulenci *F. tularensis*. V poslední době se do popředí dostala role dalšího virulenčního faktoru – HU proteinu. Jedná se o DNA vazebný protein, který má vliv na širokou škálu buněčných molekulárních procesů. Bylo prokázáno, že delece genu kódujícího HU protein vede k oslabení virulence bakterie (Stojkova et al., 2018). Obecně HU proteiny jsou vysoce konzervované a přítomné u všech bakterií, včetně *F. tularensis*. Studium inhibice HU proteinu *F. tularensis* se stalo hlavním předmětem této diplomové práce. Nedávno bylo publikováno (Zhang et al., 2022), že protein Gp46 bakteriofága SPO1 ovlivňuje HU protein *B. subtilis* a autoři vyslovili ideu, že by Gp46 mohl fungovat jako univerzální inhibitor všech HU proteinů. V této diplomové práci jsme testovali univerzálnost proteinu Gp46 na modelu HU proteinu *F. tularensis*. Experimentální výsledky předkládané práce byly otisknuty ve vědeckém časopise *Frontiers in Microbiology* s Impact faktorem 5,2 (Spidlova et al., 2023).

Nejprve jsme testovali, zda přítomnost proteinu Gp46 ovlivní schopnost HU proteinu *F. tularensis* tvořit DNA-proteinové komplexy. Již dříve bylo prokázáno (Pavlik, Spidlova, 2022), že HU protein *F. tularensis* váže DNA kódující *pigR* gen. Tohoto faktu jsme chtěli využít a testovat DNA vazebnou aktivitu HU proteinu s *pigR* genem v přítomnosti proteinu Gp46 metodou EMSA. Zpočátku se zdálo, že Gp46 nikterak neovlivňuje vazbu HU_HA proteinu k cílové DNA. Možným vysvětlením mohlo být, že jsme do reakce přidávali Gp46 eluovaný pufrům o vysoké iontové síle (3 M NaSCN), čímž jsme způsobili nefunkčnost proteinu. Zhang et al. (2022) ve své práci popsali, že pokud použili v EMSA reakci pufr o vysoké koncentraci soli (300 mM NaCl), tak nedocházelo k tvorbě komplexu HU protein *B. subtilis* + Gp46. Reakci jsme tedy zopakovali s tím, že jsme oba proteiny (Gp46 i HU_HA) převedli do pufru s nižší iontovou silou, nicméně ani toto řešení nebylo účinné. Jak už bylo v této práci několikrát zmíněno, HU proteiny jsou přítomné u všech bakterií, tedy i u bakterií *E. coli* BL21 (DE3), ze kterých byl protein Gp46 purifikován. Předpokládali jsme, že během purifikace z expresních *E. coli* BL21 (DE3) mohlo dojít k vazbě Gp46 na HU protein, což by znamenalo, že protein

Gp46 je již vázán v komplexu s HU proteinem *E. coli* a není tak schopen vytvořit komplex s HU proteinem *F. tularensis* a vytěsnit z komplexu DNA. Z tohoto důvodu jsme optimalizovali proces purifikace proteinu Gp46 a zařadili jako jeden z kroků iontově-výměnnou chromatografii, abychom byli schopni získat čistý protein Gp46. Tato optimalizace se ukázala jako účinná a metodou EMSA jsme úspěšně potvrdili inhibiční efekt proteinu Gp46 na DNA vazebnou aktivitu HU proteinu. Zjistili jsme, že přidání proteinu Gp46 vede k vytěsnění DNA kódující *pigR* gen z komplexu s HU proteinem (Obr. 16, Spidlova et. al., 2023). Tímto experimentem jsme potvrdili inhibiční účinek proteinu Gp46 na HU protein *F. tularensis in vitro*.

Dále nás zajímalo, jestli by bylo možné prokázat inhibiční účinek proteinu Gp46 na HU protein *F. tularensis* i v *in vivo* experimentech. Připravili jsme mutantní kmen *F. tularensis* FSC200 exprimující Gp46, jež byl kódován na plazmidu pKK289Km, což je tzv. shuttle vektor, který se replikuje jak v *E. coli*, tak i ve *F. tularensis*. Pokud by naše hypotéza byla správná, a protein Gp46 inhiboval funkci HU proteinu, očekávali jsme, že připravený mutantní kmen *F. tularensis* FSC200/Gp46 bude vykazovat fenotyp podobný kmenu s delecí genu *hupB* kódujícího HU protein FSC200/ Δ HU. Stojkova et al. (2018) popsali, že delece genu *hupB* vede k výrazné změně zastoupení produkovaných proteinů mutantního kmene, zejména snížení produkce FPI proteinů, což v konečném důsledku vede k oslabení mutantního kmene ve virulenci.

Nejprve jsme testovali růst nově vytvořeného mutantního kmene FSC200/Gp46 a porovnávali ho s růstem divokého kmene FSC200 a kmene s delecí genu kódujícího HU protein FSC200/ Δ HU, o kterých je známo, že rostou srovnatelně, nicméně deleční mutant vstupuje dříve do fáze stacionární (Stojkova et al., 2018). V našem experimentu jsme pozorovali, že kinetika růstu FSC200/Gp46 se velmi podobá kinetice FSC200/ Δ HU, což naznačuje, že exprese proteinu Gp46 inhibuje růst divokého kmene FSC200 obdobným způsobem jako delece genu kódujícího HU protein, což by podporovalo naši hypotézu. Nabízela se myšlenka, zdali není růst kmene FSC200/Gp46 ovlivněn přítomností kanamycinu v kultivačním médiu. Z toho důvodu byl kolegy z laboratoře dodatečně testován vliv antibiotika a bylo potvrzeno, že pomalejší kinetika růstu mutantního kmene FSC200/Gp46 nesouvisí s kultivací v přítomnosti kanamycinu (Spidlova et al., 2023).

Již dříve bylo prokázáno, že se deleční mutantní kmen FSC200/ Δ HU replikuje v myších kostně-dřeňových makrofázích méně účinně než kmen divokého typu (Stojkova et al., 2018).

Pokud by protein Gp46 blokoval správné fungování HU proteinu, očekávali jsme, že stejný fenotyp, tedy méně efektivní replikaci, budeme pozorovat i u kmene FSC200/Gp46. Právě makrofágy jsou v časném stádiu tularémie infikovány jako první, *F. tularensis* se uvnitř nich replikuje a obchází jejich obranné mechanismy. V našem experimentu jsme zjistili, že mutantní kmen FSC200/Gp46 se replikuje podobně jako deleční kmen FSC200/ Δ HU, a že jejich proliferace v myších makrofázích *in vitro* je statisticky významně oslabena oproti divokému kmeni FSC200. Tento výsledek je prvním důkazem, že protein Gp46 má schopnost negativně ovlivňovat intracelulární replikaci *F. tularensis*, což by potencionálně mohlo vést i ke snížení virulence (Spidlova et al., 2023).

Na základě těchto zjištění jsme předpokládali, že by protein Gp46 mohl snižovat životaschopnost *F. tularensis* na myším modelu tularémie. Pokud by protein Gp46 vedl k oslabení *F. tularensis in vivo*, do budoucna by se mohl použít jako terapeutická látka proti tularémii. U myší infikovaných delečním kmenem FSC200/ Δ HU jsme potvrdili předchozí výsledky (Stojkova et al., 2018) a dle očekávání celá skupina myší infekci tímto oslabeným kmenem přežila, na rozdíl od skupiny infikované divokým kmenem FSC200, kde jsme zaznamenali 100% úhyn 6. den po infekci. U vytvořeného mutantního kmene FSC200/Gp46 jsme předpokládali, že by se mohl chovat jako deleční kmen FSC200/ Δ HU. Avšak výsledek tento předpoklad nenaplnil. Ani jedna testovaná myš infekci kmenem FSC200/Gp46 nepřežila – 40 % uhynulo 6. den po infekci (stejně jako skupina myší infikovaných kmenem FSC200) a zbylých 60 % myší uhynulo 7. den po infekci (Spidlova et al., 2023). Přesto byl tento jednodenní posun v úhynu vyhodnocen jako statisticky významný ($p < 0,05$). Je možné, že lepších výsledků bychom dosáhli, pokud bychom připravili mutantní kmen *F. tularensis* kódující gen *gp46* přímo na chromozomu. V našem experimentálním uspořádání jsme nebyli schopni zajistit selekční tlak antibiotika po dobu *in vivo* experimentu, což mohlo vést k tomu, že *F. tularensis* přestala replikovat plazmid nesoucí gen *gp46*. Do budoucna je určitě zapotřebí vliv proteinu Gp46 na virulenci dále studovat, jelikož naše výsledky ukázaly potenciál proteinu Gp46 působit jako inhibitor HU proteinu i na modelu *F. tularensis*.

Závěrem lze konstatovat, že výsledky předkládané práce přispívají k myšlence, že by protein Gp46 mohl fungovat jako inhibitor HU proteinu i na modelu *F. tularensis*, a tak by mohla být potvrzena jeho inhibiční univerzálnost.

10 Závěr

Všechny dílčí cíle stanovené v této diplomové práci byly naplněny:

1. Úspěšně jsme složili a amplifikovali gen *gp46*.
2. Připravili jsme kmen *E. coli* BL21 (DE3) exprimující protein Gp46.
3. Na základně vhodně zvolené metodiky a podmínek jsme úspěšně izolovali protein Gp46 z buněk *E. coli* a protein HU_HA z *F. tularensis*.
4. Pomocí *in vitro* experimentu jsme potvrdili inhibiční účinek proteinu Gp46 na DNA vazebnou aktivitu HU proteinu bakterie *F. tularensis*, dále jsme pomocí *in vitro* a *in vivo* metod prokázali, že fenotyp kmene *F. tularensis* exprimujícího protein Gp46 připomíná fenotyp delečního mutančního kmene FSC200/ Δ HU, což naznačuje negativní dopad exprese Gp46 na funkci HU proteinu.

Výsledky této diplomové práce naznačují, že protein Gp46 bakteriofága SPO1 bakterie *Bacillus subtilis* by mohl sloužit jako univerzální inhibitor HU proteinů, což jsme potvrdili na modelu *Francisella tularensis*.

11 Seznam citované literatury

- 4WORKS SOLUTIONS, 2024. *LabGuide*. online. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/klonovani/>. [cit. 2024-03-17].
- BAREL, Monique; GRALL, Nathalie a CHARBIT, Alain, 2015. Pathogenesis of *Francisella tularensis* in Humans. In: *Human Emerging and Re-emerging Infections*. s. 555-566. ISBN 9781118644843. <https://doi.org/10.1002/9781118644843.ch29>.
- BARON, Gerald a NANO, Francis, 1998. MglA and MglB are required for the intramacrophage growth of *Francisella novicida*. *Molecular Microbiology*. roč. 29, č. 1, s. 247-259. ISSN 0950-382X. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00926.x>.
- BARRY, Eileen; COLE, Leah a SANTIAGO, Araceli, 2014. Vaccines against Tularemia. *Human Vaccines*. roč. 5, č. 12, s. 832-838. ISSN 1554-8600. <https://doi.org/10.4161/hv.10297>.
- BEDNÁŘ, Marek, 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- BEVANGER, L.; MAELAND, J. a KVAN, A., 1994. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. roč. 1, č. 2, s. 238-240. ISSN 1071-412X. <https://doi.org/10.1128/cdli.1.2.238-240.1994>.
- BRÖMS, Jeanette; SJÖSTEDT, Anders a LAVANDER, Moa, 2010. The Role of the *Francisella Tularensis* Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology*. roč. 1, č. 136, s. 1-17. ISSN 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00136>.
- BUCHAN, Blake; MCCAFFREY, Ramona; LINDEMANN, Stephen; ALLEN, Lee-Ann a JONES, Bradley, 2009. Identification of migR , a Regulatory Element of the *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain iglABCD Virulence Operon Required for Normal Replication and Trafficking in Macrophages. *Infection and Immunity*. roč. 77, č. 6, s. 2517-2529. ISSN 0019-9567. <https://doi.org/10.1128/IAI.00229-09>.
- CARVALHO, C.L.; LOPES DE CARVALHO, I.; ZÉ-ZÉ, L.; NÚNCIO, M.S. a DUARTE, E.L., 2014. Tularaemia: A challenging zoonosis. *Comparative Immunology, Microbiology and*

Infectious Diseases. roč. 37, č. 2, s. 85-96. ISSN 01479571.
<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.002>.

CDC, 2018. *Centers for Disease Control and Prevention: Tularemia*. online. 2018-12-13.
Dostupné z: <https://www.cdc.gov/tularemia/index.html>. [cit. 2023-10-20].

CELLI, Jean a ZAHRT, Thomas, 2013. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. roč. 3, č. 4, s. 010314-010314. ISSN 2157-1422. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010314>.

CLEMENS, Daniel; LEE, Bai-Yu a HORWITZ, Marcus, 2005. *Francisella tularensis* Enters Macrophages via a Novel Process Involving Pseudopod Loops. *Infection and Immunity*. roč. 73, č. 9, s. 5892–5902. ISSN 0019-9567. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5892-5902.2005>.

COWLEY, Siobhán a ELKINS, Karen, 2011. Immunity to *Francisella*. *Frontiers in Microbiology*. č. 26. ISSN 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00026>.

CRONQUIST, Steven D., 2004. Tularemia: the disease and the weapon. *Dermatologic Clinics*. roč. 22, č. 3, s. 313-320. ISSN 07338635. <https://doi.org/10.1016/j.det.2004.03.009>.

CUTHBERT, Bonnie; ROSS, Wilma; ROHLFING, Amy; DOVE, Simon; GOURSE, Richard et al., 2017. Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. *Genes & Development*. roč. 31, č. 15, s. 1549-1560. ISSN 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.303701.117>.

DEGABRIEL, Manon; VALEVA, Stanimira; BOISSET, Sandrine a HENRY, Thomas, 2023. Pathogenicity and virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence*. roč. 14, č. 1, s. 1-21. ISSN 2150-5594. <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2274638>.

DENNIS, David; INGLESBY, Thomas; HENDERSON, Donald; BARTLETT, John; ASCHER, Michael et al., 2001. Tularemia as a Biological Weapon. *JAMA*. roč. 285, č. 21. ISSN 0098-7484. <https://doi.org/10.1001/jama.285.21.2763>.

DOERN, G. V., 2000. Detection of Selected Fastidious Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. roč. 30, č. 1, s. 166-173. ISSN 1058-4838. <https://doi.org/10.1086/313586>.

DRLICA, K. a ROUVIERE-YANIV, J., 1987. Histonelike proteins of bacteria. *Microbiological Reviews*. roč. 51, č. 3, s. 301-319. ISSN 0146-0749. <https://doi.org/10.1128/mr.51.3.301-319.1987>.

DRYSELIUS, Rikard; HJERTQVIST, Marika; MÄKITALO, Signar; LINDBLOM, Anders; LILJA, Tobias et al., 2019. Large outbreak of tularaemia, central Sweden, July to September 2019. *Eurosurveillance*. roč. 24, č. 42, s. 1-5. ISSN 1560-7917. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.42.1900603>.

DUEÑAS, Ana; ACEVES, Mónica; ORDUÑA, Antonio; DÍAZ, Ramón; SÁNCHEZ CRESPO, et al., 2006. Francisella tularensis LPS induces the production of cytokines in human monocytes and signals via Toll-like receptor 4 with much lower potency than E. coli LPS. *International Immunology*. roč. 18, č. 5, s. 785-795. ISSN 1460-2377. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl015>.

ELLIS, Jill; OYSTON, Petra; GREEN, Michael a TITBALL, Richard, 2002. Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*. roč. 15, č. 4, s. 631-646. ISSN 0893-8512. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.631-646.2002>.

FELDMAN, Katherine Anne, 2003. Tularemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. roč. 222, č. 6, s. 725-730. ISSN 0003-1488. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.725>.

FOLEY, Janet a NIETO, Nathan, 2010. Tularemia. *Veterinary Microbiology*. roč. 140, č. 3-4, s. 332-338. ISSN 03781135. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.017>.

FORSMAN, M.; SANDSTROM, G. a 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*. roč. 44, č. 1, s. 38-46. ISSN 0020-7713. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-38>.

GROVE, Anne, 2011. Functional evolution of bacterial histone-like HU proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* roč. 13, č. 1, s. 1-12.

GRUBER, Stephan, 2014. Multilayer chromosome organization through DNA bending, bridging and extrusion. *Current Opinion in Microbiology*. roč. 22, s. 102-110. ISSN 13695274. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.018>.

- GURCAN, Saban, 2014. Epidemiology of Tularemia. *Balkan Medical Journal*. roč. 33, č. 1, s. 3-10. ISSN 21463123. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2014.13117>.
- HARISTOY, X.; LOZNIEWSKI, A.; TRAM, C.; SIMEON, D.; BEVANGER, L. et al., 2003. Francisella tularensis Bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 41, č. 6, s. 2774-2776. ISSN 0095-1137. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2774-2776.2003>.
- HENNEBIQUE, Aurélie; PEYROUX, Julien; BRUNET, Camille; MARTIN, Amandine; HENRY, Thomas et al., 2021. Amoebae can promote the survival of Francisella species in the aquatic environment. roč. 10, č. 1, s. 277-290. ISSN 2222-1751. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1885999>.
- HESTVIK, G.; WARNS-PETIT, E.; SMITH, L.; FOX, N.; UHLHORN, H. et al., 2015. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiology and Infection*. roč. 143, č. 10, s. 2137-2160. ISSN 0950-2688. <https://doi.org/10.1017/S0950268814002398>.
- HILGARTH, Roland a LANIGAN, Thomas, 2020. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*. roč. 7, s. 100759. ISSN 2215-0161. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>.
- HONG, Kee-Jong; PARK, Pil-Gu; SEO, Sang-Hwan; RHIE, Gi-eun a HWANG, Kyuh-Jam, 2013. Current status of vaccine development for tularemia preparedness. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. roč. 2, č. 1, s. 34-39. ISSN 2287-3651. <https://doi.org/10.7774/cevr.2013.2.1.34>.
- HUBER, Birgit; ESCUDERO, Raquel; BUSSE, Hans-Jürgen; SEIBOLD, Erik; SCHOLZ, Holger C. et al., 2010. Description of Francisella hispaniensis sp. nov., isolated from human blood, reclassification of Francisella novicida (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as Francisella tularensis subsp. novicida comb. nov. and emended description of the genus Francisella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. roč. 60, č. 8, s. 1887-1896. ISSN 1466-5026. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.015941-0>.
- CHAKRABORTY, Subhra; MONFETT, Michael; MAIER, Tamara; BENACH, Jorge; FRANK, Dara et al., 2008. Type IV Pili in Francisella tularensis: Roles of pilF and pilT in Fiber Assembly, Host Cell Adherence, and Virulence. *Infection and Immunity*. roč. 76, č. 7, s. 2852-2861. ISSN 0019-9567. <https://doi.org/10.1128/IAI.01726-07>.

CHONG, Audrey a CELLI, Jean, 2010. The Francisella Intracellular Life Cycle: Toward Molecular Mechanisms of Intracellular Survival and Proliferation. *Frontiers in Microbiology*. roč. 1, č. 138, s. 1-12. ISSN 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00138>.

CHRISTIAN, Michael D., 2013. Biowarfare and Bioterrorism. *Critical Care Clinics*. roč. 29, č. 3, s. 717-756. ISSN 07490704.

JELLISON, William L., 1972. TULAREMIA: Dr. Edward Francis and His First 23 Isolates of Francisella tularensis: Dr. Edward Francis and His First 23 Isolates of Francisella tularensis. *Bulletin of the History of Medicine*. roč. 46, č. 5, s. 477. Dostupné také z: <http://www.jstor.org/stable/44450116>.

JOHANSSON, Anders; FORSMAN, Mats a SJOSTEDT, Anders, 2004. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of Francisella tularensis. *APMIS*. roč. 112, č. 11-12, s. 898-907. ISSN 0903-4641. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1212.x>.

JONES, Crystal; NAPIER, Brooke; SAMPSON, Timothy; LLEWELLYN, Anna; SCHROEDER, Max et al., 2012. Subversion of Host Recognition and Defense Systems by Francisella spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. roč. 76, č. 2, s. 383-404. ISSN 1092-2172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05027-11>.

KAMASHEV, D. a ROUVIERE-YANIV, J., 2000. The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates. *The EMBO Journal*. roč. 19, č. 23, s. 6527-6535. ISSN 14602075. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.23.6527>.

KINGRY, Luke a PETERSEN, Jeannine, 2014. Comparative review of Francisella tularensis and Francisella novicida. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. roč. 4, č. 35, s. 1-12. ISSN 2235-2988. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00035>.

KLEMENTA, Viktor; KARÁSEK, David a KURAŠOVÁ, Ester, 2022. Tularemie v kazuistikách. *Medicína pro praxi*. roč. 19, č. 3, s. 211-214.

KOPPING, Erik; DOYLE, Christopher; SAMPATH, Vinaya; THANASSI, David a ROY, Craig, 2019. Contributions of TolC Orthologs to Francisella tularensis Schu S4 Multidrug Resistance, Modulation of Host Cell Responses, and Virulence. *Infection and Immunity*. roč. 87, č. 4, s. 00823-18. ISSN 0019-9567. <https://doi.org/10.1128/IAI.00823-18>.

LARSSON, Pär; ELFSMARK, Daniel; SVENSSON, Kerstin; WIKSTRÖM, Per; FORSMAN, Mats et al., 2009. Molecular Evolutionary Consequences of Niche Restriction in *Francisella tularensis*, a Facultative Intracellular Pathogen. *PLoS Pathogens*. roč. 5, č. 6. ISSN 1553-7374. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000472>.

MAURIN, Max, 2020. *Francisella tularensis*, Tularemia and Serological Diagnosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. roč. 10. ISSN 2235-2988. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.512090>.

MCLENDON, Molly; APICELLA, Michael a ALLEN, Lee-Ann, 2006. *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential Agent of Biowarfare. *Annual Review of Microbiology*. roč. 60, č. 1, s. 167-185. ISSN 0066-4227. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142126>.

MEIBOM, Karin a CHARBIT, Alain, 2010. *Francisella Tularensis* Metabolism and its Relation to Virulence. *Frontiers in Microbiology*. roč. 1, č. 140, s. 1-13. ISSN 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00140>.

MOREAU, G. a MANN, Barbara, 2014. Adherence and uptake of *Francisella* into host cells. *Virulence*. roč. 4, č. 8, s. 826-832. ISSN 2150-5594. <https://doi.org/10.4161/viru.25629>.

NANO, Francis a SCHMERK, Crystal, 2007. The *Francisella* Pathogenicity Island. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1105, č. 1, s. 122-137. ISSN 0077-8923. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.000>.

OTTEM, K.F.; NYLUND, A.; KARLSBAKK, E.; FRIIS-MØLLER, A. a KAMAISHI, T., 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. roč. 106, č. 4, s. 1231-1243. ISSN 13645072. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04092.x>.

PAVLIK, Pavla a SPIDLOVA, Petra, 2022. Arginine 58 is indispensable for proper function of the *Francisella tularensis* subsp. *holartica* FSC200 HU protein, and its substitution alters virulence and mediates immunity against wild-type strain. *Virulence*. roč. 13, č. 1, s. 1790-1809. ISSN 2150-5594. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2132729>.

- PECHOUS, Roger; MCCARTHY, Travis a ZAHRT, Thomas, 2009. Working toward the Future: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development: Insights into *Francisella tularensis* Pathogenesis and Vaccine Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. roč. 73, č. 4, s. 684-711. ISSN 1092-2172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00028-09>.
- PETERSEN, Jeannine a SCHRIEFER, Martin, 2005. Tularemia: emergence/re-emergence. *Veterinary Research*. roč. 36, č. 3, s. 455-467. ISSN 0928-4249. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005006>.
- PETTIJOHN, David E., 1988. Histone-like Proteins and Bacterial Chromosome Structure. *The Journal of Biological Chemistry*. roč. 263, č. 26, s. 12793-12796.
- PUTZOVA, Daniela; SENITKOVA, Iva a STULIK, Jiri, 2016. Tularemia vaccines. *Folia Microbiologica*. roč. 61, č. 6, s. 495-504. ISSN 0015-5632. <https://doi.org/10.1007/s12223-016-0461-z>.
- ROJAS-MORENO, C; BHARTEE, H; VASUDEVAN, A; ADIGA, R a SALZER, W, 2018. Tetracyclines for Treatment of Tularemia: A Case Series. *Open Forum Infectious Diseases*. roč. 5, č. 9, s. 1-3. ISSN 2328-8957. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy176>.
- ROUVIÈRE-YANIV, Josette; YANIV, Moshe a GERMOND, Jacques-Edouard, 1979. E. coli DNA binding protein HU forms nucleosome-like structure with circular double-stranded DNA. *Cell*. roč. 17, č. 2, s. 265-274. ISSN 00928674. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90152-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90152-1).
- ROWE, Hannah a HUNTLEY, Jason, 2015. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. roč. 5, č. 94, s. 1-20. ISSN 2235-2988. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00094>.
- SATO, T.; FUJITA, H.; OHARA, Y. a HOMMA, M., 1990. Microagglutination test for early and specific serodiagnosis of tularemia. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 28, č. 10, s. 2372-2374. ISSN 0095-1137. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.10.2372-2374.1990>.
- SKYBERG, Jerod A., 2014. Immunotherapy for tularemia. *Virulence*. roč. 4, č. 8, s. 859-870. ISSN 2150-5594. <https://doi.org/10.4161/viru.25454>.

SPENCER, R.C., 2007. Potential bio-terror agents. *Journal of Hospital Infection*. roč. 65, č. 2, s. 19-22. ISSN 01956701. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(07\)60008-5](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(07)60008-5).

SPIDLOVA, Petra; SOKOLOVA, Eliska a PAVLIK, Pavla, 2023. Bacteriophage SPO1 protein Gp46 suppresses functions of HU protein in *Francisella tularensis*. *Frontiers in Microbiology*. roč. 14, s. 1-10. ISSN 1664-302X. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1330109>.

SPIDLOVA, Petra; STOJKOVA, Pavla; SJÖSTEDT, Anders a STULIK, Jiri, 2020. Control of *Francisella tularensis* Virulence at Gene Level: Network of Transcription Factors. *Microorganisms*. roč. 8, č. 10, s. 1-16. ISSN 2076-2607. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101622>.

STIDHAM, Ralph; FREEMAN, David; VON TERSCH, Robert; SULLIVAN, Peter a TOSTENSON, Samantha, 2018. Epidemiological Review of *Francisella Tularensis*: A Case Study in the Complications of Dual Diagnoses. *PLoS Currents*. roč. 1. ISSN 2157-3999. <https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.8eb0b55f377abc2d250314bbb8fc9d6d>.

STOJKOVA, Pavla a SPIDLOVA, Petra, 2022. Bacterial nucleoid-associated protein HU as an extracellular player in host-pathogen interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. roč. 12, s. 1-7. ISSN 2235-2988. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.999737>.

STOJKOVA, Pavla; SPIDLOVA, Petra; LENCO, Juraj; REHULKOVA, Helena; KRATKA, Lucie et al., 2018. HU protein is involved in intracellular growth and full virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence*. roč. 9, č. 1, s. 754-770. ISSN 2150-5594. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1441588>.

STRAŠKOVÁ, Adéla a STULÍK, Jiří, 2012. Intracellular pathogenesis of *Francisella tularensis*. *Military Medical Science Letters*. roč. 81, č. 1, s. 27-39. ISSN 03727025. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2012.004>.

SUNAGAR, Raju; KUMAR, Sudeep; FRANZ, Brian a GOSSELIN, Edmund, 2016. Tularemia vaccine development: paralysis or progress?. *Vaccine (Auckl)*. roč. 6, s. 9-23. ISSN 2230-2298. <https://doi.org/10.2147/VDT.S85545>.

SVENSSON, Kerstin; LARSSON, Pär; JOHANSSON, Daniel; BYSTRÖM, Mona; FORSMAN, Mats et al., 2005. Evolution of Subspecies of *Francisella tularensis*. *Journal of*

Bacteriology. roč. 187, č. 11, s. 3903-3908. ISSN 0021-9193.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3903-3908.2005>.

TÄRNVIK, A. a BERGLUND, L., 2003. Tularaemia. *European Respiratory Journal*. roč. 21, č. 2, s. 361-373. ISSN 0903-1936. <https://doi.org/10.1183/09031936.03.00088903>.

TÄRNVIK, ARNE a CHU, MAY, 2007. New Approaches to Diagnosis and Therapy of Tularemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1105, č. 1, s. 378-404. ISSN 0077-8923. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.017>.

TROHA, Kaja; BOŽANIĆ URBANČIČ, Nina; KORVA, Miša; AVŠIČ-ŽUPANC, Tatjana; BATTELINO, Saba et al., 2022. Vector-Borne Tularemia: A Re-Emerging Cause of Cervical Lymphadenopathy. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. roč. 7, č. 8, s. 1-16. ISSN 2414-6366. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7080189>.

WAWSZCZAK, Maria; BANASZCZAK, Barbara a RASTAWICKI, Waldemar, 2022. Tularaemia – a diagnostic challenge. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. roč. 29, č. 1, s. 12-21. ISSN 1232-1966. <https://doi.org/10.26444/aaem/139242>.

WAYNE CONLAN, J. a OYSTON, Petra, 2007. Vaccines Against Francisella Tularensis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. roč. 1105, č. 1, s. 325-350. ISSN 0077-8923. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.012>.

YANES, Hadjila; HENNEBIQUE, Aurélie; PELLOUX, Isabelle; BOISSET, Sandrine; BICOUT, Dominique et al., 2018. Evaluation of In-House and Commercial Serological Tests for Diagnosis of Human Tularemia. *Journal of Clinical Microbiology*. roč. 56, č. 1, s. 01440-17. ISSN 0095-1137. <https://doi.org/10.1128/JCM.01440-17>.

YENI, Derya; BÜYÜK, Fatih; ASHRAF, Asma a SHAH, M., 2021. Tularemia: a re-emerging tick-borne infectious disease. *Folia Microbiologica*. roč. 66, č. 1, s. 1-14. ISSN 0015-5632. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00827-z>.

ZHANG, Peipei; ZHAO, Xiaohui; WANG, Yawen; DU, Ke; WANG, Zhihao et al., 2022. Bacteriophage protein Gp46 is a cross-species inhibitor of nucleoid-associated HU proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 119, č. 9, s. 1-11. ISSN 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116278119>.

12 Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1 – Schéma životních cyklů <i>F. tularensis</i>	18
Obr. 2 – Intracelulární život <i>F. tularensis</i> v makrofázích	22
Obr. 3 – Struktura HU proteinu znázorněná v ohnuté rovině DNA	30
Obr. 4 – Schéma principu overlap PCR.....	35
Obr. 5 – Ilustrační schéma procesu klonování.....	40
Obr. 6 – Příprava desítkové ředící řady	57
Obr. 7 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření PCR reakce 1. a 2. části <i>gp46</i>	59
Obr. 8 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření PCR amplifikace celého genu <i>gp46</i> . 60	
Obr. 9 – Schématická mapa plazmidu pET-28b (+) o velikosti 5368 bp.....	61
Obr. 10 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření délky fragmentů získaných restričním štěpením	62
Obr. 11 – Elektroforetické ověření délky produktů PCR na koloniích (klonování <i>gp46pET-28b</i> do <i>E. coli</i> TOP10).....	63
Obr. 12 – Elektroforetické ověření délky produktů PCR na koloniích (klonování <i>gp46pET-28b</i> do <i>E. coli</i> BL21 (DE3)).....	64
Obr. 13 – SDS-PAGE elektroforéza obarvená koloidním modřením.....	65
Obr. 14 – Imunodetekce purifikovaných proteinů a jednotlivých frakcí (RTG film).....	66
Obr. 15 – Elektroforetická separace PCR reakce (DNA kódující <i>pigR</i> gen).....	67
Obr. 16 – Výsledek EMSA experimentu	68
Obr. 17 – PCR reakce genu <i>gp46</i> pro klonování do shuttle vektoru pKK289Km	69
Obr. 18 – <i>gp46</i> po restrikci	70
Obr. 19 – pKK289KmGFP po restrikci	70
Obr. 20 – PCR na koloniích <i>E. coli</i> TOP10.....	71
Obr. 21 – PCR na koloniích <i>F. tularensis</i> pro ověření úspěšnosti elektroporace	71
Obr. 22 – Růstové křivky 1.....	72
Obr. 23 – Růstové křivky 2.....	73
Obr. 24 – Proliferace kmenů <i>F. tularensis</i> uvnitř myších kostně-dřeňových makrofágů – průměrná data ze dvou experimentů	74
Obr. 25 – Přežití infikovaných myší BALB/c	75

Tab. 1 – CDC klasifikace potenciálních infekčních agens bioterorismu.....	16
Tab. 2 – Návrhy oligonukleotidů	33
Tab. 3 – Složení PCR reakční směsi pro syntézu první/druhé části genu <i>gp46</i>	36
Tab. 4 – Nastavení programu na termocykleru.....	36
Tab. 5 – Složení PCR reakční směsi pro syntézu celého genu <i>gp46</i>	36
Tab. 6 – Reakční směs (plazmid pET28b/ <i>gp46</i>) pro restriční štěpení.....	39
Tab. 7 – Reakční směs pro ligaci	41
Tab. 8 – PCR na koloniích a podmínky reakce	42
Tab. 9 – Reakční směs pro EMSA experiment	49
Tab. 10 – PCR reakční směs pro amplifikaci fragmentu <i>pigR</i> (promotor <i>pigR</i>)	49
Tab. 11 – Podmínky PCR reakce pro amplifikaci fragmentu <i>pigR</i> genu.....	49
Tab. 12 – Oligonukleotidy pro amplifikaci genu <i>gp46</i> pro klonování do <i>E.coli/F.tularensis</i> shuttle vektoru.....	50
Tab. 13 – Reakční směs a podmínky pro PCR reakci.....	50
Tab. 14 – Reakční směs pro restriční štěpení genu <i>gp46</i> a vektoru pKK289KmGFP	51
Tab. 15 – Ligační směs	51
Tab. 16 – Pipetovací schéma mikrotitrační destičky	53
Tab. 17 – Ředění pro CFU jednotlivých bakterií – 1. experiment.....	56
Tab. 18 – Ředění pro CFU jednotlivých bakterií – 2. experiment.....	56
Tab. 19 – Koncentrace DNA fragmentů odpovídajících 1. a 2. části genu <i>gp46</i>	59
Tab. 20 – Koncentrace DNA genu <i>gp46</i>	60
Tab. 21 – Koncentrace plazmidové DNA pET-28b	61
Tab. 22 – Koncentrace izolovaných DNA fragmentů (<i>gp46</i> a pET28b)	62
Tab. 23 – Pipetované objemy a změřené koncentrace purifikovaných proteinů a frakcí	64
Tab. 24 – Objemy a koncentrace frakcí po iontově-výměnné chromatografii pro EMSA.....	68
Tab. 25 – Koncentrace DNA fragmentů po restriční štěpení	70
Tab. 26 – Průměr logaritmu CFU z obou experimentů	73

13 Seznam zkratek

ATP	Adenosintrifosfát
bp	Párů bází
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Jednotky tvořící kolonie (Colony Forming Units)
CR3	Komplementový receptor 3
CT	Výpočetní tomografie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELISA	Imuno-enzymatická metoda pro detekci antigenů (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay)
FCP	<i>Francisella</i> -containing phagosome
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
FPI	Ostrov patogenity bakterie <i>F. tularensis</i> (<i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
HTM	Modul pro převzetí hostitele (Host Takeover Module)
IFA	Imunofluorescence
IL	Interleukin
INF	Interferon
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysacharid
LVS	Živý vakcinační kmen (Live Vaccine Strain)
MAT	Rychlý mikroaglutinační test
MR	Manózový receptor
MOI	Multiplicita infekce (Multiplicity of Infection)
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát redukováná forma
NAPs	Proteiny asociované s nukleoidem (Nucleoid-Associated Proteins)
<i>NdeI</i>	Enzym z <i>Neisseria denitrificans</i>
NK buňky	Přirození zabíječi (Natural Killer Cell)
O/N	Přes noc (Over Night)
ORF	Otevřený čtecí rámec (Open Reading Frame)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)

<i>Pfu</i>	Enzym z <i>Pyrococcus furiosus</i>
rDNA	Ribozomální deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyseliny
ROS	Reaktivní formy kyslíku
<i>SacI</i>	Enzym ze <i>Streptomyces achromogenes</i>
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SP-A	Surfaktantový protein A
SRA	Scavengerový receptor A
TAE pufr	Elektroforetický pufr obsahující Tris, kyselinu octovou (Acetic acid) a EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová)
<i>Taq</i>	Enzym z <i>Thermus aquaticus</i>
TAT	Aglutinační reakce
Tfp	Pili typu IV (Type Four Pili)
Th	Pomocný T-lymfocyt
TLR	Toll-like receptor
TNF	Faktor nekrotizující nádory (Tumor Necrosis Faktor)
VLF	Vojenská lékařská fakulta
<i>XhoI</i>	Enzym z <i>Xanthomonas holcicola</i>
USA	Spojené státy americké (United States of America)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Max Maurin,
Université Grenoble Alpes, FranceREVIEWED BY
David Thanassi,
Stony Brook University, United States
Zhuo Ma,
Albany College of Pharmacy and Health
Sciences, United States
Amanda Griffin,
Rocky Mountain Laboratories, NIAID, NIH,
United States*CORRESPONDENCE
Petra Spidlova
✉ petra.spidlova@unob.cz
Pavla Pavlik
✉ pavla.s.pavlik@gmail.comRECEIVED 30 October 2023
ACCEPTED 27 November 2023
PUBLISHED 08 December 2023CITATION
Spidlova P, Sokolova E and Pavlik P (2023)
Bacteriophage SPO1 protein Gp46 suppresses
functions of HU protein in *Francisella*
tularensis.
Front. Microbiol. 14:1330109.
doi: 10.3389/fmicb.2023.1330109COPYRIGHT
© 2023 Spidlova, Sokolova and Pavlik. This is
an open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with these
terms.

Bacteriophage SPO1 protein Gp46 suppresses functions of HU protein in *Francisella tularensis*

Petra Spidlova^{1*}, Eliska Sokolova^{1,2} and Pavla Pavlik^{1*}¹Department of Molecular Pathology and Biology, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czechia, ²Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove, Czechia

The nucleoid-associated protein HU is a common bacterial transcription factor, whose role in pathogenesis and virulence has been described in many bacteria. Our recent studies showed that the HU protein is an indispensable virulence factor in the human pathogenic bacterium *Francisella tularensis*, a causative agent of tularemia disease, and that this protein can be a key target in tularemia treatment or vaccine development. Here, we show that *Francisella* HU protein is inhibited by Gp46, a protein of *Bacillus subtilis* bacteriophage SPO1. We predicted that Gp46 could occupy the *F. tularensis* HU protein DNA binding site, and subsequently confirmed the ability of Gp46 to abolish the DNA-binding capacity of HU protein. Next, we showed that the growth of *Francisella* wild-type strain expressing Gp46 *in trans* corresponded to that of a deletion mutant strain lacking the HU protein. Similarly, the efficiency of intracellular proliferation in mouse macrophages resembled that of the deletion mutant strain, but not that of the wild-type strain. These results, in combination with findings from a recent study on Gp46, enabled us to confirm that Gp46 could be a universal inhibitor of HU proteins among bacterial species.

KEYWORDS

Francisella, HU protein, Gp46, virulence, histone-like protein, transcription factor, nucleoid-associated protein

1 Introduction

Francisella tularensis, a Gram-negative bacterium, is the causative agent of tularemia, a zoonotic systemic disease (McCoy and Chapin, 1912). There are various clinical forms of this disease depending on how it is transmitted. The type A strain of *F. tularensis* is one of the most lethal to humans. It is spread by aerosols, with an infectious dose of only 10 colony-forming units (CFUs) and a mortality rate of 60% in untreated cases. For this reason, the Type A strain is classified as a Tier 1 select agent of bioterrorism, meaning it can likely be used in a bioterrorist attack (Dennis et al., 2001). *F. tularensis* is considered pathogenic because of its ability to survive within phagocytic cells and escape from the phagosome into the cytoplasm (Checroun et al., 2006). Although the exact mechanism of phagosomal escape remains unknown, studies have suggested that disruption of genes located in the *Francisella* pathogenicity island (FPI), a gene cluster coding for a functional but atypical type VI secretion system (T6SS) (Spidlova and Stulik, 2017; Clemens et al., 2018), leads to the inability of bacteria to escape the phagosome (Celli and Zahrt, 2013). Several transcription factors such as MglA/SspA (Lauriano et al., 2004; Brotcke et al., 2006; Charity et al., 2007), PigR (Brotcke et al., 2006; Charity et al., 2007; Ramsey et al., 2015), and PmrA (Mohapatra et al., 2007; Bell et al., 2010; Ramsey and Dove, 2016) have been

implicated in the regulation of virulence and stress response genes, and various models have been proposed to explain FPI genes expression (Charity et al., 2007; Ramsey and Dove, 2016; Cuthbert et al., 2017). Our recent research demonstrated that the *F. tularensis* HU protein is an additional key regulator that should not be overlooked (Stojkova et al., 2018; Pavlik and Spidlova, 2022).

HU proteins have been demonstrated to have a wide range of functions, such as DNA-binding transcription factors, initiation of DNA replication, cell division, SOS response, and galactose metabolism (Bonnefoy and Rouvière-Yaniv, 1992; Preobrajenskaya et al., 1994; Aki et al., 1996; Oberto et al., 2009; Ferrándiz et al., 2018). HU protein is also essential for the survival of *Streptococcus pneumoniae* (Ferrándiz et al., 2018). Furthermore, it has been reported that HU protein regulates 8% of the genes in *Escherichia coli*, particularly those involved in adaptation to the host cell and stress response (Oberto et al., 2009). This protein is also important for the initiation of the SOS response by displacing the repressor LexA (Preobrajenskaya et al., 1994). The HU protein can affect virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Mangan et al., 2011), *F. tularensis* (Stojkova et al., 2018), and *Porphyromonas gingivalis* (Priyadarshini et al., 2013). Additionally, its deletion leads to a reduced growth rate and decreased type III secretion system-related gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* (Phan et al., 2015). HU protein has been shown as well to be important for cellular motility in *Salmonella* (Mangan et al., 2011), *Xanthomonas citri* (Conforte et al., 2018), and *Cytophaga hutchinsonii* (Guan et al., 2018). It also controls the transcription of genes involved in anaerobic respiration (nitrate reductase A *narH*) in both *E. coli* (Oberto et al., 2009) and *Salmonella* (Mangan et al., 2011). Furthermore, the HU protein can be a potential target for the development of therapies against tuberculosis, as it has been demonstrated to be involved in the repression of *gal* transcription and oxidative stress response (Aki et al., 1996; Balandina et al., 2001; Bhowmick et al., 2014). It is also essential for biofilm formation and pathogenesis in *X. citri* (Conforte et al., 2018) and *C. hutchinsonii* (Guan et al., 2018). Therefore, the HU protein is essential for the regulation of numerous genes and metabolic pathways within bacterial cells, and its diverse functions explain the wide range of phenotypes in HU protein-deficient strains.

Recently, the significance of HU protein in *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 intracellular growth and virulence has been uncovered (Stojkova et al., 2018). This protein, previously well studied in Gram-negative bacteria other than *F. tularensis* (Stojkova et al., 2019), usually forms heterodimers (*Enterobacteriaceae*) and is encoded by two genes: *hupA* and *hupB*. However, when found in *F. tularensis* or *Mycobacterium tuberculosis*, HU is encoded by a single *hupB* gene and forms homodimers (Bhowmick et al., 2014; Stojkova et al., 2019; Spidlova et al., 2020). HU is crucial for the replication and virulence of the FSC200 strain in mice (Stojkova et al., 2018) and it binds double-stranded DNA and protects against hydroxyl radicals. Deletion of the *hupB* gene, which encodes HU, leads to decreased expression of *PigR* and most FPI proteins, as well as the downregulation of *pigR* and several FPI genes. An *F. tularensis* mutant strain lacking the *hupB* gene was attenuated both *in vitro* and *in vivo*, illustrating the importance of HU for *Francisella* virulence (Stojkova et al., 2018). Our latest study showed that arginines 58 and 61 are necessary for the HU protein DNA-binding capacity in *F. tularensis*. Moreover, we identified a potential DNA-binding motif in the HU

protein, suggesting that it can bind DNA in a novel sequence-dependent manner (Pavlik and Spidlova, 2022).

Gp46 is encoded by the genome of the lytic phage SPO1 of *B. subtilis*. It has no sequence similarity to other proteins with the described function. Recently, Zhang et al. described this protein as an inhibitor of the *B. subtilis* HU protein (Zhang et al., 2022). Expression of Gp46 *in trans* in *B. subtilis* led to *B. subtilis* growth reduction, cell filamentation, and blocked chromosome segregation. This phenotype resembled that of *E. coli* HU deletion mutant. Those authors also found that Gp46 interacts with *B. subtilis* HU protein at its DNA-binding site, and they speculated that Gp46 could be a cross-species HU protein inhibitor (Zhang et al., 2022).

Here, we describe the role of Gp46 on *F. tularensis* HU protein activity and the effects of plasmid-borne Gp46 expression on the vitality and pathogenicity of *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 *in vitro*. We confirmed the inhibitory effect of Gp46 on HU protein DNA binding activity leading to decreased expression of *pigR* gene coding for one of *Francisella* FPI regulator, revealed that the growth of FSC200 expressing Gp46 *in trans* was similar to that of the HU protein deletion mutant strain, and observed that the efficiency of bacterial proliferation inside mouse macrophages was significantly reduced when compared to the wild-type strain FSC200. Thus, we confirmed its impact on *in vitro* virulence of *Francisella*.

2 Materials and methods

2.1 Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are summarized in Supplementary Table S1. The bacterial strains were cultured as previously described (Stojkova et al., 2018; Pavlik and Spidlova, 2022). McLeod agar plate enriched for bovine hemoglobin (BD Diagnostics, 212392) and IsoVitalex (BD Diagnostics, 211876) or Chamberlain medium (Chamberlain, 1965) with shaking 200 rpm at 37°C were used for *Francisella* cultivation. The *E. coli* strains were cultured in Luria Bertani (LB) broth medium or on LB agar plates. When necessary, antibiotics were used at the following concentrations: kanamycin 20 µg/mL (*F. tularensis*) or 50 µg/mL (*E. coli*).

2.2 Generation of Gp46 expressing constructs

2.2.1 Gp46 construct preparation and expression in *Escherichia coli*

The DNA sequence coding for the bacteriophage SPO1 Gp46 protein was downloaded from NCBI.¹ As shown graphically in Supplementary Figure S1, the complete gene fused with the sequence coding for the HA tag (hemagglutinin) was sequentially synthesized by several overlap polymerase chain reactions (PCRs) using template oligonucleotides and PCR primers listed in Supplementary Table S2. The accuracy of the final PCR product was confirmed by sequencing

¹ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_011421.1?report=fasta&from=72126to=7445

(Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences). *gp46* was cloned into the pET28b vector (Novagen) using *NcoI* and *XhoI* restriction sites and propagated in *E. coli* BL21 (DE3) (New England BioLabs, Ipswich, MA, United States).

2.2.2 Expression of plasmid-borne Gp46 in *Francisella tularensis*

To propagate Gp46 in *F. tularensis*, gene *gp46* was amplified using the primers gp46pKK_Fw and gp46pKK_Rev (Supplementary Table S2) using gp46pET28b as a template. The reverse primer contained sequence coding for the HA tag. Using the restriction enzymes *NdeI* and *SacI*, the PCR product was cloned into the *Francisella* shuttle vector pKK289KmGFP (Bönquist et al., 2008) replacing the *gfp* gene. Electroporation (2,500 V, 600 Ω, 25 μF) was used to insert the final product into *F. tularensis* strain FSC200, and the strain was denoted as FSC200/Gp46. Expression of Gp46 protein was verified using Western blot and anti-HA antibody (Abcam, Ab128131) (Supplementary Figure S4).

2.3 Molecular docking and molecular dynamics simulation

F. tularensis subsp. *holarctica* FSC200 strain HU protein (FTS_0886, AFT92728, CP003862.1) structure was predicted as previously described (Pavlik and Spidlova, 2022). The predicted structure of *F. tularensis* HU, experimental crystal structure of Gp46 (Bacteriophage SPO1 protein Gp46; RCSB:7BY7) (Zhang et al., 2022), and DNA 16 bp long corresponding to the DNA-binding motif (Pavlik and Spidlova, 2022) of *F. tularensis* HU found inside the *pigR* gene were used in molecular docking studies of protein–protein or protein–DNA complexes using the HDock server (Yan et al., 2020) with default parameters. The best matching models were visualized using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA) and used in further simulation analyses.

Molecular dynamics simulation (MDS) was performed as previously described (Pavlik et al., 2023). MDS was achieved using GROMACS v2020.1 (van der Spoel et al., 2005; Abraham et al., 2015; Lemkul, 2019). Force fields CHARMM36 all-atom (Vanommeslaeghe et al., 2010; Grosdidier et al., 2011; Vanommeslaeghe et al., 2012; Vanommeslaeghe and MacKerell Jr, 2012; Soteras Gutiérrez et al., 2016) and AMBER (Wang et al., 2000) were used for protein or protein–DNA complex stability analyses, respectively. After constructing the topology complex, it was placed in a cubic box and solvated with water. Na⁺ and Cl⁻ ions were added to neutralize the system. Poor contact between the atoms was minimized by performing energy minimization with 50,000 steps. The system was equilibrated using standard constant volume and temperature (NVT) and constant pressure and temperature (NPT) parameters. MDS analysis was run for 50 ns, and the stabilities of the complexes were analyzed using the root-mean-square deviation (RMSD). Radius of gyration (Rg) was used to measure the compactness of the complex.

2.4 Purification of *Francisella tularensis* HU

F. tularensis subsp. *holarctica* FSC200 carrying the HU protein labeled with an HA tag (HU_HA) (Pavlik and Spidlova, 2022) was

cultured overnight in Chamberlain's medium supplemented with kanamycin (20 μg/mL). The pellet was resuspended in Tris-buffered saline (TBS) and lysed using a French press (16,000 psi, three times). The clear lysate was mixed with anti-HA agarose resin (Thermo Fisher Scientific, 26,181) and incubated at 4°C overnight with rotation. HU_HA proteins bound to the resin were washed three times with TBS supplemented with 0.05% Tween20 and eluted with 3 M NaSCN. Buffer exchange was performed using Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific, 89882). The protein was stored in buffer containing 150 mM NaCl and 50 mM Tris at pH 7.5. The concentration of the protein samples was determined using a Qubit assay (Invitrogen, Q33211).

2.5 Purification of Gp46

E. coli BL21 (DE3) carrying gp46pET28b was cultured in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with kanamycin (50 μg/mL) at 37°C overnight. The next day, the bacterial culture was diluted 1:100 in fresh LB medium with kanamycin and cultured until reaching OD_{600 nm} = 0.4–0.8, subsequently isopropyl β-D-thiogalactoside (400 μM) was used to induce protein expression. After 4 h, the bacteria were pelleted, resuspended in 2 mL of TBS, and lysed using a French press (16,000 psi, three times). The clear lysate was applied onto an anti-HA agarose resin (Thermo Fisher Scientific, 26181) and incubated at 4°C overnight with rotation. After three washes with TBS supplemented with 0.05% Tween20, bound Gp46 protein was eluted using 3 M NaSCN. Buffer exchange was performed using Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Fisher Scientific, 89882). The protein was stored in buffer containing 150 mM NaCl and 50 mM Tris at pH 7.5. To minimize the possibility of *E. coli* HU protein co-purification, anion exchange chromatography was performed using Macro-Prep DEAE Support (Bio-Rad, 1560020). The concentration of the protein samples was determined using a Qubit assay (Invitrogen, Q33211).

2.6 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The inhibitory effect of Gp46 on the interaction between the HU protein and DNA was analyzed using the EMSA method. HU protein (500 ng) was incubated with 100 ng of DNA corresponding to either the 477 bp sequence upstream of the *pigR* gene, the *pigR* gene itself, or the sequence upstream of the gene encoding IL1β with or without Gp46 (0–4,000 ng). All selected DNA sequences contain DNA-binding motif of the HU protein. Reaction mixtures were incubated in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA-Na₂, 50 mM KCl, 10 μg/mL bovine serum albumin, 5% glycerol, and 0.1 mM DL-dithiothreitol) for 20 min at 4°C. The samples were loaded onto a 1% tris-borate-EDTA (TBE) agarose gel and separated by electrophoresis (0.33× TBE, 50 V, 240 min). The complexes were visualized using UV and SYBR®Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, S33102).

2.7 Isolation of RNA and RT-PCR

RNA from FSC200, FSC200/ΔHU, and FSC200/Gp46 strains was isolated from Chamberlain medium cultures of OD₆₀₀ 0.7 using

RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74106) according to the manufacturer's instruction. Obtained RNA was treated with DNase I (Thermo Scientific, EN0521). Aliquots of RNA were used for reverse transcription and the obtained cDNA was used for PCR amplification of target genes (*rpoA*, *pigR*, and *hupB*) using appropriate primers (Supplementary Table S2). Samples were analyzed by agarose gel electrophoresis and intensities of bands were determined by ImageJ.

2.8 Standard and stress growth kinetics

F. tularensis strains (FSC200, FSC200/ Δ HU, FSC200/pKK289, and FSC200/Gp46) were grown overnight in Chamberlain's medium (when appropriate supplemented with kanamycin 20 μ g/mL) at 37°C and 200 rpm. The next day, bacterial cultures were diluted in fresh Chamberlain's medium (for standard growth curve) or in Chamberlain's medium supplemented with CuCl₂ (Sigma Aldrich, 222,011) to a final concentration of 20 μ M (for oxidative stress growth curve) to OD₆₀₀ = 0.1 and 200 μ L aliquots of the suspensions were applied to a 96-well plate in pentaplicates. Pure Chamberlain's medium was used as blank. The remaining wells were filled with water to prevent evaporation. Growth kinetics were determined by measuring optical density at 600 nm using a BioTek Synergy H1 microplate reader (Agilent). The experiment was repeated four times.

2.9 *In vitro* proliferation in bone marrow-derived macrophages

Mouse bone marrow cells were isolated from femurs of female Balb/c mice 6–10 weeks old (Velaz, Prague, Czech Republic) and differentiated into bone marrow-derived macrophages (BMMs), as described previously (Spidlova et al., 2018; Stojkova et al., 2018). BMMs were infected with *F. tularensis* strains (FSC200, FSC200/ Δ HU, FSC200/Gp46, and FSC200/pKK289) at a multiplicity of infection (MOI) of 50. After 30 min of incubation, extracellular bacteria were killed using gentamicin (5 μ g/mL). At specific time points (1, 6, 18, and 24 h) after infection, cells were lysed with 0.1% sodium deoxycholate. The lysates were plated on McLeod agar plates at appropriate dilutions. The plates were then incubated at 37°C for several days. The number of viable intracellular bacteria was determined by counting the colony-forming units (CFU). The experiment was performed in triplicate for each strain and was repeated twice.

2.10 Infection of the mouse model

Groups of five BALB/c mice were inoculated subcutaneously with one of the *F. tularensis* strains (FSC200, FSC200/ Δ HU, or FSC200/Gp46) at an infection dose of 3×10^7 /mouse. The mice were monitored for signs of illness, and morbidity was recorded.

2.11 Statistical analysis

Statistical significance was determined using GraphPad Prism version 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States). The level

of significance was defined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test, unless otherwise indicated. *p*-values are indicated as follow: $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, $p < 0.0001$ ****.

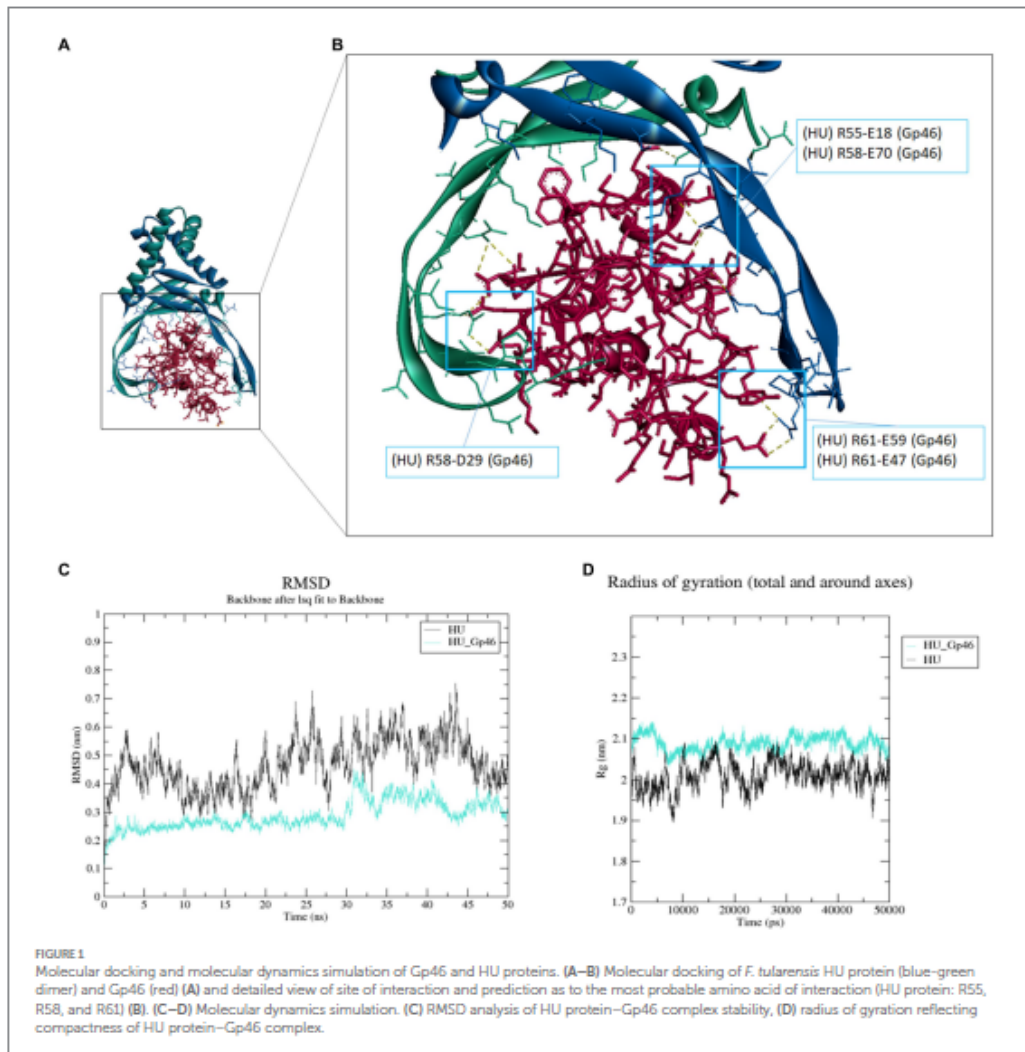
3 Results

3.1 Molecular docking and molecular dynamics simulation of Gp46 and *Francisella* HU protein

The structure of HU protein was predicted using the HDOCK server (Yan et al., 2020) as described previously (Pavlik et al., 2023). The bacteriophage SPO1 protein Gp46 structure was downloaded from Protein Data Bank (PDB:7BY7) (Zhang et al., 2022). We used the HDOCK server to model and predict the structure of *Francisella* HU protein and Gp46. We found that Gp46 was bound to the HU protein (Figure 1A) at the same location as in the study of *B. subtilis* HU protein and Gp46 (Zhang et al., 2022). We analyzed the most probable sites of interaction using the BIOVIA Discovery Studio Visualizer and predicted three arginine residues of the HU protein that are necessary for DNA-binding capacity (R55, R58, and R61) as amino acids interacting with Gp46 (Figure 1B). Hydrogen-hydrogen-type bonds (salt bridges) were predicted at these sites (Supplementary Table S3). We also determined the stability of the HU-Gp46 complex compared with the non-complexed HU protein using root-mean-square deviation (RMSD) analysis (Figure 1C). The free HU protein dimer proved to be less stable (0.3–0.6 nm) than the HU protein dimer in complex with Gp46 (0.2–0.4 nm) when analyzed for 50 ns, thus indicating a steady interaction of these two proteins. We also determined compactness of protein or protein complexes using radius gyration analysis (Figure 1D), where HU protein dimer is more compact (note: increased values indicate a decreased protein structure compactness, thus complex flexibility is increased but exhibits less stability) than HU-Gp46 complex, suggesting Gp46 disorganizes the stability and consistency of the HU protein.

3.2 Gp46 Binds *Francisella* HU protein and abolishes its DNA-binding capacity

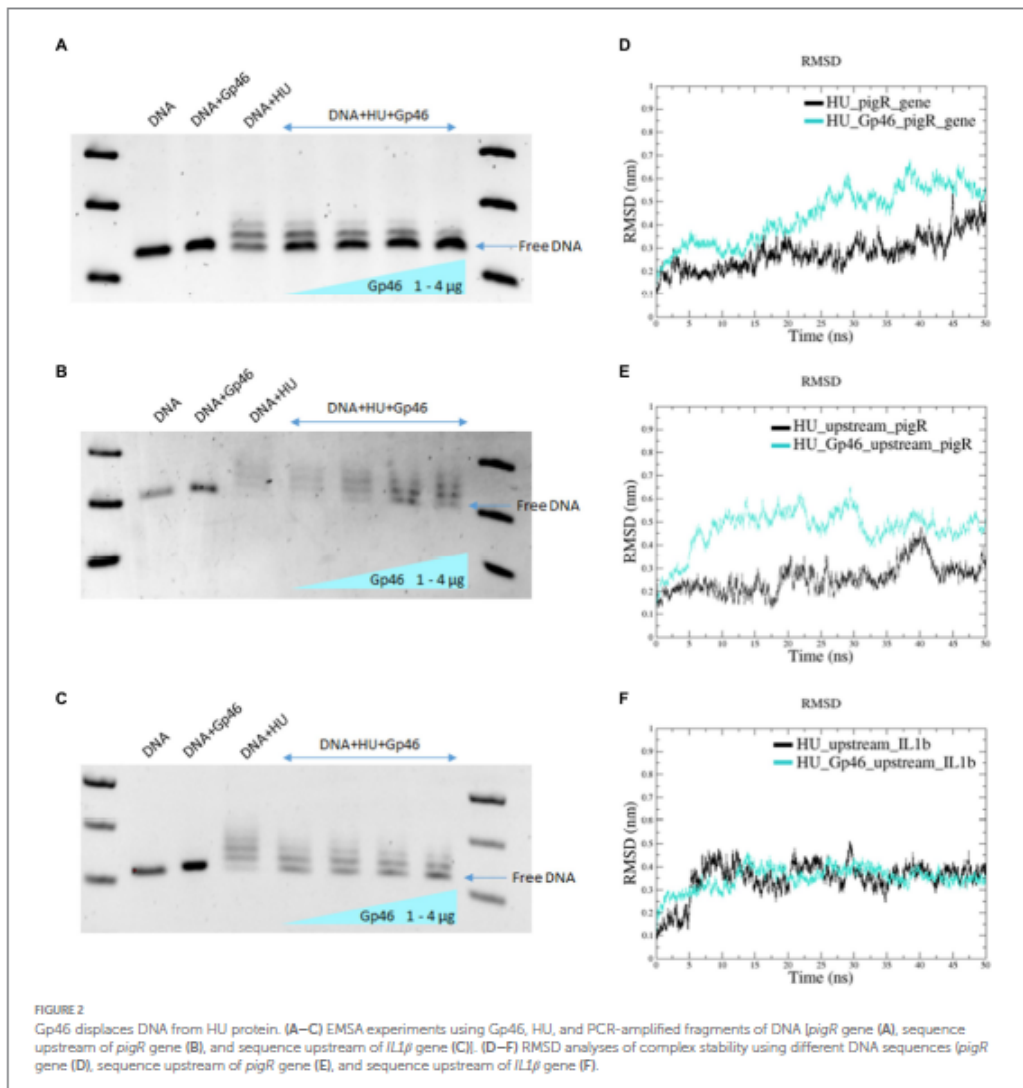
In our previous studies, we demonstrated that *F. tularensis* HU protein binds DNA and identified a *Francisella* HU protein's specific DNA-binding motif (Pavlik and Spidlova, 2022). Using molecular docking and MDS, we showed that Gp46 and *Francisella* HU proteins formed a stable complex (Figure 1C). Next, we used the EMSA method to determine whether the Gp46 protein could displace DNA from the HU protein-binding site and occupy that site. As tested DNA we used three PCR-amplified fragments of DNA containing HU protein-binding motifs (Pavlik and Spidlova, 2022). These PCR products corresponded to the *pigR* gene, a sequence upstream of the *pigR* gene, and a sequence upstream of the *IL1 β* gene. This experiment confirmed that HU protein binds these DNA fragments (Figures 2A–C; lane DNA + HU) and that as the amount of Gp46 increased, the ability of HU protein to bind DNA decreased



(Figures 2A–C; lanes DNA+HU+ Gp46, [1–4 μg of Gp46]), suggesting competition between DNA and Gp46 in HU protein DNA-binding site. Free DNA bands (blue arrows in Figure 2) densities were measured using ImageJ to show increasing amount of free DNA in the presence of Gp46 (Supplementary Figure S2). The results obtained were validated by RMSD analyses, which showed that in all cases, the complex “HU protein–DNA” was more stable than the complex “HU protein–Gp46–DNA” (Figures 2D–F), despite RMSD analysis of HU-Gp46-upstream_IL1β showed very similar values (Figure 2F) of stability, we suggest that replacing of HU protein can occur very quickly when focused on the first 5 ns. Our results corroborate that Gp46 acts as an inhibitor of *Francisella* HU DNA-binding capacity.

3.3 Gp46 affects transcription levels of *pigR* and *hupB*

In EMSA experiment we have shown that Gp46 is able to block HU protein binding to dsDNA upstream *pigR* gene. In order to validate if this interaction could affect expression of *pigR* we used reverse transcription-PCR. As shown in Figure 3, plasmid-borne expression of Gp46 led to the decreased expression of *pigR* comparable to that in deletion mutant strain FSC200/ΔHU, which is in contrast to FSC200 strain. Moreover, we found out, that Gp46 alters the expression of *hupB* gene as well. The transcription level of *rpoA* which was used as a control based on previous experiments (Stojkova et al., 2018) remained unchanged.



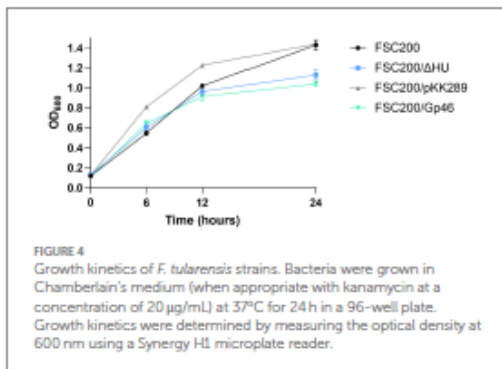
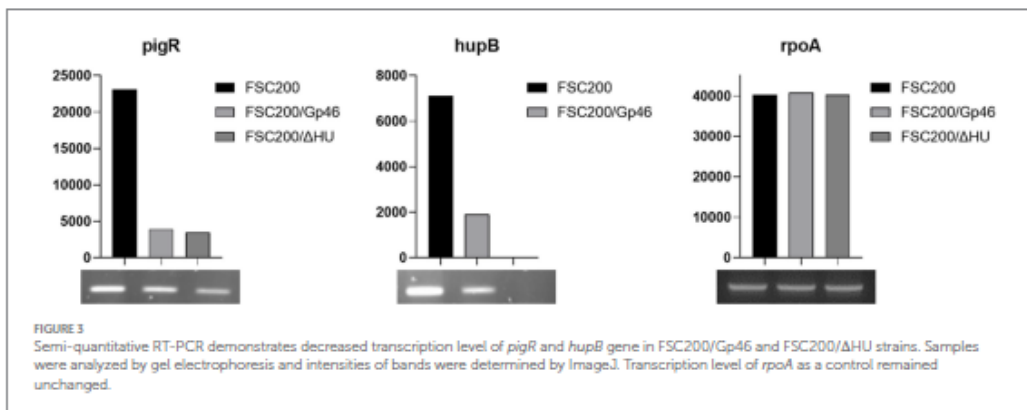
3.4 Bacteriophage SPO1 protein Gp46 alters the growth of *Francisella tularensis* similarly as does the HU protein deletion strain

To verify the biological relevance of Gp46 as an inhibitor of *F. tularensis* HU protein, we prepared a wild-type strain *F. tularensis* FSC200 expressing plasmid-borne Gp46 (FSC200/Gp46). First, the growth kinetics of FSC200/Gp46 were compared to those of the wild-type FSC200, deletion mutant FSC200/ Δ HU strains, and a strain FSC200/pKK289 expressing empty kanamycin resistant plasmid. Previously, we reported that the growth of the deletion mutant strain FSC200/ Δ HU was comparable to that of the wild-type strain FSC200, even if the mutant strain entered the stationary phase of growth earlier

(Stojkova et al., 2018). Here, we show that the growth of FSC200/Gp46 resembles that of the deletion mutant strain (Figure 4), which is in line with our hypothesis that Gp46 inhibits the HU protein.

3.5 *Francisella* wild-type strain expressing Gp46 shows similar growth defect in oxidative stress conditions as does the HU protein deletion strain

HU protein is known to protect the bacterium against oxidative stress. *Francisella* deletion mutant strain FSC200/ Δ HU is unable to withstand oxidative stress conditions, as we have previously published (Stojkova et al., 2018). Therefore, we tested whether the wild-type



strain expressing Gp46 shows the same phenotype under stressful growth conditions. We used CuCl_2 to induce the production of reactive oxygen species (ROS) and therefore oxidative stress growth conditions.

We found that the wild-type strain expressing Gp46 fails to grow adequately under conditions of oxidative stress, similar to the FSC200/ΔHU deletion mutant strain (Figure 5). Together with the other results of this study, we demonstrate that Gp46 inhibits HU protein action in *Francisella*. Additionally, using a control, wild-type strain carrying an empty kanamycin-resistant plasmid, we show here that this growth defect is not caused by the antibiotic or the plasmid used.

3.6 Gp46 Inhibits intracellular replication of *Francisella* in macrophages

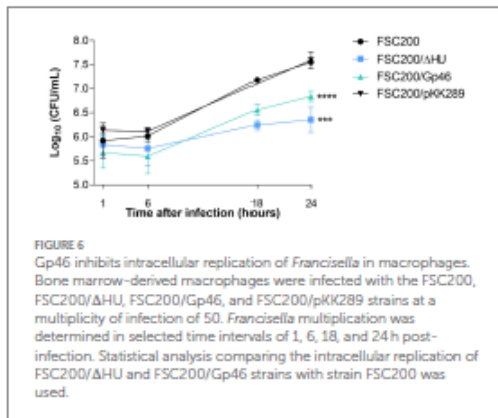
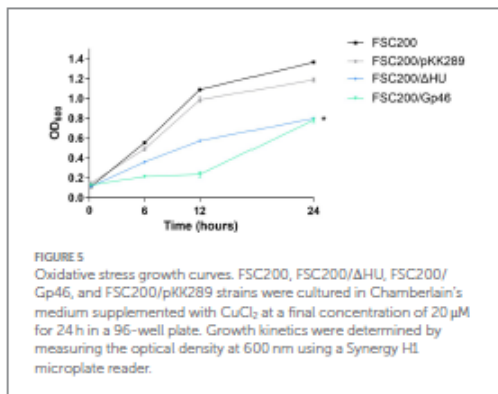
Our earlier study demonstrated that the deletion mutant strain lacking the HU protein replicated in mouse marrow-derived macrophages less effectively than the wild-type strain (Stojkova et al., 2018). If Gp46 blocks the functioning of the HU protein, we expected that the replication efficiency of the FSC200/Gp46 strain would be reduced in comparison to that of the wild-type strain and

approximately the same as that of the deletion mutant strain. BMMs were infected with the FSC200, FSC200/ΔHU, FSC200/Gp46, and FSC200/pKK289 strains at an MOI of 50. Time intervals of 1, 6, 18, and 24 h post-infection were selected for counting of *Francisella* multiplication. The logarithm of the number of viable bacteria (CFU/mL), depending on the time post-infection, is shown in Figure 6. The graph clearly demonstrates that the proliferation efficiency of FSC200 expressing plasmid-borne Gp46 was affected. The strain replicated less effectively than the wild-type strain, and the similarity with the deletion mutant strain was obvious. As was mentioned above the FSC200/Gp46 multiplication defect is not linked to the general growth defect. This is the first report to indicate that Gp46 diminishes the intracellular replication of *F. tularensis* in BMMs by inhibiting DNA binding with the HU protein.

4 Discussion

Based on a recent study of *B. subtilis* SPO1 bacteriophage protein Gp46 as a potential universal inhibitor of bacterial HU proteins (Zhang et al., 2022), we decided to verify whether Gp46 can also inhibit *F. tularensis* HU protein and thus could be used as an effective treatment against tularemia. We analyzed the possible interaction between *F. tularensis* HU protein and Gp46 using bioinformatic approaches. Using docking simulations (Figure 1), we showed that the *Francisella* HU protein interacts with Gp46 at the same location as the *B. subtilis* HU protein. Our analysis showed that the most stable non-bond types of interaction between the HU protein and Gp46 are predicted in amino acids that are necessary for the ability of HU proteins to bind DNA (R55, R58, and R61) (Figure 1).

Subsequently, RMSD analysis confirmed the greater stability of the HU protein–Gp46 complex than that of the unbound HU protein dimer (Figures 1C,D). Consequently, using the EMSA method, we tested whether *in vitro* DNA-binding function of HU protein is affected by Gp46. Three different PCR-amplified DNA fragments containing the HU protein's DNA binding motif, corresponding to the *pigR* gene (Figure 2A), a sequence upstream of the *pigR* gene (Figure 2B), and a sequence upstream of the *IL1β* gene (Figure 2C) were tested. The first two DNA fragments were chosen as possible sites



of bacterial DNA, where the HU protein affects *F. tularensis* virulence. Previously, we described the downregulation of *pigR* expression in ΔHU deletion mutant strains (Stojkova et al., 2018) and downregulation of *pigR* expression in *Francisella* strain with a point mutation in the sequence coding for HU protein (Pavlik and Spidlova, 2022). Both these mutations resulted in strain attenuation, confirming the essential role of PigR and HU in pathogenesis of *Francisella*. The latter was chosen as a possible part of eukaryotic DNA, where the HU protein may affect the host immune response during *F. tularensis* infection. The HU binding motif/s (Pavlik and Spidlova, 2022) were present in all three chosen sequences. We confirmed that Gp46 abolishes the DNA-binding ability of the HU protein in all three tested cases, and thus, we suggest that it can act as an inhibitor of *F. tularensis* HU protein. These results were supported by RMSD analysis of complex stability, where we identified that the complex of HU protein–DNA was more stable than the complex of HU protein–Gp46–DNA (Figures 2D–F), thus suggesting that Gp46 can displace DNA from the DNA binding site of the HU protein.

Further, we analyzed the expression levels of *pigR* as well as *hupB* (Figure 3) in wild-type strain FSC200, strain expressing plasmid-borne Gp46 (FSC200/Gp46), and deletion mutant strain FSC200/

ΔHU. Using reverse transcription-PCR we demonstrated that the expression of Gp46 in wild-type strain affects not only the transcription level of *pigR* which confirms our EMSA data (Figure 2B) but also the expression level of *hupB* gene. These results clearly confirmed the role of Gp46 as a HU protein inhibitor.

To contribute to the research on Gp46 as a cross-species bacterial inhibitor, we performed several *in vitro* and *in vivo* experiments. We compared the growth of *F. tularensis* wild-type strain FSC200, deletion mutant strain FSC200/ΔHU, FSC200/Gp46 expressing plasmid-borne Gp46, and FSC200/pKK289 expressing empty kanamycin resistant plasmid. We observed growth kinetics of FSC200/Gp46 similar to those of FSC200/ΔHU, suggesting that Gp46 inhibits the wild-type strain in a similar manner as deletion of the gene coding for HU protein (Figure 4). We also analyzed the resistance of wild-type strain expressing plasmid-borne Gp46 (FSC200/Gp46) to oxidative stress, because previously we showed that deletion of gene coding for HU protein significantly decreased the ability of bacterium to resist these stress growth conditions (Stojkova et al., 2018). In agreement with our hypothesis, that Gp46 blocks functioning of HU protein we observed increased sensitivity to oxidative stress growth conditions in wild-type strain FSC200 expressing plasmid-borne Gp46 (FSC200/Gp46) (Figure 5).

The intracellular replication ability of strain FSC200/Gp46 was also compared to that of the wild-type FSC200 and FSC200/ΔHU strains as well as to that of wild-type strain carrying empty kanamycin resistant strain FSC200/pKK289 (Figure 6). We found that FSC200/Gp46 replicates inside BMMs, similar to the deletion mutant strain. FSC200/ΔHU and FSC200/Gp46 were significantly attenuated *in vitro* compared with the wild-type strain and FSC200/pKK289. Here, we show the first evidence of the ability of Gp46 to negatively affect *F. tularensis* intracellular replication, and thus could influence its virulence. Based on these results, we suggested that Gp46 may also reduce *F. tularensis* viability during infection in mice, and might be used as an agent for tularemia treatment. However, we were unable to confirm this hypothesis *in vivo*. Mice infected with FSC200/Gp46 died comparably to those infected with virulent wild-type FSC200 strain (Supplementary Figure S3). Although our pilot *in vivo* experiment was not successful and all tested mice died, we hypothesize that the effect of Gp46 on virulence of *Francisella* needs to be further studied. We assumed that the expression of Gp46 could suppress *F. tularensis* HU protein, leading to the same phenotype as the deletion mutant strain FSC200/ΔHU. However, in our experimental setup, we were not able to ensure proper replication of the plasmid-carrying *gp46* gene. The absence of attenuation of virulence of FSC200/Gp46 in mice could be due to a lack of need to express the plasmid-borne *gp46* gene because i) no selective conditions are used (replication of plasmid is useless without the necessity to ensure resistance to kanamycin), and ii) it would be inconvenient for the bacterium (clones that do not replicate plasmid are selected preferentially because they grow better and are virulent). Stable integration of *gp46* gene into the FSC200 chromosome would be more appropriate for further studies of *in vivo* experiments.

Although our study contributes to the idea that Gp46 can be a universal inhibitor of HU proteins among bacterial species, its use as an effective bacterial disease treatment, at least in the case of tularemia, remains open to further study, as well as in other bacterial species. So

far the effect of Gp46 on *in vivo* inhibition of bacterial virulence has not been proven.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/Supplementary material.

Ethics statement

The animal study was approved by all experiments using mice were performed following guidelines of the Animal Care and Use Ethical Committee of the Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Czech Republic. The research protocol was approved by the ethics committee under project no. 121890/2021-1457 (3 May 2021). The study was conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements.

Author contributions

PS: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. ES: Methodology, Writing – original draft. PP: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing.

References

- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., et al. (2015). GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001
- Aki, T., Choy, H. E., and Adhya, S. (1996). Histone-like protein HU as a specific transcriptional regulator: co-factor role in repression of gal transcription by GAL repressor. *Genes Cells* 1, 179–188. doi: 10.1046/j.1365-2443.1996.d01-236.x
- Balandina, A., Claret, L., Hengge-Aronis, R., and Rouvière-Yantiv, J. (2001). The *Escherichia coli* histone-like protein HU regulates rpoS translation. *Mol. Microbiol.* 39, 1069–1079. Available at: doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02305.x
- Bell, B. L., Mohapatra, N. P., and Gunn, J. S. (2010). Regulation of virulence gene transcripts by the *Francisella tularensis* orphan response regulator PmrA: role of phosphorylation and evidence of MglA/SepA interaction. *Infect. Immun.* 78, 2189–2198. Available at: doi: 10.1128/IAI.00021-10
- Bhowmick, T., Ghosh, S., Dixit, K., Ganesan, V., Ramagopal, U. A., Dey, D., et al. (2014). Targeting *Mycobacterium tuberculosis* nucleoid-associated protein HU with structure-based inhibitors. *Nat. Commun.* 5, 4124. Available at: doi: 10.1038/ncomms5124
- Bonnefoy, E., and Rouvière-Yantiv, J. (1992). HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to oriC. *EMBO J.* 11, 4489–4496. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05550.x
- Bönquist, L., Lindgren, H., Golovtsov, I., Galna, T., and Sjöstedt, A. (2008). MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infect. Immun.* 76, 3502–3510. Available at: doi: 10.1128/IAI.00226-08
- Brotcke, A., Weiss, D. S., Kim, C. C., Chait, P., Malfatti, S., Garcia, E., et al. (2006). Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 74, 6642–6655. Available at: doi: 10.1128/IAI.01250-06
- Celli, J., and Zahrt, T. C. (2013). Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3. Available at: doi: 10.1101/cshperspect.a010314
- Chamberlain, R. E. (1965). Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 13, 232–235. doi: 10.1128/am.13.2.232-235.1965
- Charity, J. C., Costante-Hamm, M. M., Balon, E. L., Boyd, D. H., Rubin, E. J., and Dove, S. L. (2007). Twin RNA polymerase-associated proteins control virulence gene expression in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 3:e84. Available at: doi: 10.1371/journal.ppat.0030084
- Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., Hayes, S. F., and Celli, J. (2006). Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14578–14583. doi: 10.1073/pnas.0601838103
- Clemens, D. L., Lee, B.-Y., and Horwitz, M. A. (2018). The *Francisella* type VI secretion system. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:121. Available at: doi: 10.3389/fcimb.2018.00121
- Comforte, V. P., Malamud, F., Yaryura, P. M., Toum Terrones, L., Torres, P. S., de Pina, V., et al. (2018). The histone-like protein HupB influences biofilm formation and virulence in *Xanthomonas citri* ssp. *citri* through the regulation of flagellar biosynthesis. *Mol. Plant Pathol.* 20(0). Available at: 589–598. doi: 10.1111/mpp.12777
- Cuthbert, B. J., Ross, W., Rohlfing, A. E., Dove, S. L., Gourse, R. L., Brennan, R. G., et al. (2017). Dissection of the molecular circuitry controlling virulence in *Francisella tularensis*. *Genes Dev.* 31, 1549–1560. Available at: doi: 10.1101/gad.303701.117
- Dennis, D. T., Inglesby, T. V., Henderson, D. A., Bartlett, J. G., Ascher, M. S., Eitzen, E., et al. (2001). Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285, 2763–2773. doi: 10.1001/jama.285.21.2763
- Ferrández, M.-J., Carreño, D., Ayora, S., and de la Campa, A. G. (2018). HU of *Streptococcus pneumoniae* is essential for the preservation of DNA supercoiling. *Front. Microbiol.* 9:493. doi: 10.3389/fmicb.2018.00493
- Grosdidier, A., Zoete, V., and Michielin, O. (2011). Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *J. Comput. Chem.* 32, 2149–2159. Available at: doi: 10.1002/jcc.21797

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the Ministry of Defence of the Czech Republic – DRO of the University of Defence, Faculty of Military Health Sciences Hradec Kralove, Czech Republic – Medical issues of WMD II (DZRO-FVZ22-ZHN II).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1330109/full#supplementary-material>

- Guan, Z., Wang, Y., Gao, L., Zhang, W., and Lu, X. (2018). Effects of the histone-like protein HU on cellulose degradation and biofilm formation of *Cytophaga hutchinsonii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 6593–6611. Available at: doi: 10.1007/s00253-018-9071-9
- Lauriano, C. M., Barker, J. R., Yoon, S. S., Nano, E. E., Arulanandam, B. P., Hassett, D. J., et al. (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4246–4249. doi: 10.1073/pnas.0307690101
- Lemkul, J. A. (2019). From proteins to perturbed Hamiltonians: a suite of tutorials for the GROMACS-2018 molecular simulation package [article v1.0]. *Living J. Comp. Molecular Sci.* 1:5068. doi: 10.33011/livcoms.1.1.5068
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Ö Crötnin, T., Fitzgerald, S., Hinton, J. C. D., and Dorman, C. J. (2011). Nucleoid-associated protein HU controls three regulons that coordinate virulence, response to stress and general physiology in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Microbiology* 157, 1075–1087. Available at: doi: 10.1099/mic.0.046359-0
- McCoy, G. W., and Chapin, C. W. (1912). Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, bacterium tularensis. *J. Infect. Dis.* 10, 61–72. doi: 10.1093/infdis/10.1.61
- Mohapatra, N. P., Soni, S., Bell, B. L., Warren, R., Ernst, R. K., Muszynski, A., et al. (2007). Identification of an orphan response regulator required for the virulence of *Francisella* spp. and transcription of pathogenicity island genes. *Infect. Immun.* 75, 3305–3314. Available at: doi: 10.1128/IAI.00351-07
- Oberto, J., Nabti, S., Jooste, V., Mignot, H., and Rouvière-Yaniv, J. (2009). The HU regulon is composed of genes responding to anaerobiosis, acid stress, high osmolarity and SOS induction. *PLoS One* 4:e4367. Available at: doi: 10.1371/journal.pone.0004367
- Pavlik, P., Jost, P., Rehulka, P., Vozandychova, V., Litnik, M., and Spidlova, P. (2023). Epigallocatechin gallate inhibits *Francisella tularensis* growth and suppresses the function of DNA-binding protein HU. *Microb. Pathog.* 176:105999. Available at: doi: 10.1016/j.micpath.2023.105999
- Pavlik, P., and Spidlova, P. (2022). Arginine 58 is indispensable for proper function of the *Francisella tularensis* subsp. holarctica FSC200 HU protein, and its substitution alters virulence and mediates immunity against wild-type strain. *Virulence*. Available at: doi: 10.1080/21505594.2022.2132729 13, 1790–1809. doi: 10.1080/21505594.2022.2132729
- Phan, N. Q., Uebanso, T., Shimohata, T., Nakahashi, M., Mawatari, K., and Takahashi, A. (2015). DNA-binding protein HU coordinates pathogenicity in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 197, 2958–2964. doi: 10.1128/JB.00306-15
- Preobrajenskaya, A., Boullard, A., Boubrik, E., Schnarr, M., and Rouvière-Yaniv, J. (1994). The protein HU can displace the LexA repressor from its DNA-binding sites. *Mol. Microbiol.* 13, 459–467. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00440.x
- Priyadarshini, R., Cugini, C., Arndt, A., Chen, T., Tjokro, N. O., Goodman, S. D., et al. (2013). The nucleoid-associated protein HU β affects global gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology* 159, 219–229. Available at: doi: 10.1099/mic.0.061002-0
- Ramsey, K. M., and Dove, S. L. (2016). A response regulator promotes *Francisella tularensis* intramacrophage growth by repressing an anti-virulence factor. *Mol. Microbiol.* 101, 688–700. doi: 10.1111/mmi.13418
- Ramsey, K. M., Osborne, M. L., Vvedenskaya, I. O., Su, C., Nickels, B. E., and Dove, S. L. (2015). Ubiquitous promoter-localization of essential virulence regulators in *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 11:1004793. doi: 10.1371/journal.ppat.1004793
- Soteras Gutiérrez, I., Lin, F. Y., Vanommeslaeghe, K., Lemkul, J. A., Armacost, K. A., Brooks, C. L. III, et al. (2016). Parametrization of halogen bonds in the CHARMM general force field: improved treatment of ligand–protein interactions. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 4812–4825. Available at: doi: 10.1016/j.bmc.2016.06.034
- Spidlova, P., Stojkova, P., Dankova, V., Sentikova, I., Santic, M., Pinkas, D., et al. (2018). *Francisella tularensis* D-ala D-ala carboxypeptidase DacD is involved in intracellular replication and it is necessary for bacterial Cell Wall Integrity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8:111. doi: 10.3389/fcimb.2018.00111
- Spidlova, P., Stojkova, P., Sjøstedt, A., and Stulik, J. (2020). Control of *Francisella tularensis* virulence at gene level: network of transcription factors. *Microorganisms* 8:1622. Available at: doi: 10.3390/microorganisms8101622
- Spidlova, P., and Stulik, J. (2017). *Francisella tularensis* type VI secretion system comes of age. *Virulence* 8, 628–631. Available at: doi: 10.1080/21505594.2016.1278336
- Stojkova, P., Spidlova, P., Lenco, J., Rehulka, H., Kratka, L., and Stulik, J. (2018). HU protein is involved in intracellular growth and full virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence* 9, 754–770. Available at: doi: 10.1080/21505594.2018.1441588
- Stojkova, P., Spidlova, P., and Stulik, J. (2019). Nucleoid-associated protein HU: a Lilliputian in gene regulation of bacterial virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9:159. doi: 10.3389/fcimb.2019.00159
- van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., and Berendsen, H. J. C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* 26, 1701–1718. Available at: doi: 10.1002/jcc.20291
- Vanommeslaeghe, K., Hatcher, E., Acharya, C., Kundu, S., Zhong, S., Shit, J., et al. (2010). CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J. Comput. Chem.* 31, 671–690. Available at: doi: 10.1002/jcc.21367
- Vanommeslaeghe, K., and MacKerell, A. D. Jr. (2012). Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) I: bond perception and atom typing. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 3144–3154. Available at: doi: 10.1021/ci300363c
- Vanommeslaeghe, K., Raman, E. P., and MacKerell, A. D. Jr. (2012). Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges. *J. Chem. Inf. Model.* 52, 3155–3168. Available at: doi: 10.1021/ci3003649
- Wang, J., Cieplak, P., and Kollman, P. A. (2000). How well does a restrained electrostatic potential (RESP) model perform in calculating conformational energies of organic and biological molecules? *J. Comput. Chem.* 21, 1049–1074. doi: 10.1002/1096-987X(200009)21:12<1049::AID-JCC3>3.0.CO;2-F
- Yan, Y., Tao, H., He, J., and Huang, S. Y. (2020). The HDock server for integrated protein–protein docking. *Nat. Protoc.* 15, 1829–1852. Available at: doi: 10.1038/s41596-020-0312-x
- Zhang, P., Zhao, X., Wang, Y., du, K., Wang, Z., Yu, L., et al. (2022). Bacteriophage protein Cp46 is a cross-species inhibitor of nucleoid-associated HU proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119:e2116278119. Available at: doi: 10.1073/pnas.2116278119