

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD

**IDENTIFIKACE NOVÝCH FAKTORŮ VIRULENCE  
INTRACELULÁRNÍHO PATOGENA *FRANCISELLA TULARENSIS***

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Autor: Mgr. Věra DAŇKOVÁ**

Vedoucí disertační práce: Doc. Ing. Barbora SZOTÁKOVÁ, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Adéla STRAŠKOVÁ, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy, grant č. 160/50/15011, grantu č. SVV 260065 a DTRA projektu D-CZ-10-00001.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svým školitelům Doc. Ing. Barboře Szotákové, Ph.D. a prof. MUDr. Jiřímu Stulíkovi, CSc. a odborným konzultantům Mgr. Adéle Straškové, Ph.D. a PharmDr. Lukáši Červenému, Ph.D za vedení mého postgraduálního studia, cenné rady a podnětné návrhy při řešení výzkumných úkolů. Děkuji za spolupráci svým kolegům a přátelům z Ústavu molekulární patologie, kteří mi při mé práci pomáhali a vytvářeli přátelské prostředí po celou dobu mého studia. Velké poděkování za podporu a trpělivost v průběhu celého studia patří mé rodině a všem mým nejbližším.

*„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením své konzultantky a školitelky). 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.“*

**ABSTRAKT****Univerzita Karlova v Praze****Farmaceutická fakulta v Hradci Králové****Katedra biochemických věd****Kandidát:**

Mgr. Věra Daňková

**Školitel:**

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

**Název disertační práce:**IDENTIFIKACE NOVÝCH FAKTORŮ VIRULENCE INTRACELULÁRNÍHO PATOGENA *FRANCISELLA TULARENSIS*

Předložená disertační práce je zaměřena na studium úlohy bakteriálních tetratricopeptide repeat-like (TPR-like) proteinů v patogenesi infekce. Modelovým organismem byla zvolena vysoce virulentní intracelulární bakterie *Francisella tularensis*, jejíž mechanismus patogenese není doposud plně objasněn.

V první části disertační práce byly na základě bioinformatických studií identifikovány tři geny (*FTS\_0201*, *FTS\_1680*, a *FTS\_0778*) s predikovanou TPR-like doménou. Pro přípravu mutantních kmenů vybraných genů byla využita mutagenese TargeTron. Připravené mutantní kmeny byly použity pro studium role vybraných proteinů v patogenitě a imunogenitě *F. tularensis* s využitím *in vitro* a *in vivo* modelů a dále pro studium zapojení těchto proteinů v adaptačních mechanismech na stres. Z výsledků disertační práce bylo zjištěno, že protein *FTS\_1680* je významný pro intracelulární replikaci a plnou virulenci bakterie. Dále byla zaznamenána snížená schopnost proliferace mutantních bakterií *inFTS\_1680/200* v *in vivo* systému s následnou eliminací těchto bakterií z orgánů myši kmene BALB/c. S využitím proteomického přístupu byl *FTS\_1680* identifikován jako membránově asociovaný protein. V neposlední řadě byla testována schopnost adaptace mutantních bakterií na stresové podmínky, kdy byla prokázána významná role *FTS\_1680* proteinu v adaptaci na teplotní stres. Dále byla prokázána schopnost *inFTS\_1680/200* vyvolat plnohodnotnou protekci proti virulentnímu kmeni *FSC200* a to díky schopnosti vyvolávat brzkou imunitní zánětlivou odpověď. Zapojením imunoproteomického přístupu jsme určili profil bakteriálních povrchových proteinů rozpoznávaných myšími séry po imunizaci a infekci virulentním kmenem a jejich srovnáním jsme identifikovali nové *FSC200* imunoreaktivní antigeny.

Výsledky disertační práce rozšířily znalost faktorů virulence *F. tularensis* a přispěly tak k možnému objasnění mechanismů virulence. Dále byly identifikovány nové imunoreaktivní antigeny, které by mohly být využity pro tvorbu podjednotkové vakcíny.

**ABSTRACT****Charles University in Prague****Faculty of Pharmacy in Hradec Králové****Department of Biochemical Sciences****Candidate:**

Mgr. Věra Daňková

**Supervisor:**

Doc. Ing. Barbora Szotáková, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis:

IDENTIFICATION OF NEW VIRULENCE FACTORS IN INTRACELULAR PATHOGEN *FRANCISELLA TULARENSIS*

This dissertation thesis is focused on the role of bacterial tetratricopeptide repeat-like (TPR-like) e proteins in the pathogenesis of infections. As a model organism we have chosen highly virulent intracellular bacterium *Francisella tularensis* (*F. tularensis*), whose mechanism of pathogenesis is not completely described.

In the first part of dissertation thesis we took advantage of bioinformatic methods and identified three genes (*FTS\_0201*, *FTS\_1680*, and *FTS\_0778*) with predicted TPR-like domains. Mutants defective in protein expression were prepared by TargeTron insertion mutagenesis. Prepared mutant strains were used for studying the role of selected proteins in pathogenicity and immunogenicity of *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain employing *in vivo* and *in vitro* models and further for studying the involvement of these proteins in stress tolerance. Our results showed that the *FTS\_1680* protein is required for intracellular replication and full virulence of bacterium. We also described impaired ability of *inFTS\_1680/200* mutant bacteria to proliferate in *in vivo* system followed by elimination of these bacteria from BALB/c mice organs. Employing proteomic approaches we identified the protein *FTS\_1680* as a membrane associated protein. Moreover ability of mutant bacteria to adapt to stress conditions was tested. We showed that the protein *FTS\_1680* plays an important role in stress tolerance. We also determined the immunoprotective capacity of the vaccination with the *inFTS\_1680/200* mutant against challenge with the virulent FSC200 strain. The results revealed that the ability of the *inFTS\_1680/200* mutant to induce an early innate inflammatory response is crucial for its protective potential. Finally, using immunoproteomic approach we defined the profile of *Francisella* membrane proteins recognized

by post-vaccination and post-challenge sera and by their comparison we determined novel immunoreactive FSC200 antigens.

The obtained results extend the knowledge of *F. tularensis* virulence factors and thus contributed to possible elucidation of virulence mechanisms. Further, we identified novel immunoreactive antigens useful for a subunit vaccine design.

**OBSAH**

1. ÚVOD.....	11
2. TEORETICKÝ PŘEHLED.....	12
2.1. <i>Francisella tularensis</i> .....	12
2.1.1. Tularémie.....	12
2.1.2. Osud <i>F. tularensis</i> uvnitř hostitelské buňky .....	13
2.1.3. Imunita a odpověď hostitele na <i>F. tularensis</i> .....	14
2.1.4. Faktory virulence .....	15
2.1.4.1. Ostrov patogenity.....	15
2.1.4.2. Metabolismus.....	15
2.1.4.3. Povrchové struktury .....	16
2.1.4.4. Glykosylace proteinů.....	16
2.2. TPR proteiny ve vztahu k bakteriální virulenci .....	18
2.2.1. Proteiny T3SS s TPR motivem.....	19
2.2.2. Další virulentní faktory obsahující TPR motiv.....	20
2.3. Molekulární chaperony ve virulenci bakteriálních patogenů.....	20
2.4. Co-chaperony .....	22
3. CÍLE PRÁCE.....	24
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	25
4.1. Bakteriální kmeny, plasmidy a podmínky kultivace .....	25
4.2. TargeTron inserční mutagenese.....	26

---

4.3.	Funkční komplementace .....	28
4.4.	Infekce a kultivace primárních makrofágů .....	28
4.5.	Infekce a studium virulence na myších kmene BALB/c .....	29
4.6.	Kolokalizace <i>F. tularensis</i> s LAMP-1 v primárních buňkách .....	29
4.7.	Test cytotoxicity na primárních makrofázích .....	30
4.8.	Studium protektivního charakteru mutantního kmene <i>in vivo</i> .....	30
4.9.	Studium orgánové distribuce <i>in vivo</i> .....	30
4.10.	Protilátkové a cytokinové analýzy .....	31
4.11.	Přežívání bakterií za stresových podmínek .....	31
4.12.	Bakteriální adenylátcyklasový systém .....	31
4.13.	Separace pomocí tritonu X-114 .....	32
4.14.	Příprava frakce obohacené o pilinové proteiny .....	32
4.15.	Dvourozměrná gelová elektroforesa .....	32
4.16.	Hmotnostní analýza a identifikace proteinu .....	33
5.	VÝSLEDKY .....	34
5.1.	Výběr vhodných kandidátů pro přípravu bakteriálních mutantních kmenů .....	34
5.2.	Schopnost replikace TPR-like proteinů uvnitř makrofágů .....	35
5.3.	Studium virulence TPR-like proteinů na myším infekčním modelu .....	36
5.4.	Popis genového lokusu obklopujícího gen <i>FTS_1680</i> .....	38
5.5.	Schopnost úniku <i>inFTS_1680</i> z fagosomu hostitelské buňky .....	38
5.6.	Role proteinu <i>FTS_1680</i> v buněčné cytopatogenitě indukované mikroblem <i>F. tularensis</i> .....	39
5.7.	Studium protektivního charakteru mutantního kmene <i>inFTS_1680</i> .....	40

---

5.8.	Schopnost eliminace <i>inFTS_1680</i> mutantního kmene z myších orgánů .....	41
5.9.	Analýza IFN- $\gamma$ u myší kmene BALB/c po subkutánní infekci <i>inFTS_1680</i> .....	43
5.10.	Protilátkový profil v sérech myší kmene BALB/c po subkutánní infekci <i>inFTS_1680</i> .....	45
5.11.	Mapování imunoproteomu po imunizaci <i>inFTS_1680</i> a infekci FSC200 .....	47
5.12.	FTS_1680 a jeho role v adaptaci <i>F. tularensis</i> na stresové faktory .....	52
5.13.	Analýza protein-proteinových interakcí proteinu FTS_1680.....	53
5.14.	Lokalizace proteinu FTS_1680 .....	53
6.	DISKUSE .....	56
7.	ZÁVĚR .....	62
8.	LITERATURA.....	63
9.	PŘÍLOHY .....	70
9.1.	Publikace vztahující se k tématu disertační práci.....	70
	Publikace I .....	70
	Publikace II .....	70
9.2.	Ostatní publikace v recenzovaných časopisech .....	93

## 1. ÚVOD

*Francisella tularensis* (*F. tularensis*) je fakultativní intracelulární patogen, který je schopen růstu uvnitř hostitelských buněk. Tato vysoce infekční bakterie je původcem onemocnění nazývaného tularémie. Pro profylaxi tularémie není dostupná žádná vakcína, která by měla licenci pro humánní použití. Naše znalosti týkající se molekulárních mechanismů virulence *F. tularensis* zůstávají z velké části neúplné a to i přes identifikaci nových faktorů virulence. Nedostatek těchto informací znemožňuje odhalení strategie vnitrobuněčného přežívání tohoto mikroba a s tím spojeného vývoje účinné a bezpečné vakcíny (1). Proteiny obsahující TPR motivy jsou zapojeny v celé řadě buněčných funkcí, včetně těch, které se účastní bakteriální patogenese (2, 3). Důležitou roli hrají především v translokaci faktorů virulence do hostitelských buněk, dále pak v přilnutí bakterie na hostitelskou buňku a v neposlední řadě se uplatňují v blokaci vyžrávání fagolysosomu (4-7).

Účast TPR-like proteinů v bakteriální patogenesi byla prokázána v řadě intracelulárních patogenů včetně *F. tularensis* (8). Bylo prokázáno, že v případě TPR proteinů pouze bodová mutace genu kódujícího jednu z konzervovaných aminokyselin může vést ke ztrátě biologických funkcí těchto proteinů. Bodové mutace tedy mohou vést ke vzniku oslabeného kmene, avšak při zachování exprese všech imunogenních proteinů (5, 9). Výzkum TPR proteinů je tedy velmi zajímavý i z hlediska hledání vhodných kandidátů pro vývoj nových vakcín. V předkládané disertační práci jsme nejprve pomocí bioinformatických studií vybrali vhodné proteiny s TPR-like doménou a dále jsme se zaměřili na studium jejich možné role ve virulenci *F. tularensis*.

## 2. TEORETICKÝ PŘEHLED

### 2.1. *Francisella tularensis*

*Francisella tularensis* (*F. tularensis*) je charakterizována jako Gram-negativní, fakultativně intracelulární patogen, který způsobuje onemocnění nazývané tularémie. *F. tularensis* byla poprvé identifikována v oblasti Tulare Country, v Kalifornii v roce 1911 jako původce smrtelné nákazy u hlodavců (syslů; *Spermophilus beecheyi*). Krátce poté byla izolována, kultivována a pojmenována *Bacterium tularense* (10). V roce 1922, izoloval Edward Francis bakterii z krve pacientů a onemocnění, které způsobovala, označil pod názvem tularémie. Dále se Dr. Francis zasloužil o charakterizaci bakterie, popsal symptomy onemocnění a potvrdil také možnost přenosu tularémie krevsajícím hmyzem nebo z infikovaných zvířat na člověka. Na počest práce Dr. Francise byla bakterie pojmenována rodovým jménem *Francisella*.

*F. tularensis* patří do třídy gama-proteobakterií řádu *Thiotrichales*. Rodina *Francisellaceae* zahrnuje pouze jeden rod *Francisella*, který se dále dělí na tři subtypy: *Francisella tularensis*, *Francisella novicida* a *Francisella philomiragia*. Dále existují 3 úzce příbuzné poddruhy *F. tularensis*, jejichž genom je vysoce konzervovaný, avšak liší se svou virulencí. Jedná se o poddruhy *tularensis* (typ A), *holarctica* (typ B) a *mediasiatica* (11). V důsledku extrémní virulence, nízké infekční dávky, snadnému šíření ve formě aerosolu a schopnosti vyvolat závažné onemocnění až úmrtí byla *F. tularensis* zařazena Americkým centrem pro kontrolu a prevenci onemocnění (US Center for Disease Control and Prevention) mezi bioteroristicky zneužitelné agens kategorie A (1, 12, 13).

#### 2.1.1. Tularémie

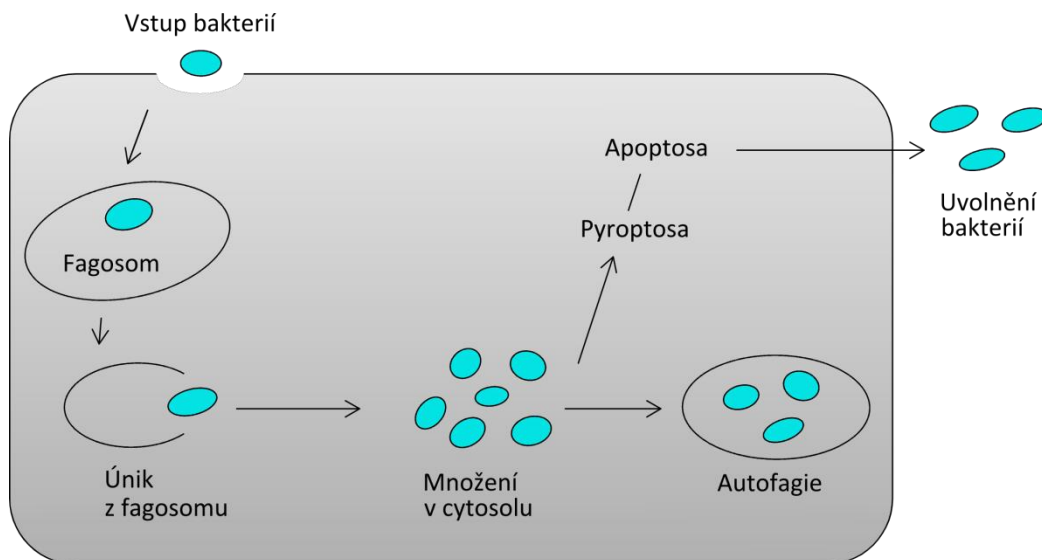
*F. tularensis* je schopna vstoupit do organismu různými cestami včetně požití kontaminovaného jídla nebo vody, inhalací aerosolu obsahujícího bakterie, kontaktem s infikovanými zvířaty, především zajíci, nebo skrze přenašeče jakými jsou klíšťata, mouchy a komáři. Tularémie je akutní horečnaté onemocnění, které se projevuje symptomy podobnými chřipce. V závislosti na vstupu infekce existuje několik projevů tularémie. Nejběžnější formou je ulceroglandulární, ke které dochází průnikem infekce přes kůži (14). Méně běžnou formou je okuloglandulární tularémie, kdy k infekci dochází skrze spojivky (15). Pozření infikovaného jídla může vyústit v orofaryngeální nebo gastrointestinální formu tularémie (16). Poslední a nejméně běžnou formou je plicní tularémie, ke které může dojít inhalací bakterií ve formě aerosolu, případně může vzniknout sekundární plicní infekce, a to díky orgánové

diseminaci bakterií z jiného místa infekce. Inhalace pouhých deseti bakterií vysoce virulentního kmene je dostačující pro vznik a rozvoj onemocnění u lidí, kdy 30-60% neléčených infekcí může mít fatální důsledky (13).

### 2.1.2. Osud *F. tularensis* uvnitř hostitelské buňky

Znalost klíčových faktorů virulence je doposud limitována, ale i přesto je zřejmé, že schopnost vstupu, přizpůsobení se vnitřnímu prostředí buňky a následné množení uvnitř hostitelských buněk je stěžejní pro patogenesi *F. tularensis*. *Francisella* je schopna přežít a množit se v různých buněčných typech včetně fagocytujících (makrofágy, dendritické buňky a B buňky) a nefagocytujících buněk (hepatocyty, plicní epiteliální buňky) (17, 18).

Předpokládá se, že makrofágy představují důležitý cíl při vstupu bakterie do organismu (19). *Francisella* vstupuje do makrofágů procesem nazývaným "looping" fagocytosa, kdy výběžky membrány hostitelské buňky tvoří asymetrické smyčky, které zajišťují následné pohlčení bakterie (20). Obecně, pohlčené bakterie postupně prochází endocytickým vývojovým stádiem v podobě časného a pozdního endosomu, završeným fúzí fagosomu s lysosomem, za vzniku fagolysosomu, kde dochází k degradaci mikroorganismů (21, 22). Aby se *F. tularensis* jako úspěšný intracelulární patogen vyhnula tomuto procesu, byla nucena vyvinout strategie sloužící k rychlému úniku z fagosomu do cytosolu. V cytosolu se následně bakterie množí do značného počtu a v pozdní fázi infekce dochází k indukci apoptosy infikovaných buněk. Popsaný cyklus je ukončen narušením buněčné stěny a následnou infekcí sousedních buněk (23) (Obr. 1). Kromě množení v cytosolu a indukce buněčné smrti hostitele je *Francisella* schopna v pozdějších fázích infekce přetrvávat ve vakuolách nazvaných "*Francisella*-containing autophagic vacuoles", jejichž dvojité membrána je mikroskopicky podobná autofagosomu (24, 25).



**Obr. 1 Osud *F. tularensis* uvnitř hostitelské buňky.** Po vstupu do hostitelských buněk jsou bakterie *F. tularensis* pohlceny fagosomem. Před fúzí fagosomu s lysosomem dochází k úniku bakterií do cytosolu a jejich následnému množení. V pozdní fázi infekce bakterie vstupují do organel podobných autofagosomu a nazývaných “Francisella-containing autophagic vacuoles”, případně indukují pyroptosu či apoptosu hostitelských buněk. Nakonec *F. tularensis* opouští hostitelskou buňku a pokračuje v infekci sousedních buněk.

### 2.1.3. Imunita a odpověď hostitele na *F. tularensis*

Imunitní odpověď hostitele na proteinové antigeny *F. tularensis* je Th1 buněčného typu a má mnoho společných charakteristik s imunitní odpovědí na antigeny ostatních intracelulárních patogenů (26). Prvotní indukce prozánětlivých cytokinů a cytokinů Th1-typu stimuluje buňky vrozené imunity jako jsou makrofágy, neutrofilů a dendritické buňky. Tyto buňky jsou zodpovědné za primární kontrolu bakteriálních počtů a stimulaci produkce řady cytokinů jako jsou IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-12 (27, 28). Klíčovým cytokinem v boji proti infekci je IFN- $\gamma$ , který rozhoduje o průběhu a výsledku infekce v časně fázi. Hlavním zdrojem IFN- $\gamma$  jsou aktivované NK buňky a T buňky (29). Ke zvýšení produkce IFN- $\gamma$  v časně fázi infekce přispívá TNF- $\alpha$  spolu s IL-12, které tak pomáhají kontrolovat intracelulární infekci. Efektivní propojení vrozené a získané imunity v boji proti tularémii je zajišťováno dendritickými buňkami, které představují profesionální antigen prezentující buňky. Bylo zjištěno, že *Francisella* indukuje aktivaci dendritických buněk, které pak slouží ke vstupu a proliferaci bakterie (30). Dlouhodobá protektivní imunita je zajišťována CD4+ a CD8+ T buňkami. Oba buněčné subtypy uvolňují IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , a tím kontrolují růst bakterie uvnitř makrofágů (31). Důležitou roli

proti tularemické infekci hrají také sérové protilátky a B buňky, avšak pro optimální protektivní odpověď jsou nezbytné především T buňky.

### 2.1.4. Faktory virulence

Mikroorganismy jsou vybaveny faktory virulence, které se zapojují v procesech vstupu a množení bakterie uvnitř hostitelských buněk a následně v úniku bakterie před buněčnou imunitní odpovědí organismu. Navzdory vysoké virulenci *F. tularensis* nebyly doposud nalezeny geny zodpovědné za produkci exotoxinů a v tomto kontextu je pravděpodobné, že patogenita bakterie se odvíjí především od schopnosti bakterie množit se uvnitř hostitelských buněk a tím způsobovat rozpad napadených tkání a selhání orgánů. Z historického hlediska byl výzkum zaměřen na relativně přístupné povrchové struktury, jakými jsou kapsula a lipopolysacharid. Nicméně, největší pokrok na poli mapování faktorů virulence u bakterie *Francisella* nastal s kompletním osekvenováním genomu spolu s rozvojem příslušných genetických přístupů.

#### 2.1.4.1. Ostrov patogenity

Ostrov patogenity označovaný jako FPI (*Francisella* pathogenicity island) je DNA oblast o velikosti 33 kb, identifikovaný uvnitř genomu *F. tularensis* (32). FPI region je mezidruhově vysoce konzervován a vyskytuje se ve dvou kopiích ve všech poddruzích *F. tularensis*, avšak u *F. novicida* a *F. philomiragia* je zastoupen pouze v jedné kopii (32). Postupná mutagenese genů kódujících FPI potvrdila, že většina z nich (především geny *igl* a *pdp* lokusů) se podílí na bakteriální virulenci (33). Obecně se předpokládá, že všechny proteiny kódované FPI geny se aktivně účastní v boji proti obranným mechanismům hostitele, avšak jejich přesná role v patogenesi infekce je stále nejasná.

#### 2.1.4.2. Metabolismus

Studie genomu odhalily několik faktorů virulence spojených s metabolickými a nutričními funkcemi bakterie. Dráha syntézy aromatických aminokyselin byla identifikována jako klíčová pro virulenci *F. tularensis*. Inaktivací téměř všech genů této dráhy (např. geny *aroG* a *aroE1*) dochází ke snížení virulence. Tato skutečnost poukazuje na omezenou dostupnost aromatických aminokyselin v hostitelských podmínkách. Mutantní kmeny, u nichž byla eliminována schopnost syntézy purinů *de novo* (např. geny *deoB*, *purA*, *purMCD*, *purL*, *purF*), se vyznačují omezenou replikací uvnitř hostitelských buněk, což taktéž naznačuje sníženou koncentraci purinů uvnitř makrofágů

infikovaného organismu. Intracelulární studie transkriptomu odhalily významné změny v expresi genů kódujících enzymy zapojené do metabolismu sacharidů, stejně tak jako geny pro transport aminokyselin a sacharidů. Proto tedy lze vnímat význam nutriční ve virulenci *F. tularensis* jako jemnou rovnováhu mezi schopností získávat živiny od hostitele (transport) a regulací metabolismu hostitele, v závislosti na množství dostupných živin. Je známo, že cytosol hostitelských buněk je využíván jako zdroj nutričních látek pro invazní bakterie. Jediný přímý důkaz využití živin z cytosolu hostitele u *F. tularensis* existuje pro tripeptid glutathion ( $\gamma$ -glu-cys-gly), což je pochopitelné díky závislosti *Francisella* na vysoké koncentraci cysteinu. Abychom plně pochopili propojení mezi metabolismem a virulencí *F. tularensis*, je zapotřebí propojit systematickou mutagenesi genů zapojených do metabolických drah s biochemickou a biofyzikální charakterizací metabolických schopností bakterie.

### 2.1.4.3. Povrchové struktury

Genom *F. tularensis* kóduje několik předpokládaných lokusů biogeneze polysacharidů a polypeptidů, které se pravděpodobně uplatňují v glykosylaci proteinů, biogenezi lipopolysacharidu (LPS) a produkci kapsuly. Význam těchto povrchových struktur ve virulenci *F. tularensis* byl již jasně prokázán. LPS je komponentou vnější membrány Gram-negativních bakterií a je zodpovědný za její organizaci a stabilitu. Struktura LPS O-antigenu se ukázala být významnou pro intracelulární přežívání bakterie. Mutanty O-antigenu, zejména genů wbt klastru, vykazují obecně sníženou intracelulární multiplikaci a jejich zvýšená citlivost k séru je alespoň částečně zodpovědná za sníženou virulenci u myši (34-36). Existence a struktura kapsuly jsou pak stále předmětem diskuse. Lokus *capBCA* je předpokládaným klastrem biogeneze kapsuly. Geny tohoto lokusu vykazují značnou homologii s geny lokusu *capBCADE* *Bacillus anthracis*, zodpovědných za syntézu kapsulárního Poly  $\gamma$ -glutamátu (PGA)(33). *In vivo* a *in vitro* studie selektivních mutantů pro tyto geny prokázaly, že geny *capA*, *capB* a *capC* se uplatňují v patogenesi (37-39). Avšak teprve další studie budou moci definitivně potvrdit funkční roli lokusu *capBCA* při tvorbě kapsuly.

### 2.1.4.4. Glykosylace proteinů

Glykosylace je jednou z nejčastějších forem posttranslačních modifikací. Jedná se o enzymatický proces, kdy jsou cukry (monosacharidy či oligosacharidy) připojovány k proteinům za vzniku bíčků, pilinů případně adhesinů nebo LPS (40, 41). Dvěma hlavními glykosylačními mechanismy je N-glykosylace a O-glykosylace, z nichž O-glykosylace je nejběžnější u prokaryot. Výzkumu

zaměřenému na glykosylaci proteinů byla věnována velká pozornost v průběhu posledního desetiletí, především díky prohloubení znalostí ve vztahu glykosylace a bakteriální virulence.

Bakteriální glykokonjugáty neboli povrchové glykosylované makromolekuly hrají významnou roli v přilnutí (adhezi), buněčné komunikaci a signalizaci, tím často umožňují první kontakt mezi organismem a jeho bezprostředním okolím (40, 42). Biosyntéza glykokonjugátů je komplexní enzymatický proces probíhající za účasti i) enzymů syntetizujících monosacharidy, ii) glykosyltransferas a iii) glykan transportérů, z nichž nejvýznamnější představitele tvoří skupina ABC transportérů (43). ABC transportéry zprostředkovávají translokaci glykanu u všech hlavních tříd povrchových glykokonjugátů včetně glykoproteinů, teichoových kyselin, kapsulárních polysacharidů (CPS), exopolysacharidu (EPS) a O-antigenní polysacharidové části LPS (44). V současné době je známa celá řada ABC transportérů, které se podílí na překonání obranných mechanismů hostitele, a tím jasně přispívají k virulenci.

Genový lokus FTT\_0789 – FTT\_0800 *F. tularensis* subsp. *tularensis* obsahuje geny potenciálně zapojené do biosyntézy polysacharidů včetně i) čtyř genů kódujících předpokládané glykosyltransferasy, ii) *galE* homolog kódující předpokládanou UDP-glukosa-4-epimerasu a iii) gen kódující předpokládaný ABC transportér (FTT\_0793).

Při hledání genů zodpovědných za glykosylaci proteinů *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHUS4 bylo zjištěno, že inaktivace genů FTT\_0791 a FTT\_0798 způsobila ztrátu glykosylace lipoproteinu DsbA; esenciálního faktoru virulence *F. tularensis* (45). Mutace neovlivnila biosyntézu LPS O-antigenu, avšak neměla žádný vliv na bakteriální virulenci v myším tularemickém modelu. Tato skutečnost naznačuje, že za těchto podmínek glykosylace DsbA nehraje významnou roli ve virulenci kmene SCHUS4.

I když byla glykosylace u *F. tularensis* teprve nedávno objevena, znalost glykosylačních mechanismů zůstává doposud omezena pouze na oligosacharyltransferasu PglA, jakožto finální enzym glykosylační kaskády přenášející glykolipid na cílový protein.

## 2.2. TPR proteiny ve vztahu k bakteriální virulenci

Tetratricopeptide repeat (TPR) strukturní motiv byl původně objeven v kvasinkách (46, 47). Nyní jsou TPR proteiny známy v celé řadě organismů, od bakterií až po člověka. Jedná se o minimálně konzervované oblasti o velikosti 34 aminokyselin. Evoluční zachování TPR motivu naznačuje, že se jedná o zásadně významné struktury pro živé organismy. Proteiny obsahující TPR motivy jsou zapojeny v celé řadě buněčných funkcí včetně těch, které se účastní bakteriální patogenese (2, 3). S využitím bioinformatických přístupů bylo predikováno mnoho faktorů virulence obsahujících TPR strukturní motivy. Tato data stimulovala výzkum zaměřený na molekulární aspekty bakteriální patogenese zprostředkované TPR motivy (8).

TPR proteiny jsou přímo propojeny s virulencí bakteriálních patogenů. Důležitou roli hrají především v translokaci faktorů virulence do hostitelských buněk, dále pak v přilnutí bakterie na hostitelskou buňku a v neposlední řadě se uplatňují v blokaci vyzrávání fagolysosomu (4-7). V kontextu bakteriální patogenese patří chaperony třídy II sekrečního systému typu III (type III secretion system; T3SS) mezi nejvíce prostudované TPR proteiny (9, 48-50). Chaperony třídy II kontrolují a zabezpečují rozpoznání a konformační stabilizaci dvou hydrofobních proteinů známých jako translokátory. Tyto translokátory pak vytváří pór v membráně eukaryotických buněk, a tím usnadňují bakteriálním efektorům vstup do hostitelských buněk. TPR proteiny jsou také významné komponenty pro biogenesi pilu typu IV (Tfp). Piliny jsou flexibilní, extracelulární filamenta významná pro kolonizaci hostitele a virulenci mnoha bakteriálních patogenů jako jsou například *Pseudomonas aeruginosa*, druhy *Neisseria*, *Vibrio cholerae*, *Moraxella catarhalis* (51-54). Uplatňují se především v bakteriální adhezi, motilitě, tvorbě biofilmu a DNA transformaci (55). Následující podkapitola je věnována současným znalostem bakteriálních TPR proteinů uplatňujících se v mechanismech virulence, se zaměřením na význam TPR motivů při správném fungování chaperonů třídy II T3SS v patogenesi *Yersinia* (LcrH), *Pseudomonas* (PcrH) a *Shigella* (IpgC). Vzhledem k tomu, že TPR proteiny nejsou omezeny pouze na chaperony typu II T3SS, budou dále zmíněny důležité informace týkající se proteinů, u nichž jsou v souvislosti s funkcí či strukturou TPR motivu dostupná pouze omezená experimentální data. Jedná se o proteiny *P. aeruginosa* PilF, *Mycobacterium tuberculosis* PknG, *Porphyromonas gingivalis* TprA; a PilF, FTL\_0205, ComL, a jeho ortolog FTT1244c z druhu *Francisella*, které představují možný cíl pro studium TPR motivů v bakteriální patogenesi.

### 2.2.1. Proteiny T3SS s TPR motivem

Bakterie rodu *Yersinia* využívá T3SS k doručení toxinů přímo do cytosolu hostitelských buněk. Efektorové molekuly Yop proteinu zasahují do signálních drah souvisejících s regulací fagocytosy, apoptosy a přirozené imunitní odpovědi, čímž napomáhají přežívání bakterie uvnitř hostitele (56). LcrH jako součást Ysc-Yop systému je schopen vazby na translokátory YopB a YopD (5, 9) a navíc je zapojen do regulace syntézy Yop proteinu (57). Analýza krystalické struktury monomerní jednotky LcrH proteinu odhalila přítomnost tří TPR-like motivů (9). Významnost TPR motivu byla dále podpořena i mutagenesí kanonických aminokyselin, které jsou stěžejní pro správnou funkci TPR motivu (5).

Bakterie *P. aeruginosa*, podobně jako *Yersinia*, využívá T3SS k doručení toxinů přímo do cytosolu hostitelských buněk. Byly identifikovány čtyři efektorové T3SS proteiny, které jsou přenášeny buněčnými póry do hostitelských buněk. Jedná se o exoenzymy ExoS, ExoT, ExoU a ExoY, které jsou schopny tlumit buněčné signalizační cesty, a tím snižovat účinnost fagocytosy uvnitř infikovaných makrofágů, případně indukují apoptosu u ostatních buněčných typů, jako jsou epitelální buňky a fibroblasty. T3SS *P. aeruginosa* se velmi podobá sekrečnímu systému, který mají bakteriální druhy *Yersinia*, a to jak na strukturní, tak na funkční úrovni. Mezi významné podobnosti patří přítomnost proteinů PopB a PopD, které vykazují 40% homologii s *Yersinia* translokátory YopB a YopD. Protein PcrH, chaperon třídy II, hraje významnou roli v rozpoznání a stabilizaci těchto proteinů, které jsou naprosto nezbytné pro přenos toxinů do hostitelských buněk. Strukturní analýza prokázala, že celková struktura proteinu PcrH je tvořena helikálním uspořádáním tří TPR podjednotek, podobně jako je tomu u proteinu LcrH u *Yersinia*. Významnost TPR motivů byla opět prokázána mutagenesí, která potvrdila, že nesprávná funkce TPR motivů chaperonu PcrH vede k destabilizaci obou přenašečů, které pak nemohou být sekretovány (4).

Mechanismus kolonizace střevního epitelu u bakteriálních druhů rodu *Shigella* zahrnuje proniknutí do epitelálních buněk, intracelulární pomnožení a následné rozšíření do sousedních enterocytů, které tak podléhají nekróze, přičemž celkově dochází k silné zánětlivé odpovědi (58). Proces invaze hostitelských buněk závisí na T3SS, u rodu *Shigella* konkrétně na genech *ipgC*, *ipaB*, *ipaC* a *ipaD*, které jsou nezbytné pro kolonizaci střevního epitelu. Proteiny IpaB a IpaC představují přenašeče zodpovědné za lýzu membrány fagocytických vakuol, kontaktní hemolýzu a buněčnou smrt makrofágů (8). Oba proteiny se vyskytují v bakteriální cytoplasmě, kde jsou stabilizovány chaperonem IpgC. Při kolonizaci dochází k sekreci proteinů IpaB, IpaC a IpgC, které se pak mohou dále uplatňovat v mechanismech virulence bakterie. Analýza krystalické struktury proteinu IpgC ukázala, že díky uspořádání tří TPR-like motivů může docházet, jak k dimerizaci proteinu, která

je vyžadována pro stabilizaci a sekreci IpaB, a tudíž pro úspěšnou kolonizaci střevního epitelu, tak k vytváření vazebného motivu, který je vhodný pro vazbu široké škály interagujících partnerů (59).

### **2.2.2. Další virulentní faktory obsahující TPR motiv**

Bakterie *P. aeruginosa* využívá protein PilF v procesu biogenese Tfp (60). Detailní krystalická analýza proteinu PilF prokázala přítomnost šesti TPR jednotek. Dále bylo zjištěno, že celkové uspořádání těchto jednotek se vyznačuje přítomností tří možných rozhraní, která splňují kritéria pro tvorbu protein-proteinových interakcí (60). Konkrétní vazebné partnery se však doposud nepodařilo identifikovat.

*M. tuberculosis* využívá serin/threoninovou proteinkinazu G (PknG) k inhibici bakteriální degradace v lysosomech, a tím je podporováno přežívání této bakterie v hostitelských makrofázích. Struktura PknG je tvořena TPR doménou, která je nezbytná pro správnou kinasovou aktivitu tohoto proteinu (61). Protein-proteinové interakce zprostředkované TPR doménou nebyly dosud popsány.

Rovněž *Francisella* spolu s dalšími bakteriálními patogeny jako je *P. gingivalis* zapojují předpokládané TPR proteiny do mechanismů virulence. *F. tularensis* stejně jako je tomu u *P. aeruginosa* využívá protein PilF v procesu biogenese Tfp (6). Inaktivace genu *pilF* vede k signifikantnímu snížení schopnosti této bakterie adherovat na hostitelské buňky různého typu a dále bylo pozorováno oslabení virulence mikroba *in vivo*. Proteiny *F. tularensis* jako jsou FTL\_0205, ComL a jeho ortolog FTT1244c patří mezi další významné faktory virulence, které se uplatňují při replikaci uvnitř hostitelských buněk.

## **2.3. Molekulární chaperony ve virulenci bakteriálních patogenů**

Řada bakteriálních patogenů je schopna vyvolávat infekční onemocnění, které představuje velmi náročný proces, jak pro infekční agens, tak pro hostitelský organismus. Je tedy pochopitelné, že bakterie si vyvinuly mechanismy, díky kterým jsou schopny odolávat stresovým podmínkám. Jakmile je bakterie fagocytována hostitelskou buňkou, setkává se s řadou stresových faktorů, jakými jsou zvýšená teplota, acidifikace fagosomu, oxidativní vzplanutí a fúze fagosomu s lysosomem. Díky těmto stimulům dochází k indukci molekulárních chaperonů, které napomáhají bakterii překonat nepříznivé podmínky uvnitř hostitele, čímž přispívají k bakteriální patogenesi (62).

Proteiny teplotního šoku (heat shock proteins; HSPs), neboli molekulární chaperony představují vysoce konzervované proteiny, které byly původně popsány jako proteiny se zvýšenou hladinou exprese za stresových podmínek (63, 64). Mnohé HSPs mohou působit jako komplexy, které hrají

významnou roli při sbalování, stabilizaci a translokaci proteinů a dále při rekonstrukci špatně sbalených nebo agregovaných proteinů (65, 66).

U bakterií jsou významné proteiny DnaK, DnaJ, GroEL, a HtpG, které představují hlavní zástupce HSPs tříd. Všechny tyto chaperony se významně sekvenčně podobají svým eukaryotním kolegům (67). DnaK je jedním z nejlépe charakterizovaných bakteriálních chaperonů. Role tohoto chaperonu ve sbalování proteinů byla dobře prostudována a bylo prokázáno, že se jedná o protein spojený s bakteriální virulencí. Mutace proteinu DnaK v bakteriích jako je *Brucella suis*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* a *F. tularensis* vedla k narušení replikace bakterií v makrofázích a snížení schopnosti kolonizovat tkáň infikovaných myší (68-70). Tato data podporují tvrzení, že HSPs jsou zásadní pro přežívání těchto bakterií v hostitelském prostředí. Jedním z nejznámějších příkladů role HSPs v bakteriální patogenesi je infekce hostitelských makrofágů bakterií *Listeria monocytogenes*. Exprese proteinu ClpC (člen rodiny Hsp100) umožňuje bakterii únik z fagosomu do cytoplasmy, kde je *Listeria* schopná pokračovat v proliferaci (71).

Kromě uvedených příkladů mnohé bakterie využívají také specifické molekulární chaperony jako adheziny sloužící k invazi do hostitelských buněk. Tyto molekulární chaperony, sekretované na buněčném povrchu, mohou být uvolňovány do extracelulárního prostředí, kde působí jako signální faktory (72). Obě třídy chaperonů Hsp60 a Hsp70 byly v této roli popsány. Dále jsou známy případy, kdy bakterie byly schopny ovlivnit hostitelské chaperony tak, aby navýšily vlastní proliferaci a byly schopny překonat obranné mechanismy hostitele (73). Je tedy zřejmé, že bakterie značně využívají funkcí HSPs k překonání obranných mechanismů hostitele cílených proti bakteriální infekci.

## 2.4. Co-chaperony

Co-chaperony jsou vazebnými partnery chaperonů Hsp90 nebo Hsp70 a v širším smyslu mohou být definovány jako proteiny, které se podílí na funkci dalších chaperonů. Samy o sobě mohou mít chaperonovou aktivitu, jak lze soudit z jejich schopnosti bránit agregaci polypeptidu a tím se vázat na Hsp70 a Hsp90 a současně na další vazebné partnery. Některé co-chaperony neinteragují s polypeptidy vazebných partnerů, ale regulují působení chaperonů. Co-chaperony jsou také schopny zprostředkovávat specifitu chaperonů, a to tím, že vybírají vazebné partnery a prezentují je Hsp70 nebo Hsp90, čímž koordinují vazebný koloběh chaperonů a usnadňují sbalování polypeptidu případně rozbalení proteinu (74).

Z hlediska struktury lze většinu co-chaperonů zařadit do dvou tříd: i) co-chaperony obsahující "J" doménu, jak je možné vidět u Hsp40 (co-chaperony Hsp70) a ii) TPR co-chaperony, které interagují s Hsp70 nebo Hsp90. Vývoj těchto J a TPR domén v komplexních organismech odráží nárůst biologických procesů, pro které je působení Hsp70 nebo Hsp90 nezbytné. Zdá se, že co-chaperony, které vykonávají více specializované funkce, převzaly J a TPR domény jako způsob začlenění se do mechanismu působení chaperonů Hsp70 a Hsp90 (74).

Původní charakterizace Hsp70 co-chaperonů jako regulátorů chaperonové činnosti byla odvozena od studií (74), jejichž výsledky prokázaly, že DnaJ (člen rodiny Hsp40 u prokaryot) a GrpE působí na adenosintrifosfátový (ATPase) cyklus proteinu DnaK, který je znám jako hlavní Hsp70 u bakterie *Escherichia coli*. Dále bylo prokázáno (75), že protein DnaJ se sám o sobě vyznačuje chaperonovou aktivitou. Toto zjištění se stalo součástí obecně akceptovaného konceptu, kde se polypeptidy vážou na DnaJ, který se dále váže na DnaK. Polypeptid je následně přenesen na DnaK a tato interakce je stabilizována schopností DnaJ katalyzovat utváření DnaK-adenosindifosfátu (ADP), který má vyšší afinitu k nesbaleným polypeptidům, než je tomu u DnaK-ATP. Role GrpE pak spočívá ve vazbě na DnaK, kdy dochází k nukleotidové výměně a oslabení interakce DnaK a polypeptidu s následným rozvolněním komplexu. Tento sled událostí je nezbytný pro správnou funkci Hsp70 v procesu sbalování proteinů. Hsp40 rodina se vyznačuje tím, že zajišťuje nezbytnou specifitu chaperonových reakcí a to tak, že vybírá vazebné partnery, u nichž následně dochází ke změně konformace v důsledku interakce s Hsp70 (74).

Mechanismus působení proteinů Hsp90 se značně liší od rodiny Hsp70 (76). Zdá se, že Hsp90 hrají roli ve sbalování pouze velmi blízkých proteinových rodin, které jsou reprezentovány transkripčními faktory (jako jsou nukleární receptory) a proteinkinasami. Hsp90 co-chaperony můžeme rozdělit na skupinu, která obsahuje TPR domény (ta může interagovat i s Hsp70) a na skupinu, v jejíž struktuře TPR domény nebyly identifikovány. TPR Hsp90 co-chaperony hrají roli

v širokém spektru biologických procesů, protože tyto proteiny obvykle obsahují ještě další domény, které katalyzují rozmanité reakce, jakými jsou ligace ubikvitinu a peptidyl-prolyl isomerizace. Druhá skupina co-chaperonů, která neobsahuje TPR domény je strukturně značně odlišná a zahrnuje proteiny p23, Cdc37 a Aha1/Hch1 (74).

Otázka, zdali byly identifikovány všechny co-chaperony, je stále otevřená. Ačkoli v genomové databázi je možné identifikovat proteiny obsahující TPR domény, není možné na základě samotné sekvence určit, které z nich jsou schopny vazby na Hsp90 či Hsp70. Také nové proteiny, které se vážou na Hsp70 a Hsp90, čekají na své objevení. Je pozoruhodné, že některé co-chaperony mohou působit samostatně, bez vazby na chaperony, jak je tomu u proteinu p23, který působí nezávisle na Hsp90. (77). Tyto pozorované vlastnosti zpochybňují názor, že co-chaperony jsou podřízeny funkci Hsp90 či Hsp70. Zda se však jedná o obecnou schopnost co-chaperonů, zatím zůstává neobjasněno (74).

### **3. CÍLE PRÁCE**

Náplní mé disertační práce bylo identifikovat nové faktory virulence *F. tularensis*, které by mohly hrát významnou roli v patogenesi tularemické infekce. V předkládané disertační práci byly stanoveny následující dílčí cíle:

1. Na základě bioinformatických studií identifikovat geny s predikovanou TPR doménou a připravit mutantní kmeny vybraných genů v modelovém organismu *F. tularensis*.
2. Studovat virulenci připravených mutantních kmenů s využitím *in vivo* (myši kmene BALB/c) a *in vitro* (primární myší makrofágy) infekčních modelů.
3. Studovat zapojení vybraných TPR proteinů v adaptačních mechanismech na stres.
4. Studovat molekulární mechanismy oslabení mutantního kmene *inFTS\_1680/200* a jeho schopnost vyvolat protektivní imunitní odpověď u myší kmene BALB/c.
5. Studovat podstatu protektivního charakteru mutantního kmene *inFTS\_1680/200* se zacílením na získání důležitých informací o imunitní odpovědi na tularemickou infekci.

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4.1. Bakteriální kmeny, plasmidy a podmínky kultivace

Bakteriální kmeny a plasmidy použité v této práci jsou uvedeny v Tab. 1.

*F. tularensis* ssp. *holarctica* FSC200 (78) byla poskytnuta Dr. Åke Forsbergem ze Švédské obranné agentury, Swedish Defence Research Agency, Umea. *F. tularensis* ssp. *holarctica* FSC200 a připravené mutantní kmeny byly kultivovány na McLeod agarových plotnách obohacených o bovinní hemoglobin (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) a IsovitaleX (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) v inkubátoru při 37°C a 5% CO<sub>2</sub>, nebo v tekutém Chamberlainově médiu (79) při 30°C, 37°C nebo 42°C. *E. coli* kmeny byly kultivovány na Luria-Bertani (LB) agaru, v tekutém LB médiu a na MacConkey/maltosových plotnách při 30°C nebo 37°C. V případě potřeby byl pro kultivaci do média přidán penicillin (100 U/ml), ampicillin 100 µg/ml, kanamycin (50 µg/ml pro *E. coli* a 20 µg/ml v případě *F. tularensis*) a 0,5 mM IPTG .

**Tab. 1 Bakteriální kmeny a plasmidy použité v této práci**

NÁZEV	PŘÍSLUŠNÁ CHARAKTERISTIKA	ZDROJ/REFERENCE
<b><i>E. coli</i> kmeny</b>		
α-Select Gold	F-deoR endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> )	Bioline
Efficiency	supE44 thi-1 phoA Δ(lacZYA argF)U169 Φ80lacZΔM15λ <sup>-</sup>	
DHM1	F <sup>'</sup> , cya-854, recA1, endA1, gyrA96 (Nal <sup>R</sup> ), thi1, hsdR17, spoT1, rfbD1, glnV44(AS)	BACTH system kit; EUROMEDEX, (80)
<b><i>Francisella</i> kmeny</b>		
FSC200	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i> , klinický isolát	sbírka FCS ( <i>Francisella</i> strain collection), (78)

Tab. 1 pokračování

NÁZEV	PŘÍSLUŠNÁ CHARAKTERISTIKA	ZDROJ/REFERENCE
<i>inFTS_0201</i>	<i>inFTS_0201/FSC200</i>	tato práce
<i>inFTS_0778</i>	<i>inFTS_0778/FSC200</i>	tato práce
<i>inFTS_1680</i>	<i>inFTS_1680/FSC200</i>	tato práce
<i>inFTS_1680</i> komplementovaný	<i>inFTS_1680</i> s pKK289FTS_1680	tato práce
<i>inFTT_0166c</i>	<i>inFTT_0166c/Schu S4</i>	tato práce
<b>Plasmidy</b>		
pCR4-TOPO	Klonovací vektor, Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Invitrogen
pKEK1140	targetron plasmid specifický pro <i>F. tularensis</i>	(81)
pKEK1140/in201	pKEK1140 s insercí v genu <i>FTS_0201</i>	tato práce
pKEK1140/in778	pKEK1140 s insercí v genu <i>FTS_0778</i>	tato práce
pKEK1140/in1680	pKEK1140 s insercí v genu <i>FTS_1680</i>	tato práce
pKNT25	BACTH systém plasmid	(80)
pUT18	BACTH systém plasmid	(83)
pUT18/1680	pUT18 s nenarušeným genem <i>FTS_1680</i>	tato práce
pKNT25/1670	pKNT25 s nenarušeným genem <i>FTS_1670</i>	tato práce
pKNT25/1167	pKNT25 s nenarušeným genem <i>FTS_1167</i>	tato práce
pKNT25/1166	pKNT25 s nenarušeným genem <i>FTS_1166</i>	tato práce
pKNT25/0277	pKNT25 s nenarušeným genem <i>FTS_0277</i>	tato práce
pKNT25/0263	pKNT25 s nenarušeným genem <i>FTS_0263</i>	tato práce

## 4.2. TargeTron inserční mutagenese

Pro mutagenesi genů *FTS\_0201*, *FTS\_0784* a *FTS\_1680* jsme využili komerční soupravu TargeTron Gene Knockout System (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce a modifikací specifických

pro bakterii *F. tularensis* (81). Vhodné místo inserce a PCR primery (Tab. 2) pro začlenění insertu do genomové DNA vybraných genů byly vygenerovány pomocí algoritmu dostupného na webových stránkách firmy Sigma-Aldrich. Vzniklý PCR produkt byl štěpen pomocí enzymů *HindIII* a *BsrGI* a klonován do vektoru pKEK1140 (velkoryse poskytnut Dr. Karlem Klosem, UTSA, San Antonio, TX), speciálně vyvinutého pro *F. tularensis* (81). Připravené konstrukty byly použity pro elektroporaci *F. tularensis* ssp. *holarctica* FSC200. Přítomnost insertu v genomové DNA byla ověřena kombinací intron-specifického primeru “EBS universal” a genově-specifického primeru. K odlišení divokého a mutantního bakteriálního kmene byly využity genově specifické primery, které amplifikují napříč místem inserce. Pozitivní klony byly inkubovány přes noc při 37°C v Chamberlainově médiu a poté naředěny a vysety na McLead agarové plotny (bez kanamycinu), které byly nadále inkubovány při 37°C, což vede k odstranění TargeTron teplotně citlivého vektoru. Inserční mutanty byly následně ověřeny pomocí genově specifických primerů.

**Tab. 2 Primery použité v této práci**

OZNAČENÍ PRIMERU	SEKVENCE 5' - 3'
<b>FTS_0201_IBS</b>	AAAAC TCGAGATAATTATCCTTAAAAACAATTTAGTGC GCCCAGATAGGGTG
<b>FTS_0201_EBS1d</b>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAATTTAGATAACTTACCTTTCTTTGT
<b>FTS_0201_EBS2</b>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTTTTTTTCCGATAGAGGAAAGTGCT
<b>FTS_0201_F</b>	TAGTTTTACGCTTGTCTCC
<b>FTS_0201_R</b>	GACAAAAGACCAACAGGGC
<b>FTS_1680_IBS</b>	AAAAC TCGAGATAATTATCCTTAAACCCCAAATCAGTGC GCCCAGATAGGGTG
<b>FTS_1680_EBS1d</b>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAAATCATCTAACTTACCTTTCTTTGT
<b>FTS_1680_EBS2</b>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTGGGTTCCGATAGAGGAAAGTGCT
<b>FTS_1680_F</b>	TATCCAAGAAACAACTCAAG
<b>FTS_1680_R</b>	TCAAAGGGTAGGCATTATC
<b>FTS_1680_pKK289_F</b>	GCATGTCATATGAAAAACTTATCCAAGAA
<b>FTS_1680_pKK289_R</b>	ACATGCGAATTCCTAGTTAGTATTGTTTATAAGTTGAC
<b>FTS_0778_IBS</b>	AAAAC TCGAGATAATTATCCTTAACAGCCAAAGACGTGC GCCCAGATAGGGTG
<b>FTS_0778_EBS1d</b>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCAAAGACTATAACTTACCTTTCTTTGT
<b>FTS_0778_EBS2</b>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGCTGTTCGATAGAGGAAAGTGCT
<b>FTS_0778_F</b>	GTTGGTGTGATTGGTAGTTGT
<b>FTS_0778_R</b>	AGCAGCAGCAGTTGTAAGATA

Tab. 2 pokračování

OZNAČENÍ PRIMERU	SEKVENCE 5' - 3'
<b>FTS_1681_IBS</b>	AAAAC TCGAGATAATTATCCTTAAAGAGCGTTGCGGTGCGCCAGATAGGGTG
<b>FTS_1681_EBS1d</b>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGTTGCGGTAACCTTCTTTGT
<b>FTS_1681_EBS2</b>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGGTTCTCTCCGATAGAGGAAAGTGTCT
<b>FTS_1681_F</b>	TTTTTGATTATGGTATTTCGG
<b>FTS_1681_R</b>	GTAGCAATAACTCCACCAGCA
<b>FTS_1682_IBS</b>	AAAAC TCGAGATAATTATCCTTAGCTCCCGCAGTAGTCGCGCCAGATAGGGTG
<b>FTS_1682_EBS1d</b>	CAGATTGTACAAATGTGGTGATAACAGATAAGTCGCGAGTAGTAACTTACCTTCTTTGT
<b>FTS_1682_EBS2</b>	TGAACGCAAGTTTCTAATTTTCGATTGGAGCTCGATAGAGGAAAGTGTCT
<b>FTS_1682_F</b>	ACCATCAGTTTTTCTTTGCC
<b>FTS_1682_R</b>	TACATTCCAGGTCTTTTCTTGA

### 4.3. Funkční komplementace

Pro vytvoření *FTS\_1680* komplementovaného kmene jsme využili metodu *trans* komplementace. DNA fragment kódující gen *FTS\_1680* byl amplifikován pomocí primerů 1680\_pKK289\_F a 1680\_pKK289\_R (Tab. 2), s využitím FSC200 genomové DNA jako templátu. Finální PCR produkt byl ověřen sekvenací a poté klonován do vektoru pKK289gfp, a to záměnou za gen kódující zelený fluorescenční protein (82). Vzniklý konstrukt označený jako pKK289FTS\_1680 byl následně vložen do *inFTS\_1680* mutantního kmene pomocí elektroporace.

### 4.4. Infekce a kultivace primárních makrofágů

Makrofágy odvozené z buněk kostní dřeně (BMMs) byly izolovány ze stehenních a lýtkových kostí 6-10 týdenních myších samic kmene BALB/c a dále diferencovány v makrofágy v přítomnosti DMEM média (Invitrogen) obohaceného o 10% fetální bovinní sérum (FBS), 10% L929 buněčný supernatant (zdroj M-CSF; macrophage colony-stimulating factor), 50 µg/ml streptomycinu a 50 U/ml penicillinu, po dobu šesti až sedmi dnů (83). BMMs byly nasazeny na 24-jamkové destičky pro tkáňové kultivace o koncentraci  $5 \times 10^5$  buněk na jamku. *F. tularensis* byla naředěna buněčným kultivačním médiem a vzniklá suspenze byla použita pro infekci BMMs v poměru 50:1 (bakterie:buňka). Skutečná infekční dávka byla určena výsevem bakteriální suspenze na McLeod

agarové plotny. Vstup bakterie do buňky byl zajištěn stočením 24-jamkových destiček (400xg, 5min) s následnou 30 min inkubací při 37°C. Odstranění extracelulárních bakterií bylo provedeno promytím buněk teplým DMEM médiem a kultivací infikovaných buněk v médiu s gentamycinem (5 µg/ml) po dobu 30 min. Ve zvolených časových intervalech byly infikované BMMs promyty a lyzovány vychlazeným 0,1% deoxycholátem sodným. Lyzáty byly následně naředěny a vysety na McLeod plotny. Po 72 hod inkubaci při 37°C byly odečteny počty intracelulárních bakterií připadající na daný počet buněk v jednotlivých jamkách.

#### **4.5. Infekce a studium virulence na myších kmene BALB/c.**

Pro testy přežití byla použita skupina pěti myší kmene BALB/c (♀), které byly infikovány subkutánně divokým kmenem, mutantním kmenem *inFTS\_1680*, komplementovaným kmenem a mutantními kmeny *inFTS\_0201* a *inFTS\_0778* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Další skupina myší (n = 5) byla infikována subkutánně mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^6$  CFU/myš. Intraperitoneální infekce byly prováděny pouze s divokým kmenem FSC200 ( $3 \times 10^2$  CFU/myš), mutantním kmenem *inFTS\_1680* ( $3 \times 10^2$  nebo  $3 \times 10^6$  CFU/myš) a komplementovaným kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU/myš). Kontrolní skupina myší byla inokulována pouze sterilním fyziologickým roztokem. Skutečné inokulační dávky byly ověřeny počítáním životaschopných bakterií po výsevu suspenze na McLeod plotnu. Myši byly pozorovány denně po dobu 21 dní, kdy byly zaznamenávány projevy nemoci, eventuálně úhyn.

#### **4.6. Kolokalizace *F. tularensis* s LAMP-1 v primárních buňkách**

Schopnost úniku mutantního kmene *inFTS\_1680* z fagosomů makrofágů derivovaných z buněk kostní dřene byla testována pomocí kolokalizace bakterie se znakem pozdních endosomů (LAMP-1) v čase 1 a 6 hod po infekci. Infikované BMMs (4.4.) byly fixovány 3,8% paraformaldehydem po dobu 30 min a následně neutralizovány 50mM NH<sub>4</sub>Cl. Po promytí buněk PBS, byly membrány makrofágů permeabilizovány 0,2% Tritonem X-100 po dobu 15 min. Bakterie byly vizualizovány pomocí primární protilátky (králičí polyklonální anti-*F. tularensis* sérum) ředěné 1:3000 a sekundární protilátky (AlexaFluor™ 488 goat anti-rabbit IgG) ředěné 1:500. Následně byly barveny pozdní endosomy pomocí LAMP-1 protilátky (rat monoclonal anti-mouse LAMP-1) ředěné 1:100 a sekundární protilátky (AlexaFluor™ 594 donkey anti-rat IgG) ředěné 1:500. Kolokalizace bakterií s LAMP-1 byla analyzována konfokálním mikroskopem Nikon TE2000 vybaveným programem "NIS Elements AR".

#### 4.7. Test cytotoxicity na primárních makrofázích

Pro posouzení cytotoxického efektu *inFTS\_1680* mutantního kmene na primární buňky, byly BMMs nasazeny na 96-jamkové kultivační destičky o koncentraci  $2 \times 10^4$  buněk/jamku a ponechány adherovat do druhého dne v inkubátoru při  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Následující den byly makrofágy infikovány bakteriální suspenzí o MOI 50:1 (bakterie:makrofág). Ve zvolených časových intervalech (2 hod, 24 hod a 48 hod) po infekci byly odebrány buněčné supernatanty, ve kterých byla stanovena přítomnost uvolněné LDH pomocí kitu na detekci cytotoxicity (Cytotoxicity Detection Kit; Roche Diagnostics, Germany). Vzorky byly měřeny na ELISA readeru při vlnové délce 490nm. Pro pozitivní kontrolu, reprezentující 100% buněčné lyze, byly použity neinfikované BMMs, které byly lyzovány po dobu 5 min 0,1% deoxycholátem sodným. Absorbance vzorků byla vyjádřena procentuálně a vztažena k hodnotám pozitivní kontroly.

#### 4.8. Studium protektivního charakteru mutantního kmene *in vivo*

Studie zaměřené na protektivní charakter *inFTS\_1680* mutantního kmene byly provedeny na skupinách 5-ti myší, které byly imunizovány subkutánně mutantním kmenem v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Kontrolní skupina myší byla inokulována pouze sterilním fyziologickým roztokem. 28 dní po vakcinaci byla imunizovaná zvířata infikována plně virulentním mateřským kmenem FSC200 v dávkách  $3 \times 10^2$  nebo  $3 \times 10^5$  CFU/myš. Myši byly denně sledovány po dobu 21 dnů, kdy byly zapisovány projevy onemocnění, eventuálně úhyn. Pro stanovení přesných imunizačních a infekčních dávek byly jednotlivé bakteriální suspenze vysety na plotny s McLeod agarem, kde byly po 72 hodinách odečteny životaschopné bakterie.

#### 4.9. Studium orgánové distribuce *in vivo*

Studie zaměřené na kinetiku bakteriální distribuce a růstu v myších orgánech byly provedeny na skupinách tří myší, kdy každá skupina byla infikována intraperitoneálně či subkutánně divokým kmenem FSC200, komplementovaným kmenem *inFTS\_1680* nebo mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. V uvedených časových intervalech po infekci byla odebrána jaterní, slezinná a plicní tkáň, která byla homogenizována v PBS a následně naředěna a vyseta na McLeod plotny pro určení celkového počtu bakterií v jednotlivých orgánech.

#### 4.10. Protilátkové a cytokinové analýzy

Neředěná séra myší kmene BALB/c byla využita pro kvantitativní detekci protilátek IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b pomocí tzv. Custom Quantibody Array technologie (RayBiotech, Inc.). Tato technologie byla také využita pro stanovení cytokinu IFN- $\gamma$  v myším séru a homogenátech jater a sleziny. Hladina protilátek a IFN- $\gamma$  byla stanovena firmou RayBiotech (Quantibody service).

#### 4.11. Přežívání bakterií za stresových podmínek

Kmeny *F. tularensis* byly očkovány z čerstvě rozmražených bakteriálních zásobních kultur do 2,5 ml Chamberlainova média obohaceného příslušnými antibiotiky a kultivovány přes noc při 37°C. Kultury byly naředěny čerstvým Chamberlainovým médiem na  $OD_{600} = 0.1$ . Bakteriální kultury byly přeneseny na 96-ti jamkové destičky v pěti replikátech po 250  $\mu$ l a byly vystaveny následujícím stresovým podmínkám: pH 4.0, 4% NaCl, deplece železa a inkubovány 24 hodin při 37°C nebo 42°C (v případě teplotního stresu). Bakteriální růst byl stanoven měřením  $OD_{600}$  v hodinových intervalech po dobu 24 hod. Pro stanovení oxidativního stresu byla využita stacionární fáze bakterií kmene FSC200 a mutantního kmene *inFTS\_1680*, které byly naředěny čerstvým Chamberlainovým médiem 1:10 a vystaveny působení 0,03%  $H_2O_2$ . Vzorky byly odebrány v čase 0, 20 a 40 minut po expozici a sériově naředěny a vysety na plotny s McLeod agarem, kde byly po 72 hodinách odečteny životaschopné bakterie (84, 85).

#### 4.12. Bakteriální adenylátcyklasový systém

Bakteriální adenylátcyklasový dvouhybridní test byl proveden dle instrukcí výrobce (BACTH System kit, Euromedex, ref. EUK001). Krátce, protein FTS\_1680 byl fúzován s T18 podjednotkou adenylátcyklasy (in frame fúze na N-konec T18 podjednotky), na rozdíl od zvolených proteinů i) GroEL (FTS\_1670), ii) DnaK (FTS\_1167), iii) DnaJ2 (FTS\_0277), iv) GrpE (FTS\_1166) a v) HtpG (FTS\_0263), které byly fúzovány k T25 adenylátcyklasové podjednotce (in frame fúze na N-konec T25 podjednotky). Primery a plasmidy použité v tomto testu jsou uvedeny v Tab. 2 a 1. Pro každý test, byly použity *E. coli* DHM1 chemokompetentní buňky, které byly transformovány 1  $\mu$ l směsí obou plasmidů, nesoucích fúze na podjednotkách T25 a T18 a vysety na LB plotny obsahující 100  $\mu$ g/ml ampicilinu a 50  $\mu$ g/ml kanamycinu. Plotny s bakteriálními kulturami byly inkubovány při 30°C po dobu 2 dnů. Několik kolonií bylo zaočkováno do 3 ml LB média obohaceného 100  $\mu$ g/ml ampicilinu, 50  $\mu$ g/ml kanamycinu a 0.5 mM IPTG a inkubovány přes noc při 30°C. Následující den byly 2  $\mu$ l každé kultury kápnuty na MacConkey/maltosové plotny obsahující příslušná antibiotika a IPTG. Plotny byly následně inkubovány několik dní, dokud se neobjevilo červené zbarvení. Dva prázdné

plasmidy pUT18 a pKNT25 byly použity jako negativní kontrola. Vektory nesoucí geny *iglA* a *iglB*, byly použity jako pozitivní kontrola. IglA-IglB interakce byla u *F. tularensis* prokázána již dříve (86).

#### **4.13. Separace pomocí tritonu X-114**

Buněčné lyzáty bakteriálních kmenů *F. tularensis* FSC200 a *inFTS\_1680* byly připraveny mechanickou lýzou pomocí přístroje French press (16000 psi). Následnou ultracentrifugací (115 000 x g, 1hod, 4°C) celobuněčného lyzátu byly získány frakce obohacené o membránové proteiny. Po odstranění supernatantu byl membránový pelet opláchnut v PBS a znovu stočen. Finální pelet obsahující membránové proteiny byl rozpuštěn v ledovém PTX pufru (PBS obsahující 350 mM NaCl, 2% Triton X-114 a inhibitory proteas) a inkubován při 4°C po dobu 1 hodiny za míchání v rotátoru. Po 1 hodině byl vzorek centrifugován (12,000 rpm, 4°C, 30 min) a supernatant ponechán 10 min při 37°C pro ustálení fázové separace. Po následné centrifugaci byla odstraněna horní vodná fáze a k organické fázi byl přidán stejný objem PBS obsahující 350 mM NaCl, jaký byl odebrán. Fázová separace byla zopakována dvakrát. Výsledná detergentová frakce byla resuspendována v PBS a koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA metody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### **4.14. Příprava frakce obohacené o pilinové proteiny**

Bakterie *F. tularensis* FSC200 rostly na McLeod plotnách po dobu 48 hodin a poté byly resuspendovány v PBS. Následným protřepáním (maximální rpm, 2 min) a centrifugací (13,000 rpm, 10 min) bakteriální suspenze byl získán supernatant obohacený o pilíny, který byl odebrán. Eventuálně přítomné bakterie byly ze supernatantu odstraněny zahřátím na 65°C po dobu 2 hod. Následná agregace pilů probíhala při orbitálním třepání (18 hod, 4°C). Suspenze byla dále stočena (150,000 x g 4°C, 1 hod) a získané pelety byly resuspendovány v PBS. Výsledná koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA metody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

#### **4.15. Dvourozměrná gelová elektroforesa**

Pro odstranění nežádoucího detergentu byly proteiny detergentové fáze nejprve opakovaně precipitovány vychlazeným acetonem. Proteinové precipitáty byly rozpuštěny v rehydratačním pufru obsahujícím 1% (w/v) ASB-14 surfaktant. Následně použité metody jako jsou izoelektrická fokusace, redukce, alkylace a SDS-PAGE byly provedeny dle postupu popsaného dříve (87). Proteiny rozdělené na 2D gelech byly následně obarveny koloidním modřením (Invitrogen).

Pro imunoproteomické studie byly proteiny rozdělené na základě 2D elektroforezy přeneseny na BioTrace PVDF membránu (Pall Corporation, Pensacola, FL) a dále detekovány pomocí sér z myší kmene BALB/c imunizovaných *inFTS\_1680/200* mutantním kmenem a následně infikovaných FSC200 virulentním kmenem (primární protilátka). Pro sekundární značení byla použita polyklonální koží protilátka proti myším IgG, IgA a IgM (DAKO). Pro tyto experimenty byly připraveny 3 biologické replikáty frakcí obohacených o detergentové a pilinové proteiny.

#### **4.16. Hmotnostní analýza a identifikace proteinu**

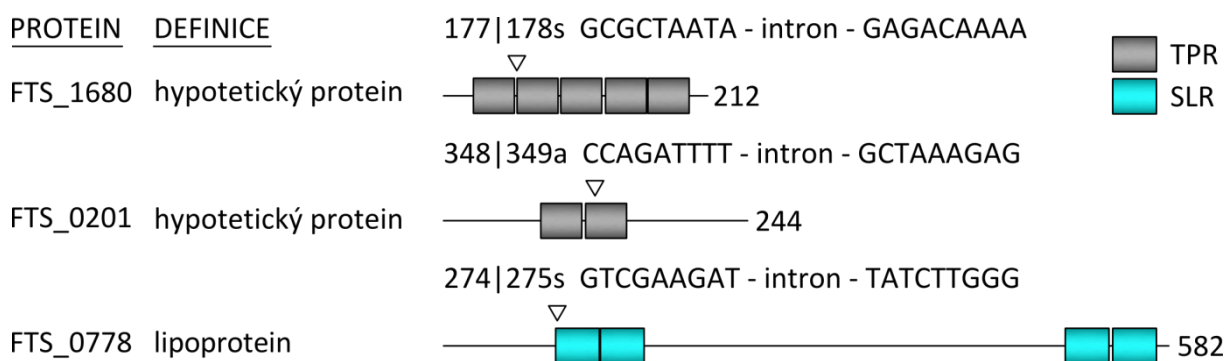
Proteinové skvrny obarvené koloidní modří byly vyříznuty z 2D-gelů a následně podrobeny proteolytickému štěpení trypsinem podle postupu, který byl popsán nedávno (87). Štěpení bylo ukončeno okyselením vzorků na pH 2-3 pomocí trifluoroctové kyseliny. Vzniklá směs peptidů byla smíchána s 10 mg/ml roztokem DHB matrice v objemovém poměru 1:1, nanesena na MALDI terčík a následně analyzována na 4800 MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometru (AB Sciex, Foster City, CA) v pozitivním reflektorném módu. Sběr a zpracování dat bylo provedeno pomocí software 4000 Series Explorer v3.5 (AB Sciex). Hmotnostní spektra peptidů na MS úrovni byla snímána v rozsahu od 800 do 4,000 m/z. Vnitřní kalibrace hmotnostního spektra byla provedena pomocí peptidů trypsinu vzniklých autolýzou. Pro následnou fragmentaci peptidů na aminokyseliny a záznam tandemového hmotnostního spektra (MS/MS) bylo z MS spekter vybráno šest nejvíce intenzivních prekurzorových iontů s minimální hodnotou signálu k šumu ( $S/N$ ) = 100 a s vyloučením tryptických autolytických peptidů. Identifikace proteinů byla provedena na základě porovnání naměřených dat s daty teoretickými, generovanými *in-silico* z proteinové databáze *F. tularensis* subsp. *holarctica* kmen FSC200 (NC\_019551.1) pomocí GPS Explorer™ Software v.3.6 (AB Sciex) s vyhledávacím algoritmem Mascot v2.2. Pro generování peptidů z proteinové databáze byly zvoleny následující parametry: proteolytický enzym = trypsin, povolený počet vynechaných štěpných míst (tzv. missed cleavages) = 1, variabilní modifikace = oxidace methioninu, pevná modifikace = karbamidometylace cysteinových reziduí. Tolerance odchylky naměřené a teoretické hmoty byla nastavena na 100 ppm na úrovni prekurzorových iontů a 0,25 Da na úrovni fragmentových iontů. Za správně identifikovaný protein byl považován takový, pro něhož tzv. GPS protein score confidence interval (%) dosahoval 100% a zároveň byly identifikovány minimálně dva peptidy tohoto proteinu na MS/MS úrovni.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Výběr vhodných kandidátů pro přípravu bakteriálních mutantních

#### kmenů

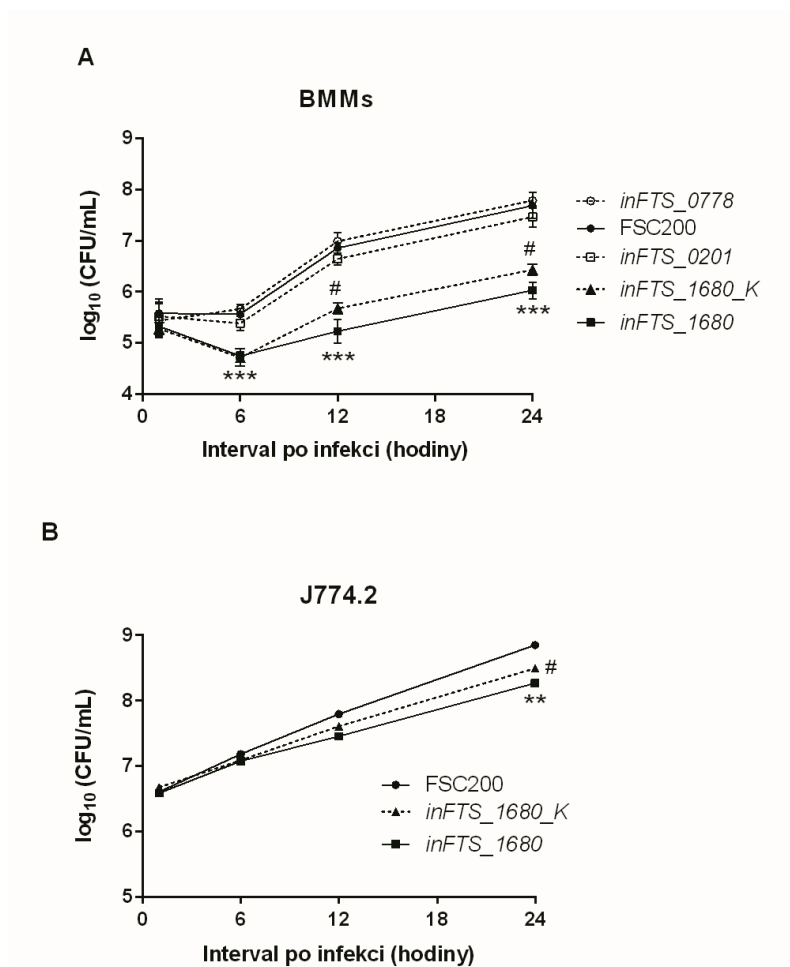
Analýzou sekvence genomu *F. tularensis* FSC200 pomocí webového predikčního programu TPRpred byla zjištěna přítomnost několika proteinů s predikovanou TPR-like doménou (88). Pomocí zvoleného bioinformatického přístupu byl identifikován protein FTS\_1680 (YP\_007012402.1) s pěti predikovanými TPR motivy v pozicích 24-57, 59-92, 94-127, 130-163 a 164-197 (s 99,83% pravděpodobností), protein FTS\_0201 (YP\_007011286.1) se dvěma predikovanými TPR motivy v pozicích 78-111 a 114-147 (s 99,95% pravděpodobností) a protein FTS\_0778 (YP\_007011730) se čtyřmi predikovanými TPR motivy v pozicích 90-125, 126-161, 499-534, 537-572 (se 100,00% pravděpodobností) (Obr. 2). Pro přípravu mutantních kmenů vybraných genů byla využita mutagenese TargeTron založená na mobilních intronech skupiny II (81), které byly začleněny do sekvence genů *FTS\_0201* (TargeTron insertion site 347/348s; *inFTS\_0201*), *FTS\_0778* (TargeTron insertion site 297 273/274s; *inFTS\_0778*) a *FTS\_1680* (TargeTron insertion site 177/178s; *inFTS\_1680*) (Obr. 2).



**Obr. 2** Schematické znázornění proteinových domén s vyznačeným místem TargeTron inserce. Domény byly vyznačeny na základě predikce pomocí webové predikčního programu TPRpred (88). TPR domény jsou znázorněny šedou barvou, zatímco SEL1-like domény modře. FTS\_1680 hypotetický protein (přístup: YP\_007012402.1), FTS\_0201 hypotetický protein (přístup: YP\_007011286.1), FTS\_0778 lipoprotein (přístup: YP\_007011730). Znázorněny jsou také nukleotidové sekvence s vyznačeným místem inserce (trojúhelník).

## 5.2. Schopnost replikace TPR-like proteinů uvnitř makrofágů

Role TPR-like proteinů FTS\_0201, FTS\_0778 a FTS\_1680 při množení bakterie uvnitř hostitelských buněk byla sledována pomocí *in vitro* infekční studie s využitím primárních BMMs a monocyto-makrofágové buněčné linie (J774.2). Buňky byly infikovány virulentním kmenem FSC200 a mutantními kmeny *inFTS\_0201*, *inFTS\_0778* a *inFTS\_1680*. Schopnost replikace jednotlivých kmenů byla sledována v časových intervalech 1, 6, 12 a 24 hodin po infekci. Vnitrobuněčné množení mutantních kmenů *inFTS\_0201* a *inFTS\_0778* uvnitř BMMs (Obr. 3A) a J774.2 (data neuvedena) bylo srovnatelné s divokým kmenem FSC200. Naproti tomu, mutantní kmen *inFTS\_1680* jevil signifikantně sníženou schopnost replikace v porovnání s divokým kmenem FSC200 a to jak uvnitř BMMs (Obr. 3A), tak J774.2 (Obr. 3B). Rozdíl v intracelulárním růstu mezi *inFTS\_1680* a divokým kmenem FSC200 nebyl způsoben sníženou schopností růstu mutantní bakterie jako takové, protože růst divokého kmene a *inFTS\_1680* mutantu v Chamberlainově chemicky definovaném médiu byl vzájemně srovnatelný (Obr. 11A). Statisticky signifikantní rozdíl v intracelulární replikaci *inFTS\_1680* byl pozorován v časových intervalech 12 a 24 hodin po infekci BMMs a také po 24 hodinách v případě infekce J774.2 buněk. Funkční komplementací mutovaného kmene došlo k částečnému obnovení proliferační schopnosti na úroveň mateřského kmene, což naznačuje, že protein FTS\_1680 je významný pro intracelulární replikaci bakterie *F. tularensis*. Kromě toho inserční mutagenese genů (*FTS\_1681*, *FTS\_1682*) z predikované transkripční jednotky obsahující *FTS\_1680*, neovlivnila bakteriální proliferační schopnost (data neuvedena). Tyto výsledky tak představují další důležité kritérium, které naznačuje, že pozorovaná ztráta virulence plně souvisí s inaktivací genu *FTS\_1680*.

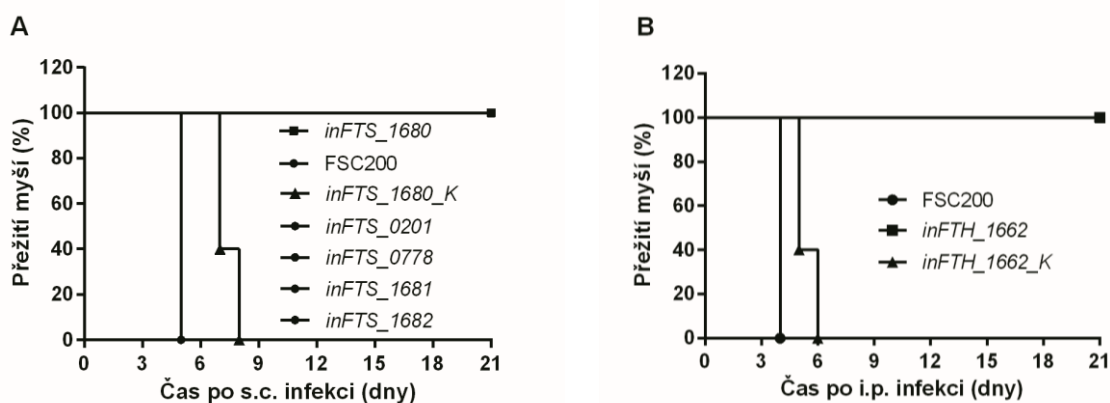


**Obr. 3** *FTS\_1680* přispívá k přežívání bakterie uvnitř BMMs a J774.2 buněk. Růstová kinetika divokého kmene FSC200 (plná kolečka), *inFTS\_1680* mutantního kmene (plné čtverečky), *inFTS\_1680* komplementovaného kmene (*inFTS\_1680\_K*; plné trojúhelníčky) a mutantních kmenů *inFTS\_0201* (prázdné čtverečky) a *inFTS\_0778* (prázdná kolečka) uvnitř (A) BMMs nebo (B) J774.2 buněk. Počet intracelulárních bakterií byl určen v intervalech 1, 6, 12 a 24 hodin po infekci. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry  $\log_{10}$  CFU/jamku  $\pm$  SD tří nezávislých experimentů provedených v triplicátech ( $n = 9$ ). Statistická významnost byla určena na základě nepárového t-testu; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$  (porovnáván mutantní kmen *inFTS\_1680* s divokým kmenem FSC200) a # $p < 0.05$  (porovnáván komplementovaný kmen s mutantním kmenem *inFTS\_1680*).

### 5.3. Studium virulence TPR-like proteinů na myším infekčním modelu

Abychom určili, zdali jsou proteiny FTS\_0201, FTS\_0778 a FTS\_1680 významné pro schopnost *F. tularensis* vyvolat onemocnění *in vivo*, skupiny pěti myší kmene BALB/c byly subkutánně infikovány divokým kmenem FSC200, mutantními kmeny *inFTS\_0201*, *inFTS\_0778*, *inFTS\_1680*, případně

*inFTS\_1680* komplementovaným kmenem. Vývoj infekce byl sledován pod dobu 21 dní. Myši infikované mutantními kmeny *inFTS\_0201* a *inFTS\_0778* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš uhynuly po pěti dnech infekce, srovnatelně se skupinou myši infikovanou mateřským kmenem FSC200. Naproti tomu, myši infikované *inFTS\_1680* mutantním kmenem přežily infekci nejen v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš, ale dokonce v dávce  $3 \times 10^6$  CFU/myš (Obr. 4A), přestože se u myši objevily symptomy onemocnění. Infekce komplementovaným kmenem vyvolala úhyn myši se zpožděním dvou až tří dnů ve srovnání s plně virulentním mateřským kmenem FSC200. Oslabení mutantního kmene *inFTS\_1680* bylo dále ověřeno s využitím intraperitoneálního modelu infekce. Podobně jak tomu bylo u subkutánní infekce, všechny myši infikované dávkou  $3 \times 10^6$  CFU/myš přežily infekci, avšak symptomy onemocnění byly pozorovány (Obr. 4B). Pro vyloučení možného polárního efektu na geny, které následují za genem *FTS\_1680*, byl určen virulentní fenotyp mutantních kmenů *inFTS\_1681* a *inFTS\_1682*. Obě mutantní formy dosahovaly úrovně virulence divokého kmene (Obr. 4A). Tyto výsledky tak dále potvrdily význam proteinu kódovaného genem *FTS\_1680* v *F. tularensis* *in vivo* virulenci.

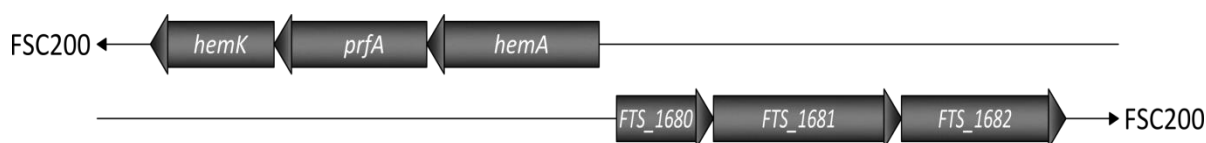


**Obr. 4 Protein *FTS\_1680* je významný pro bakteriální virulenci na myším tularemickém modelu.**

Procentuálně vyjádřené přežití bylo stanoveno na skupině pěti myši kmene BALB/c, které byly infikovány (A) subkutánně (s.c.) mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^6$  CFU/myš, divokým kmenem FSC200 ( $3 \times 10^2$  CFU), *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem (*inFTS\_1680\_K*;  $3 \times 10^2$  CFU), *inFTS\_0201* mutantním kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU), *inFTS\_0778* mutantním kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU), *inFTS\_1681* mutantním kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU) nebo *inFTS\_1682* mutantním kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU), případně (B) intraperitoneálně (i.p.) mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^2$  nebo  $3 \times 10^6$  CFU/myš, divokým kmenem FSC200 ( $3 \times 10^2$  CFU) nebo *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem ( $3 \times 10^2$  CFU).

#### 5.4. Popis genového lokusu obklopujícího gen *FTS\_1680*

Genová oblast v okolí *FTS\_1680* je vysoce konzervovaná mezi různými kmeny *Francisella*, včetně tří po sobě jdoucích genů stejné orientace (*FTS\_1680*, *FTS\_1681* a *FTS\_1682*) (Obr. 5). *FTS\_1680* kóduje hypotetický protein o velikosti 212 aminokyselin, produktem genu *FTS\_1681* je faktor BamB spjatý s vnější membránou o velikosti 456 aminokyselin a *FTS\_1682* kóduje protein z rodiny DHA1 (drug:H<sup>+</sup> antiporter-1) o velikosti 393 aminokyselin, který spadá do podtřídy MFS (major facilitator superfamily). Vyhledáváním v proteinové databázi BLAST bylo zjištěno, že protein *FTS\_1680* sdílí 28% (query cover 93%, E-value = 2e-15) homologii s TPR proteinem YfgM z *E. coli* K-12 a protein *FTS\_1681* pak vykazuje 26% (query cover 94%, E-value = 6e-48) homologii s proteinem YfgL z *E. coli* K-12. Proteiny YfgM a YfgL jsou spojovány s teplotní tolerancí (89) a velmi nedávno bylo také popsáno, že protein YfgM je funkčně zapojen v SecYEG translokačním systému *E. coli* (90). Abychom vyloučili možnost polárního efektu na následující tzv. downstream geny, ověřili jsme hladinu přepisované mRNA u genů sousedících s *FTS\_1680*. qRT-PCR neprokázala signifikantní vliv inserce v genu *FTS\_1680* na expresi genů *FTS\_1681* a *FTS\_1682* (data neuvedena).

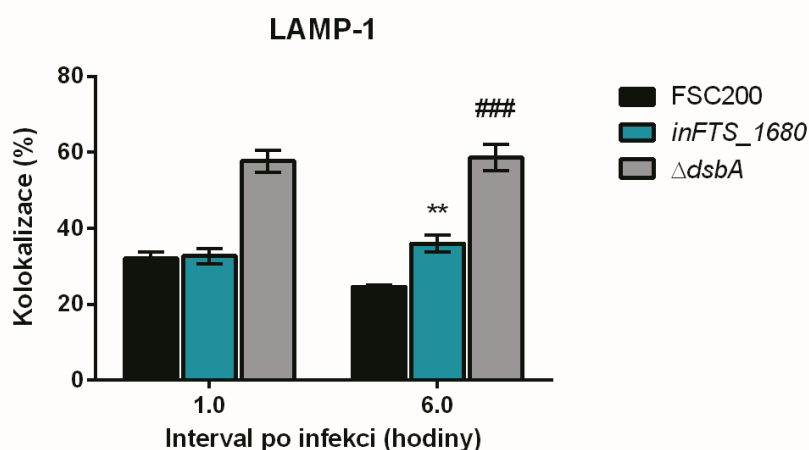


**Obr. 5 Schematický diagram znázorňující organizaci genové oblasti obklopující *FTS\_1680* v FSC200 kmeni.** Jedná se o oblast, která je vysoce konzervovaná napříč různými kmeny *Francisella*. Zahrnuje tři po sobě jdoucí geny stejné orientace (*FTS\_1680*, *FTS\_1681*, *FTS\_1682*). *FTS\_1680* kóduje hypotetický protein o velikosti 212 aminokyselin, *FTS\_1681* je anotovaný jako faktor BamB spjatý s vnější membránou o velikosti 456 aminokyselin a *FTS\_1682* kóduje drug:H<sup>+</sup> antiporter-1 protein z DHA1 rodiny o velikosti 393 aminokyselin, který je součástí podtřídy MFS (major facilitator superfamily).

#### 5.5. Schopnost úniku *inFTS\_1680* z fagosomu hostitelské buňky

Typický infekční cyklus bakterie *F. tularensis* uvnitř makrofágů zahrnuje úspěšný únik z fagosomu s následným aktivním pomnožením v cytosolu hostitelských buněk. Na základě snížené schopnosti proliferace mutantního kmene *inFTS\_1680* uvnitř BMMs byla analyzována schopnost mutantu uniknout z fagosomu hostitelských buněk s využitím kolokalizační studie se

znakem pozdních endosomů LAMP-1. Jako pozitivní kontrola byl použit  $\Delta dsbA$  mutant, který byl již dříve popsán jako neschopný úniku do cytosolu hostitelské buňky (91). Mutantní kmen *inFTS\_1680* vykazoval téměř stejnou úroveň kolokalizace s LAMP-1 markerem jako mateřský kmen FSC200. Kolokalizace mutanta s LAMP-1 markerem činila 31% v časovém intervalu 1 hodina po infekci a 35,3% 6 hodin po infekci. Oproti tomu, kolokalizace divokého kmene FSC200 s LAMP-1 markerem činila 31,3% po 1 hodině s následným signifikantním snížením na 23,5% po 6 hodinách infekce ve srovnání s FSC200 (Obr. 6). Procentuální rozdíl v LAMP-1 kolokalizaci divokého a *inFTS\_1680* mutantního kmene nedosahoval hodnot detekovaných u  $\Delta dsbA$  mutanta (Obr. 6). I přes statistický rozdíl v počtu bakterií mateřského a mutantního kmene pozorovaný u 6 hodinového intervalu, je možné předpokládat, že důvodem celkového oslabení mutantního kmene je spíše narušená schopnost proliferace *inFTS\_1680* v cytosolu hostitelské buňky než mírně snížená schopnost úniku z fagosomu.



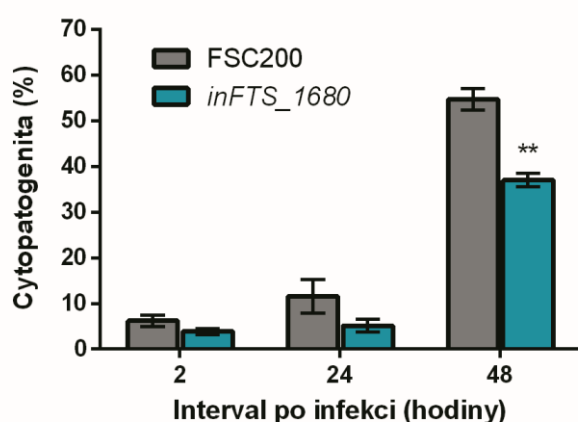
**Obr. 6** Mutantní kmen *inFTS\_1680* je schopen úniku z fagosomu BMMs. Kvantifikace kolokalizace LAMP-1 s divokým kmenem FSC200 (černá barva), mutantním kmenem *inFTS\_1680* (modrá barva) nebo s  $\Delta dsbA$  mutantními bakteriemi (šedá barva). V každém časovém bodě bylo analyzováno 100 infikovaných buněk ze tří rozdílných krycích sklíček. Výsledky reprezentují průměr tří vzorků  $\pm$  SD ze tří nezávislých experimentů. Statistická významnost byla určena pomocí t-testu; \*\* $p < 0,01$ , (porovnávání *inFTS\_1680* mutantní kmen s divokým kmenem FSC200) a ### $p < 0,001$  (porovnávání *inFTS\_1680* mutantní kmen s  $\Delta dsbA$  mutantním kmenem).

## 5.6. Role proteinu FTS\_1680 v buněčné cytopatogenitě indukované mikroblem *F. tularensis*

Pro studium role proteinu FTS\_1680 v buněčné cytopatogenitě byly BMMs infikovány divokým kmenem FSC200 nebo *inFTS\_1680* mutantním kmenem. Množství uvolněné laktátdehydrogenasy (LDH) do buněčného supernatantu bylo analyzováno v čase 2 hod, 24 hod a 48 hod po infekci. Dvě

hodiny po infekci byla hladina LDH uvolněné z buněk infikovaných *inFTS\_1680* (přibližně 4%) srovnatelná s množstvím LDH stanoveném u mateřského kmene FSC200 (přibližně 6%) (Obr. 7). V intervalu 24 hodin po infekci se hladina uvolněné LDH zvýšila na 5% v případě mutantního kmene a 11% v případě divokého kmene (Obr. 7). Za 48 hodin po infekci dosáhla hladina uvolněné LDH u buněk infikovaných mutantním kmenem 37%, což byla hodnota signifikantně nižší ve srovnání s divokým kmenem FSC200, kde byla identifikována hodnota 54% (Obr. 7).

LDH test ukázal, že mutantní kmen *inFTS\_1680* je schopen indukovat časově závislou ztrátu integrity buněčné membrány na signifikantně nižší hladině než je tomu u divokého kmene. Nižší cytopatogenita se tak pravděpodobně podílí na oslabeném fenotypu *inFTS\_1680*.



**Obr. 7 Indukce cytotoxicity uvnitř BMMs.** BMMs byly infikovány divokým kmenem (šedé sloupce) nebo mutantním kmenem *inFTS\_1680* (modré sloupce). V časových intervalech 2, 24 a 48 hodin po infekci byly z kultivačních jamek odebrány supernatanty, ve kterých byla následně stanovena aktivita LDH pomocí komerční soupravy (LDH Cytotoxicity Detection Kit, Roche). LDH aktivita je vyjádřena procentuálně a vztažena k hladině LDH detekované u neinfikovaných lyzovaných buněk (pozitivní kontrola). Výsledky pocházejí ze tří nezávislých experimentů, provedených v kvadruplicatech a jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD. Statistická významnost byla určena pomocí t-testu; \*\* $p < 0.01$ .

### 5.7. Studium protektivního charakteru mutantního kmene *inFTS\_1680*

Myši kmene BALB/c byly imunizovány subkutánně mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Imunizované myši byly po 28 dnech infikovány plně virulentním FSC200 kmenem v dávce  $3 \times 10^2$  nebo  $3 \times 10^5$  CFU/myš a to jak cestou subkutánní (s.c.), tak intraperitoneální (i.p.). Všechny imunizované myši přežily infekci virulentním kmenem a to i v dávce  $3 \times 10^5$  CFU/myš

bez jakýchkoli projevů tularemické infekce (Tab. 3). Naproti tomu kontrolní skupina neimunizovaných myší uhynula pátý den po infekci.

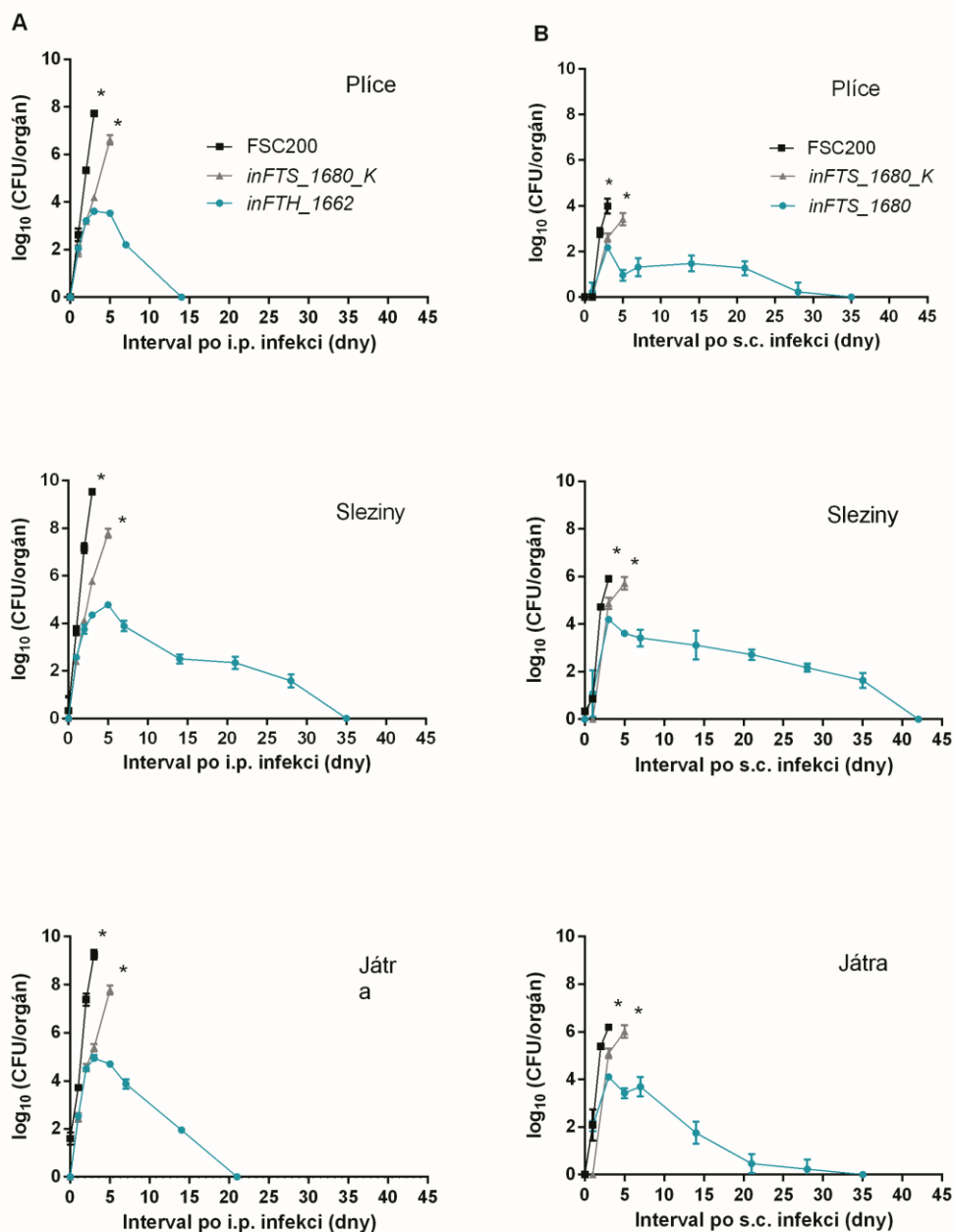
**Tab. 3 *inFTS\_1680* mutantní kmen je schopen chránit myši kmene BALB/c proti následné infekci plně virulentním FSC200 kmenem.**

Imunizační dávka (CFU) <i>inFTS_1680/200</i>	Dávka (CFU) a způsob infekce FSC200	Přeživší/celkový počet myší
$3 \times 10^2$	$3 \times 10^2$ s.c.	5/5
$3 \times 10^2$	$3 \times 10^5$ s.c.	5/5
$3 \times 10^2$	$3 \times 10^2$ i.p.	5/5
$3 \times 10^2$	$3 \times 10^5$ i.p.	5/5

### 5.8. Schopnost eliminace *inFTS\_1680* mutantního kmene z myších orgánů

Pro testování schopnosti mutantního kmene *inFTS\_1680* přetrvávat a šířit se v hostitelských tkáních, BALB/c myši byly infikovány intraperitoneálně divokým kmenem FSC200 nebo mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Počty bakterií byly analyzovány v homogenátech plicní, jaterní a slezinné tkáně v časových intervalech dvě hodiny a 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28, a 35 dní po infekci (Obr. 8A). Získané výsledky ukázaly, že v případě intraperitoneální infekce divokým kmenem byly bakterie detekovány již dvě hodiny po infekci v jaterní tkáni a následně první den po infekci v plicích a slezině. Třetí den po infekci došlo k výraznému nárůstu celkového počtu bakterií ve všech sledovaných orgánech, kdy bylo identifikováno téměř  $10^{10}$  bakterií v játrech,  $10^9$  bakterií ve slezině a  $10^8$  bakterií v plicích. Vzhledem k rychlému rozvoji onemocnění v případě plně virulentních kmenů skupina myší infikovaná divokým kmenem FSC200 uhynula do pátého dne od inokulace. Ačkoliv byl mutantní kmen *inFTS\_1680* zpočátku schopen replikace ve všech studovaných tkáních, od třetího dne infekce se počty bakterií průběžně snižovaly, až došlo k úplné eliminaci bakterií, a to nejprve z plic v den čtrnáctý, poté z jater dvacátý první den a nakonec ze sleziny třicátý pátý den. V případě subkutánní cesty infekce (obr. 8B), byly identifikovány celkově nižší počty bakterií ve všech studovaných orgánech v porovnání s intraperitoneální cestou infekce (obr. 8A), avšak bakterie byly schopny přetrvávat v orgánech déle. Získané výsledky prokázaly, že mutantní kmen *inFTS\_1680* je schopen myši infikovat a přetrvávat v infikovaných orgánech, avšak není schopen se efektivně množit v hostitelských tkáních. Dále byly myši infikovány *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem, kdy bylo zjištěno, že životaschopné mikroorganismy detekované

v orgánech nedosahují takové úrovně, jaká byla detekována v případě mateřského kmene, nicméně byl zaznamenán signifikantní nárůst v porovnání s *inFTS\_1680* mutantním kmenem (obr. 8A a B).

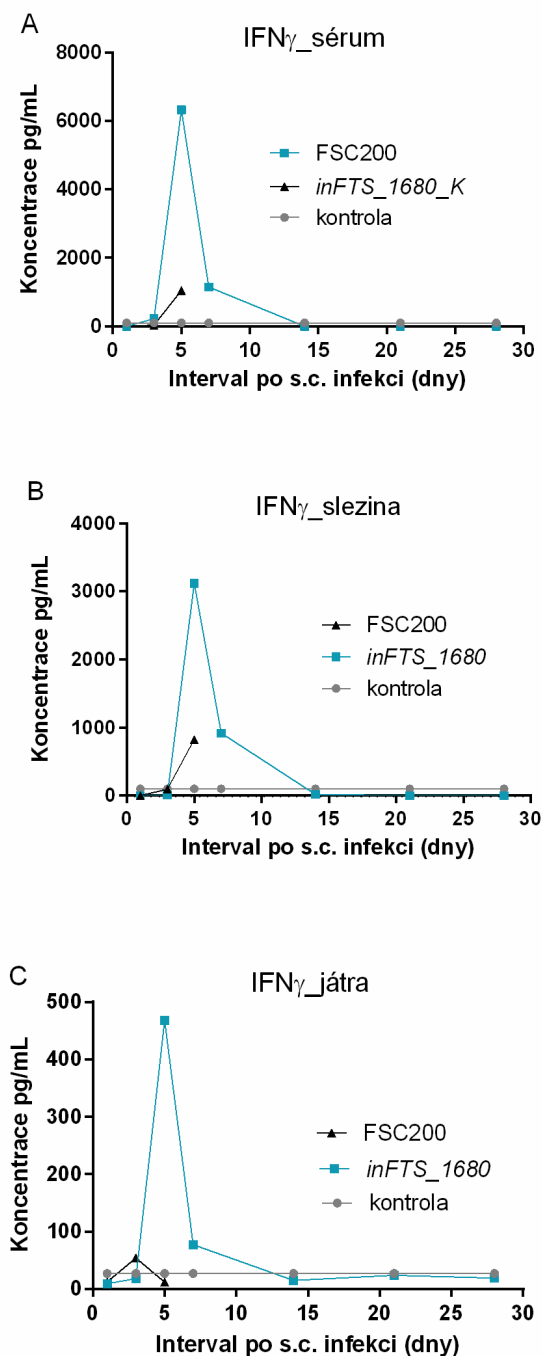


**Obr. 8** Bakterie mutantního kmene *inFTS\_1680* vykazují snížený růst v myších orgánech. Počty bakterií detekované ve slezině, plicích a játrech myši kmene BALB/c infikovaných intraperitoneálně (i.p.) (A) nebo subkutánně (s.c.) (B) divokým kmenem FSC200 (černá barva), *inFTS\_1680* mutantním kmenem (modrá barva) nebo *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem (*inFTS\_1680\_K*; šedá barva) v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Všechny myši, které byly infikovány divokým kmenem FSC200 nebo *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem, a uhynuly po pátém dnu infekce, jsou označeny

hvězdičkou (\*). Výsledky znázorňují průměr  $\log_{10}$  CFU/orgán  $\pm$  SD v jednotlivých časových intervalech po infekci.

### 5.9. Analýza IFN- $\gamma$ u myší kmene BALB/c po subkutánní infekci *inFTS\_1680*

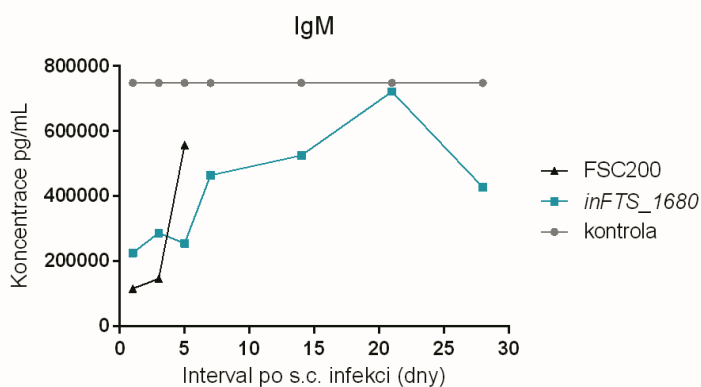
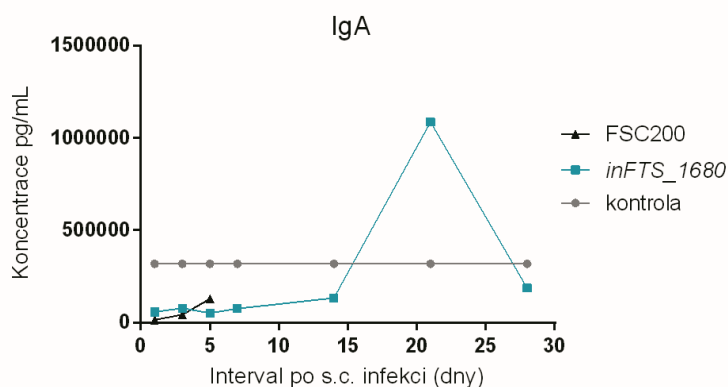
Naše výsledky prokázaly, že mutantní kmen *inFTS\_1680* je schopen vyvolat protektivní odpověď proti subkutánní a intraperitoneální infekci plně virulentním mateřským kmenem FSC200 u myší kmene BALB/c. Z tohoto důvodu jsme se následně zaměřili na analýzu cytokinu IFN- $\gamma$ , u kterého byla prokázána významná spojitost s bakteriální patogenesí a protekcí před infekcí bakterií *Francisella* (92). Jednotlivé skupiny myší kmene BALB/c (n=3) byly subkutánně infikovány mateřským kmenem FSC200 nebo *inFTS\_1680* mutantním kmenem v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Séra a homogenáty jater a sleziny byly odebírány 1., 3., 5., 7., 14., 21. a 28. den po infekci. Koncentrace IFN- $\gamma$  byla stanovena pomocí komerčního systému tzv. Quantibody Array System (RayBiotech, Inc.) Naše výsledky ukázaly, že koncentrace IFN- $\gamma$  v séru, stejně tak jako v játrech a slezině myší infikovaných rodičovským kmenem FSC200 dosahovaly velmi nízkých hodnot v časných fázích infekce (Obr. 9). Tyto výsledky naznačují, že organismus není schopen efektivně zacílit imunitní odpověď proti invazi patogenu. V následujících dnech hladina IFN- $\gamma$  slabě vzrostla a dosáhla maxima pátý den po infekci ve všech třech typech testovaného materiálu (Obr. 9). Pět dnů po FSC200 infekci byl zaznamenán úhyn myší v důsledku rozvoje infekce. Naproti tomu, infekce mutantním kmenem *inFTS\_1680* vyústila v dramatické zvýšení koncentrace IFN- $\gamma$  ve všech typech zkoumaného materiálu (Obr. 9). Maximální hladina IFN- $\gamma$  byla zaznamenána pátý den po infekci s postupným snižováním koncentrace až k nulovým hodnotám, které byly zjištěny mezi čtrnáctým a dvacátým prvním dnem po infekci (Obr. 9). Získané výsledky naznačují, že IFN- $\gamma$  představuje klíčový cytokin v aktivaci hostitelského imunitního systému proti bakteriím mutantního kmene *inFTS\_1680*. V tomto kontextu je zřejmé, že IFN- $\gamma$  může být zodpovědný za ochrannou schopnost mutantního kmene v subkutánním modelu tularemické infekce.

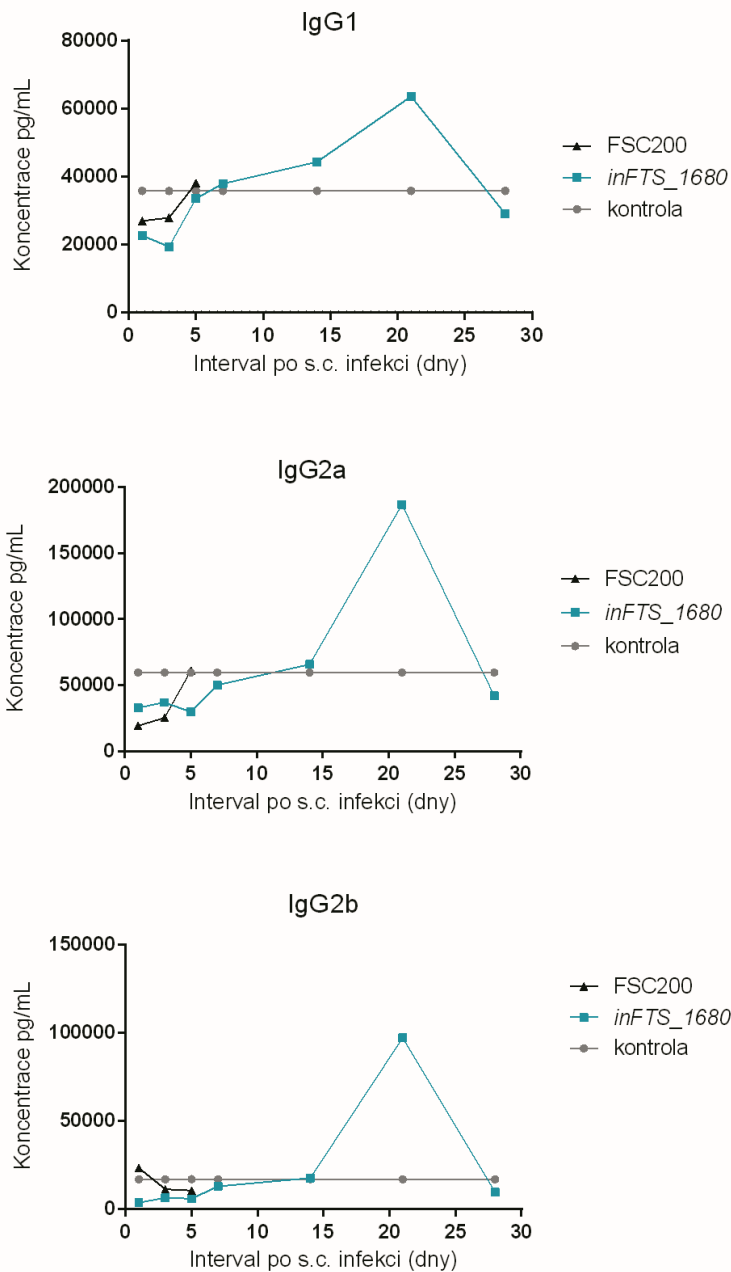


**Obr. 9** Kinetika IFN- $\gamma$  odpovědi u myši kmene BALB/c po inokulaci *inFTS\_1680* mutantním kmenem. Vzorky sér (A), sleziny (B) a jater (C) byly připraveny z neinfikovaných kontrolních myši kmene BALB/c (šedá barva) a myši inokulovaných *inFTS\_1680* mutantním kmenem (modrá barva) nebo FSC200 kmenem (černá barva) v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Hladiny IFN- $\gamma$  byly stanoveny pomocí komerčního systému tzv. Quantibody Array System (RayBiotech, Inc.).

## 5.10. Protilátkový profil v sérech myši kmene BALB/c po subkutánní infekci *inFTS\_1680*

Vedle indukce cytokinu IFN- $\gamma$  jsme sledovali rozvoj humorální adaptivní imunity, která představuje další důležitý imunologický parametr *in vivo* protekce. Myši kmene BALB/c ( $n=3$ ) byly subkutánně infikovány mutantním kmenem *inFTS\_1680* v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Hladina protilátek IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b a IgA byla stanovena v myších sérech 1., 3., 5., 7., 14., 21. a 28. den po imunizaci a následně srovnána s hladinou protilátek detekovaných u myší infikovaných rodičovským kmenem FSC200. Séra myší imunizovaných mutantním kmenem *inFTS\_1680* prokázaly zvýšenou hladinu všech stanovovaných protilátek kromě IgM, a to v pozdní fázi infekce (Obr. 10). Produkce protilátek vykazovala velmi podobnou kinetiku s nárůstem hladin po 14-tém dni infekce s maximem hladin pozorovaným 21. den po infekci (Obr. 10). Hladina protilátek IgG1, IgG2a, IgM a IgA detekovaných po vakcinaci divokým kmenem FSC200 narůstala postupně až do pátého dne, kdy došlo k úhynu infikovaných myších (Obr. 10). Hladina protilátek detekovaných po vakcinaci divokým kmenem FSC200 nedosahovala vyšších hodnot, než které byly nalezeny v sérech kontrolní skupiny myší (Obr. 10).





**Obr. 10** Kinetika *in vivo* protilátkové odpovědi u myší kmene BALB/c po inokulaci inFTS\_1680 mutantním kmenem. Vzorky sér byly odebrány z neinfikovaných kontrolních myší kmene BALB/c (šedá barva) a myší inokulovaných inFTS\_1680 mutantním kmenem (modrá barva) nebo FSC200 kmenem (černá barva) v dávce  $3 \times 10^2$  CFU/myš. Hladiny protilátek IgA, IgM, IgG1, IgG2a a IgG2b byly stanoveny pomocí komerčního systému tzv. Quantibody Array System (RayBiotech, Inc.).

### 5.11. Mapování imunoproteomu po imunizaci *inFTS\_1680* a infekci FSC200

Jak jsme prokázali, protektivní odpověď *inFTS\_1680* mutantního kmene je doprovázena zvýšenou hladinou protilátek IgG1, IgG2a, IgG2b a IgA. Rozhodli jsme se tedy stanovit spektrum antigenů rozpoznávaných specifickými protilátkami po vakcinaci *inFTS\_1680* mutantním kmenem. Za předpokladu, že proteiny vystavené na povrchu buňky a dále proteiny asociované s membránou, jsou klíčovým cílem protilátek, jsme provedli analýzu pilínového a membránového subproteomu zapojením imunoproteomického přístupu. S využitím sér z BALB/c myši imunizovaných mutantním kmenem *inFTS\_1680* bylo identifikováno 54 antigenů (Tab. 4), včetně 16, které doposud nebyly popsány. Skupina nových imunoreaktivních antigenů zahrnuje spektrum enzymů, stejně tak jako ribosomální a stresové proteiny. Z nalezených proteinů stojí za zmínku protein biosyntesy kapsuly CapB (FTS\_1385), protein PilA (FTS\_0381), D-alanyl-D-alanin karboxypeptidasa (FTS\_1034), chaperon DnaJ (FTS\_1168) a PdpE (FTS\_0101/FTS\_1129). Vzhledem k tomu, že vakcinace *inFTS\_1680* mutantním kmenem chrání myši před infekcí plně virulentním kmenem FSC200, použili jsme také séra z myši imunizovaných mutantním kmenem a následně infikovaných FSC200 kmenem, ve kterých jsme stanovovali FSC200 specifické antigeny. V tomto případě jsme identifikovali 70 antigenů rozpoznávaných séry z imunizovaných a následně infikovaných myši (Tab. 4), z nichž skupina 19-ti antigenů, představuje nově identifikované proteiny (Tab. 4). Tato nová skupina zahrnuje také proteiny se známou rolí v patogenesi *F. tularensis*, kam patří například protein IglE (FTS\_0111/FTS\_1139) a hypotetický protein (FTS\_0414).

**Tab. 4 Proteiny rozpoznávané buď séry z myši kmene BALB/c vakcinovaných *inFTS\_1680* mutantním kmenem a /nebo séry z myši imunizovaných *inFTS\_1680* a následně infikovaných FSC200 virulentním kmenem.**

FSC200 lokus	Název proteinu	Detekováno <i>inFTS1680</i> sérem	Detekováno <i>inFTS1680</i> + FSC200 sérem	Antigen	Publikováno
FTS_1229	Hypotetický protein FTS_1229		x	DF	
FTS_1783	NADH dehydrogenasa I podjednotka E	x	x	DF	
FTS_1782	NADH dehydrogenasa I podjednotka F		x	PF, DF	
FTS_1781	NADH dehydrogenasa podjednotka G	x		DF	(93)
FTS_1779	NADH dehydrogenasa podjednotka I		x	DF	
FTS_1753	F0F1 ATP syntasa podjednotka alfa	x	x	PF, DF	(93)

DF = detergentová frakce, PF = pilínová frakce

Tab. 4 pokračování

FSC200 lokus	Název proteinu	Detekováno <i>in</i> FTS1680 sérem	Detekováno <i>in</i> FTS1680 + FSC200 sérem	Antigen	Publikováno
FTS_1751	F0F1 ATP syntasa podjednotka beta	x		PF, DF	(93-95)
FTS_1727	Aconitát hydratasa	x	x	DF	(93, 96, 97)
FTS_1636	Peptidasa rodiny U61	x	x	PF	(98, 99)
FTS_1709	ET-Tu		x	PF	(93, 96, 100- 104)
FTS_1702	50S ribosomální protein L7/L12	x	x	PF, DF	(95, 96, 100- 103)
FTS_1681	Hypotetický protein FTS_1681		x	PF	
FTS_1862	30S ribosomální protein S1	x	x	PF, DF	(93, 95, 103, 104)
FTS_1857	Protein buněčného dělení FtsZ	x	x	PF, DF	(93, 95, 96, 103, 104)
FTS_1883	Protein z rodiny vazebných proteinů rozpuštěných v periplasmě		x	PF, DF	(93, 102, 103)
FTS_0161	Univerzální stresový protein	x	x	PF, DF	(95)
FTS_0203	Pyrrolidon karboxylát peptidasa	x	x	PF	(98, 101)
FTS_0221	30S ribosomální protein S2	x	x	DF	(103)
FTS_0222	EF-Ts	x		PF	(98, 101-104)
FTS_0265	Glutamát dehydrogenasa	x	x	PF	(95, 105)
FTS_0452	Hypotetický protein FTS_0452	x	x	DF	(98)
FTS_0479	Aminotransferasa T	x		PF	(100, 101)
FTS_0482	Glycine dehydrogenasa podjednotka 2		x	PF	
FTS_1552	AcCoA carboxylasa	x	x	PF	(93, 95, 96, 98- 100, 103, 104)
FTS_1551	AcCoA carboxylase		x	PF	(101)
FTS_1517	Succinyl CoA syntetasa podjednotka beta	x	x	PF	(97)
FTS_1510	Lyasa biosyntesy pyridoxalu PdxS	x		PF	(93, 102)

DF = detergentová frakce, PF = pilínová frakce

Tab. 4 pokračování

FSC200 lokus	Název proteinu	Detekováno <i>in</i> FTS1680 sérem	Detekováno <i>in</i> FTS1680 + FSC200 sérem	Antigen	Publikováno
FTS_0990	Protein rodiny AhpC/TSA	x	x	PF	(96)
FTS_0682	Putrescin ABC transportér	x	x	DF	
FTS_1295	Protein OmpA rodiny (FopA)	x	x	PF, DF	(93, 94, 96, 98, 101-104)
FTS_0889	Faktor pro replikaci bakteriofága Q beta		x	PF	(98, 101)
FTS_0931	50S ribosomální protein L25		x	PF	
FTS_1491	Fosfopyruvát hydratasa (enolasa)		x	PF, DF	(104)
FTS_1485	Protein 18 z rodiny chitinas	x	x	PF	(93, 101, 103)
FTS_1471	Peroxidasa/katalasa	x	x	PF	(93-97, 101- 104)
FTS_1476	Glycerofosforyl diester fosfodiesterasa		x	DF	(96)
FTS_1385	Protein CapB	x	x	DF	
FTS_0323	Protein rodiny OmpA	x	x	PF, DF	(93, 94, 96, 98)
FTS_0334	lipoprotein rodiny OmpA	x		DF	
FTS_0355	LemA like protein	x	x	PF, DF	(93, 96, 98, 99, 103)
FTS_0381	Tfp protein Pila	x	x	DF	
FTS_0412	Hypotetický protein FTS_0412	x	x	PF, DF	(94, 96, 98, 100)
FTS_0414	Hypotetický protein FTS_0414		x	DF	
FTS_0415	Hypotetický protein FTS_0415	x	x	PF, DF	
FTS_0429	Hypotetický protein FTS_0429	x	x	PF, DF	(97, 102)
FTS_0273	Dihydrolipoamid dehydrogenasa		x	PF	
FTS_1201	Hypotetický protein FTS_1201	x	x	PF	(98, 99, 101)
FTS_1185	Lipoprotein B rodiny	x	x	PF	(99)
FTS_1034	D-Ala D-Ala karboxypeptidasa	x		PF, DF	

DF = detergentová frakce, PF = pilínová frakce

Tab. 4 pokračování

FSC200 lokus	Název proteinu	Detekováno <i>in</i> FTS1680 sérem	Detekováno <i>in</i> FTS1680 + FSC200 sérem	Antigen	Publikováno
FTS_1000	30S ribosomální protein S6		x	PF	
FTS_1067	Protein disulfid isomerasa	x	x	DF	(93, 96, 98, 103)
FTS_0829	Glycerol-3-fosfát acyltransferasa PlsX		x	DF	
FTS_0828	Methionin transportér metN		x	PF, DF	
FTS_0819	Glycerofosforyl diester fosfodiesterasa	x		PF	
FTS_0783	Aspartát aminotransferasa	x		PF	
FTS_0685	Hypotetický lipoprotein FTS_0685	x	x	DF	
FTS_1168	Chaperon DnaJ	x	x	DF	
FTS_1167	Chaperon DnaK	x	x	PF	(93, 95-104)
FTS_1441	Tfp protein	x	x	DF	(98, 99)
FTS_0111/ FTS_1139	Hypotetický protein FTS_0111/FTS_1139		x	PF	
FTS_0101/ FTS_1129	Hypotetický protein FTS_0101/FTS_1129	x	x	PF	
FTS_1119	Pyruvátkinasa		x	PF	
FTS_1117	Glyceraldehyde 3-fosfát dehydrogenasa	x		PF	(95, 101)
FTS_1109	Protein přenášeující acyl	x	x	DF	(103)
FTS_0659	Hypotetický protein FTS_0659		x	PF	(96)
FTS_0654	Hypotetický protein FTS_0654		x	PF	
FTS_0642	Hypotetický protein FTS_0642	x	x	PF	(98)
FTS_0617	Bakterioferritin		x	PF	(93, 95, 96, 101)
FTS_0600	Transamin/perosamin syntetasa	x	x	DF	(105)
FTS_1365	Galaktokinasa	x	x	DF	
FTS_0292	AcCoA karboxylasa, karboxyltransferasa podjednotka alfa		x	DF	(96, 101)
FTS_0571	Hypotetický protein FTS_0571	x		PF	(96, 98, 101, 103, 104)
FTS_0570	Hypotetický protein FTS_0570	x	x	PF	(93, 98, 99)

DF = detergentová frakce, PF = pilínová frakce

Tab. 4 pokračování

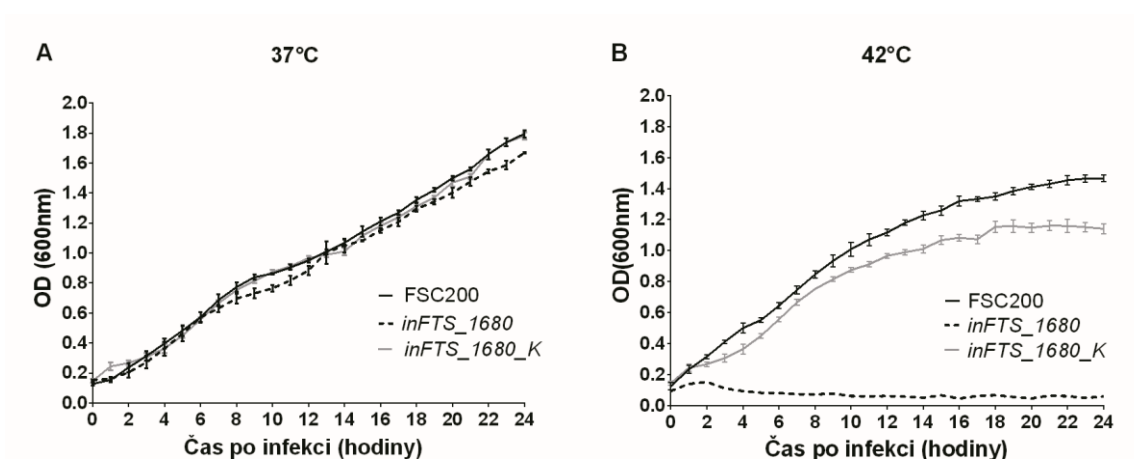
FSC200 lokus	Název proteinu	Detekováno inFTS1680 sérum	Detekováno inFTS1680 + FSC200 sérum	Antigen	Publikováno
<b>FTS_0568</b>	Hypotetický protein FTS_0568		x	DF	
<b>FTS_0543</b>	Hypotetický protein FTS_0543		x	DF	
<b>FTS_0542</b>	Lipid-A-disaccharid syntasa		x	DF	
<b>FTS_0540</b>	(3R)- hydroxymyristoyl- ACP dehydratasa		x	PF	
<b>FTS_0519</b>	Faktor buněčného dělení MinE		x	PF	
<b>FTS_1670</b>	Chaperonin GroEL	x	x	PF	(93-96, 98-104)
<b>FTS_0098/ FTS_1126</b>	IgIB	x		PF	(93, 98, 104)
<b>FTS_0008</b>	Hypotetický protein FTS_0008	x	x	PF	(98, 103, 104)
<b>FTS_0093</b>	Hypotetický protein FTS_0093	x	x	PF	(93, 98, 103, 104)

DF = detergentová frakce, PF = pilínová frakce

## 5.12. FTS\_1680 a jeho role v adaptaci *F. tularensis* na stresové faktory

Růst mutantního *inFTS\_1680* a *inFTS\_1680* komplementovaného kmene v tekutém médiu při 37°C byl srovnatelný s růstem divokého kmene FSC200 (Obr. 11A). Pro studium případného zapojení proteinu FTS\_1680 v adaptaci na stres jsme sledovali růst *inFTS\_1680* mutantního kmene, komplementovaného kmene a mateřského kmene FSC200 za stresových podmínek simulujících prostředí, se kterým se bakterie musí vyrovnat uvnitř hostitelské buňky. Sledovali jsme růst a přežívání připravených bakteriálních kmenů při zvýšené teplotě 42°C (106), při depleci železa simulované kultivací v nekompletním Chamberlainovu médiu (107), při osmotickém stresu navozeném přidáním 4% NaCl do kompletního média (106), v médiu se změněnou hodnotou pH na pH=4 a při oxidativním stresu za přidání H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do kultivačního média do finální koncentrace 0,03 % (85).

Téměř za všech testovaných podmínek byly zaznamenány totožné růstové křivky pro mutantní kmen *inFTS\_1680* i mateřský kmen FSC200 (data neuvedena). Pouze při simulaci teplotního stresu rostl mutantní kmen *inFTS\_1680* podstatně pomaleji ve srovnání s mateřským kmenem (Obr. 11B). Komplementací mutantního kmene došlo k obnovení růstu na úroveň mateřského kmene (Obr. 11B). Navíc, mutantní kmeny s narušenými geny *FTS\_1681* a *FTS\_1682* rostly při 42°C na úrovni mateřského kmene, což naznačuje, že pozorovaná ztráta rezistence k teplotnímu stresu u mutantního kmene je způsobena výhradně inaktivací genu *FTS\_1680*. Celkově tyto údaje naznačují, že protein FTS\_1680 hraje významnou roli za podmínek, kdy bakterie čelí zvýšené teplotě, avšak tento protein již není významný pro překonávání stresových podmínek uvnitř hostitelské buňky v průběhu bakteriální infekce.



**Obr. 11** Protein FTS\_1680 hraje významnou roli v toleranci bakterie na teplotní stres. Růstové křivky *F. tularensis* kmenů, které rostly v Chamberlainově médiu při 37°C (A) nebo 42°C (B); divoký

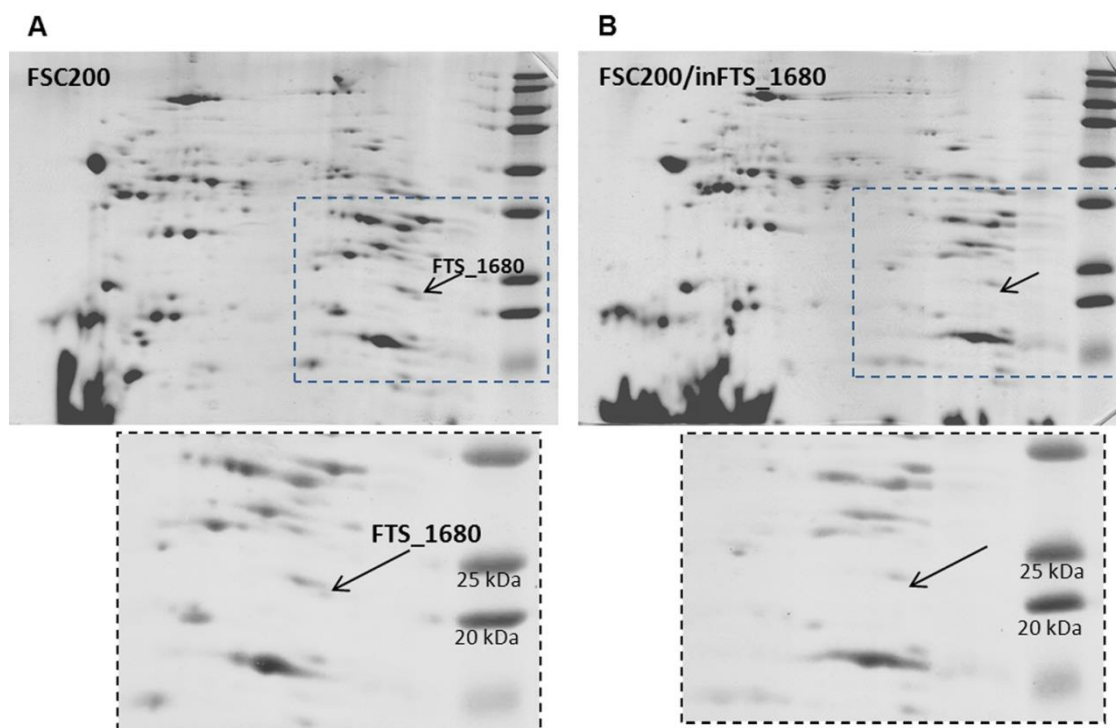
kmen *FSC200* (černá linie), *inFTS\_1680* mutantní kmen (čárkovaná linie) a *inFTS\_1680* komplementovaný kmen (šedá linie, přidán kanamycin = 20 µg/ml). Pro stanovení bakteriálního růstu byly vzorky (pentaplikáty) měřeny při  $OD_{600}$  a to každých 10 minut po dobu 24 hodin. CFU bylo analyzováno na konci každého experimentu pro ověření  $OD_{600}$  měření.

### 5.13. Analýza protein-proteinových interakcí proteinu FTS\_1680

Skutečnost, že protein FTS\_1680 hraje roli v adaptaci bakterie na teplotní stres a dále predikovaná přítomnost TPR motivů v sekvenci proteinu naznačují, že protein FTS\_1680 může interagovat se zástupci proteinů teplotního stresu, jako jsou GroEL (FTS\_1670), DnaK (FTS\_1167), DnaJ2 (FTS\_0277), GrpE (FTS\_1166) a HtpG (FTS\_0263). Interakce proteinů, vedoucí ke katalytické aktivitě adenylátcyklasy Cya a produkci cAMP byla sledována pomocí hydrolýzy maltosy na MacConkey/maltosových plotnách. Bohužel se nepodařilo prokázat interakci proteinu FTS\_1680 s žádným ze zvolených proteinů (data neuvedena). Expres v *cya* deficientním kmeni DHM1 vedla k syntese cAMP a aktivaci reportérového genu *mal* pouze v případě pozitivní kontroly.

### 5.14. Lokalizace proteinu FTS\_1680

Nástroj pro predikci signálních sekvencí lipoproteinů LipPred (108), jenž identifikuje acylované proteiny na základě přítomnosti tzv. lipoboxu [LVI][ASTVI][GAS][C] v aminokyselinové sekvenci proteinu, identifikoval protein FTS\_1680 jakožto lipoprotein (lipobox AIIC) s predikční spolehlivostí 0,99. Tato predikce byla ověřena experimentálně pomocí fázové separace s Tritonem X-114 (109) s následnou analýzou proteinů detergentové fáze pomocí 2D-SDS-PAGE. Účinnost frakcionace proteinů do vodné a detergentové fáze byla nejprve ověřena imunodetekcí proteinů známé lokalizace (neacylovaný protein vnější membrány FopA a lipoprotein DsbA) (data neuvedena). Protein FTS\_1680 byl opakovaně identifikován v detergentové frakci (Obr. 12). Porovnáním 2D-proteinových map detergentových frakcí mateřského kmene *FSC200* a mutantního kmene *inFTS\_1680* byla také potvrzena absence proteinu FTS\_1680 v mutantním kmeni (Obr. 12A a B). Tyto výsledky potvrzují membránovou lokalizaci proteinu FTS\_1680 a rovněž jsou ve shodě s predikovanou acylací sledovaného proteinu.



**Obr. 12 (A) Reprezentativní 2D-SDS-PAGE proteinová mapa rozdělených proteinů detergentové fáze získané fázovou separací (Triton X-114 – voda) proteinů bakterie *F. tularensis* ssp. *holarctica* FSC200. Protein kódovaný FTS\_1680 byl detekován v bazické oblasti rozsahu pH 3-10 a v rozmezí molekulových hmot 20-25 kDa (v souladu s teoretickými MH/pI = 23,8 kDa/9,39) a identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie. (B) Reprezentativní 2D-SDS-PAGE proteinová mapa rozdělených proteinů detergentové fáze získané fázovou separací (Triton X-114 – voda) proteinů mutantního kmene inFTS\_1680. Protein kódovaný FTS\_1680 v této frakci nebyl detekován.**

## 6. DISKUSE

Řada intracelulárních patogenů je schopna úspěšně přežívat v hostitelských buňkách a vyvolávat onemocnění hostitele. *F. tularensis* k tomuto účelu využívá unikátní strategii vnitrobuněčného přežívání. Doposud však nebyly plně objasněny mechanismy buněčného vstupu, rychlého úniku z fagosomu, aktivního pomnožení v cytosolu a diseminace. Vzhledem k tomu že v posledních letech vznikla řada prací, které dokumentují spojitost mezi TPR proteiny a virulencí bakteriálních patogenů (8, 110), domnívali jsme se, že TPR proteiny by mohly hrát významnou roli ve virulenci *F. tularensis*.

Pro ověření této hypotézy byly na základě predikce vybrány geny *FTS\_0201*, *FTS\_0778* a *FTS\_1680* kódující TPR-like proteiny u *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Exprese těchto proteinů byla následně narušena pomocí inserční mutagenese TargeTron.

Schopnost bakterie množit se v hostitelských buňkách je hlavním předpokladem úspěšné patogenese intracelulárních patogenů. Proto byla nejprve posuzována schopnost replikace mutantních kmenů *inFTS\_0201*, *inFTS\_0778* a *inFTS\_1680* uvnitř myších makrofágů. Pouze *inFTS\_1680* mutantní kmen vykazoval signifikantně snížený růst v primárních BMMs (Obr. 3A) a mírně narušenou schopnost replikace v buňkách monocyto-makrofágové linie J774.2 (Obr. 3B). Ačkoliv byly pozorovány rozdíly v úrovni intracelulární replikace mezi těmito dvěma buněčnými modely, *inFTS\_1680* mutant vykazoval signifikantní snížení replikace v obou buněčných modelech, což naznačuje význam genu *FTS\_1680* pro zajištění optimálního množení bakterie uvnitř hostitelské buňky. Fenotypové odlišnosti v případě intracelulární proliferace uvnitř rozdílných fagocytujících buněčných linií byly pozorovány také u dalších oslabených mutantních kmenů *F. tularensis* (84, 85, 111).

Modelovým organismem pro sledování tularemické infekce *in vivo* je myší model. Studie přežití (TTD; Time To Death) byly provedeny na myších kmene BALB/c, při kterých bylo prokázáno, že mutantní kmeny *inFTS\_0201* a *inFTS\_0778* vykazují stejnou úroveň virulence jako původní mateřský kmen. Tyto výsledky naznačují, že v případě aplikovaného subkutánního myšího tularemického modelu, geny *FTS\_0201* a *FTS\_0778* nepředstavují významnou složku virulentního aparátu bakterie (Obr. 4A). Získané výsledky týkající se *inFTS\_0201* mutantního kmene však nekorelují s daty publikovanými ve studii (85), která uvádí, že při intraperitoneální infekci myší kmene BALB/c mutantním kmenem *F. tularensis* LVS s narušeným genem *FTL\_0205* (*FTS\_0201* ortholog) bylo pozorováno silné oslabení virulence. Pozorované nesrovnalosti ve virulenci mezi kmeny *inFTS\_201* a *FTL\_205* je možné vysvětlit rozdílným počtem NKD sekvencí, které se vyskytují ve struktuře

porovnávaných proteinů, dále pak rozdílnými typy podání infekce, eventuálně tím, že v případě FSC200 kmene dochází k zastoupení genu *FTS\_0201* dalšími faktory virulence, podobně jak bylo popsáno v publikaci Meibom et al. (112).

Následující TTD studie byly zaměřené na oslabený *inFTS\_1680* mutantní kmen. Významné bylo zjištění, že 100% myši subkutánně infikovaných mutantním kmenem *inFTS\_1680*, a to v dávce až  $3 \times 10^6$  CFU, bylo schopno přežít infekci. Naproti tomu, myši infikované jak divokým kmenem FSC200, tak *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem v dávce  $3 \times 10^2$  CFU nebyly schopny adaptace na bakteriální infekci a uhynuly 5 až 7 dní po inokulaci. Vzhledem k tomu, že úroveň virulence se může mezi subkutánním a intraperitoneálním modelem infekce velmi lišit, testovali jsme také mutantní kmen *inFTS\_1680* a příslušný komplementovaný kmen s využitím intraperitoneální cesty infekce. Podobně jak jsme zaznamenali u subkutánního podání, myši infikované mutantním kmenem *inFTS\_1680* byly schopny přežít bakteriální infekci, zatímco myši infikované divokým kmenem FSC200, případně *inFTS\_1680* komplementovaným kmenem, uhynuly na následky onemocnění. Získané výsledky ukázaly, že pozorované oslabení mutantního kmene *inFTS\_1680* se vyskytuje nezávisle na cestě podání. Celkově tedy výsledky našich experimentů podporují hypotézu, že gen *FTS\_1680* se podílí na virulenci kmene FSC200 *F. tularensis*.

Vzhledem k dosaženým výsledkům z *in vitro* a *in vivo* studií, jsme se rozhodli zaměřit se detailněji na studium mutantního kmene *inFTS\_1680*. Další experimenty této práce se týkaly sledování intracelulárního osudu mutantního kmene *inFTS\_1680*, a to konkrétně jeho přítomnosti v pozdních endosomech primárních BMMs. Naše výsledky ukázaly, že *inFTS\_1680* mutant je schopen úniku z fagosomu, i když na nižší úrovni, než bylo pozorováno u divokého kmene FSC200 (Obr. 6). Je tedy pravděpodobné, že stěžejní role proteinu *FTS\_1680* spočívá v procesu replikace bakterie uvnitř cytosolu, odkud pak může dojít k rozšíření bakterií do okolních buněk. Mutantní kmen *inFTS\_1680* byl schopen pomnožit se uvnitř cytosolu, avšak ne v takovém množství, jaké bylo zaznamenáno při replikaci divokého kmene. Získané výsledky naznačují, že protein *FTS\_1680* je významný pro udržení, případně podporu vysoké úrovně bakteriální replikace uvnitř cytosolu. V tomto ohledu se *FTS\_1680* podobá faktorům virulence, které hrají specifickou roli v průběhu multiplikace mikroba v cytosolu, následně po úniku z fagosomu, stejně tak jako je tomu u Sel1-like proteinu DipA (33, 24). Publikovaná práce ukazuje, že *dipA* mutant není schopen proliferace uvnitř buňky, navzdory schopnosti uniknout z fagosomu, a rovněž projevuje zcela oslabený fenotyp v *in vivo* infekčních modelech (24). Naše výsledky dále ukázaly, že protein *FTS\_1680* se také podílí na vnitrobuněčné cytopatogenitě *F. tularensis* kmene FSC200 (Obr. 7). Získané výsledky se shodují s publikovanými pracemi (38, 113), které poukazují na spojitost mezi sníženou schopností bakteriálních kmenů indukovat plnou cytotoxicitu a pozorovaným replikačním defektem uvnitř cytosolu.

Dosažené výsledky z *in vivo* studií prokázaly, že *inFTS\_1680* mutantní kmen je schopen chránit myši kmene BALB/c před následnou infekcí plně virulentním mateřským kmenem FSC200 a to jak cestou subkutánní, tak intraperitoneální. K lepšímu pochopení *in vivo* oslabení a protektivního účinku *inFTS\_1680* mutantního kmene jsme se dále zabývali schopností tohoto mutantu přetrvávat a množit se uvnitř vybraných myších orgánů. Studovaný mutant byl schopen nízké replikace v játrech, slezině a plicích, v průběhu prvních dní po infekci. Nicméně počet životaschopných bakterií klesal v závislosti na čase (Obr. 8). Naproti tomu divoký a komplementovaný kmen vykazovaly v prvních dnech infekce vyšší hladiny replikace ve všech sledovaných orgánech s následným rozvojem infekce a úhynem infikovaných myší (Obr. 8). V několika případech bylo popsáno, že proliferace v jiných buněčných typech než v makrofázích je dostačující pro podporu bakteriální patogenese *F. tularensis* (111). Rychlá eliminace *inFTS\_1680* mutantního kmene z testovaných orgánů tak naznačuje, že tento kmen nemusí být schopen replikace v nefagocytujících buňkách, což také může přispívat k pozorovanému oslabení.

Zároveň naše výsledky ukázaly pomalý nárůst hladiny IFN- $\gamma$  u infekce BALB/c myší mateřským kmenem FSC200 a tím i neschopnost hostitelského organismu vyrovnat se s bakteriální infekcí. Oproti tomu, nárůst hladiny IFN- $\gamma$  v časně fázi infekce po podání *inFTS\_1680* mutantního kmene (maximální hladina identifikována 5 dní po infekci; Obr. 9) poukazuje na časnou protizánětlivou odpověď organismu představující významný faktor pro přežití myší kmene BALB/c. Hladina IFN- $\gamma$  zároveň koreluje s množstvím bakterií v organismu, čímž podporuje celkovou systémovou imunitní odpověď organismu a rozvoj protekce v případě infekce *inFTS\_1680* mutantem. Bylo prokázáno, že u myší deficientních v produkci IFN- $\gamma$  byly detekovány vyšší počty bakterií v orgánech ve srovnání s původním mateřským kmenem, a dále histopatologie a jaterní funkční testy prokázaly mírnější poškození jater (117).

Vedle T-buněčné odpovědi, představuje humorální odpověď reprezentovaná B-buňkami další významnou složku adaptivní imunitní odpovědi, která se vyskytuje jak po vakcinaci, tak v průběhu subletální infekce. Infekce myší *inFTS\_1680* mutantním kmenem vedla ke zvýšení hladin všech testovaných tříd imunoglobulinů v pozdní fázi infekce (21 dní po imunizaci), vyjma IgM (Obr. 10). Tyto výsledky podporují existenci Th1 buněčné odpovědi, závislé na IFN- $\gamma$ , u vakcinovaných myší. Bylo prokázáno, že schopnost opsonizace protilátkami specifickými proti tularémii usnadňuje odstranění patogenu z organismu, a to jak u lidí vakcinovaných kmenem LVS, tak u experimentálních zvířat infikovaných tímto nebo jinými kmeny bakterie *Francisella* (117). Avšak, přesná role jednotlivých isotypů protilátek, jejichž hladina je zvýšena po imunizaci *inFTS\_1680* mutantním kmenem, zůstává neobjasněna.

Naše výsledky ukázaly, že schopnost modelového myšního organismu přežít a vyrovnat se s infekcí mutantními bakteriemi kmene *inFTS\_1680* je dána efektivní imunitní odpovědí, která je zajišťována zvýšenou hladinou IFN- $\gamma$  v rané fázi infekce a dále pak zvýšenou hladinou specifických imunoglobulinů.

Následně jsme se zaměřili na identifikaci tularemických antigenů, které mohou být důležité při *in vivo* infekci mutantním kmenem *inFTS\_1680*. S využitím imunoproteomického přístupu jsme identifikovali 8 antigenů, které byly rozpoznávány oběma typy sér z imunizovaných myší (Tab. 4.) Na druhou stranu, odpověď imunizovaných myší na infekci virulentním kmenem FSC200 byla reflektována produkcí protilátek proti dalším 19-ti nově identifikovaným bakteriálním proteinům (Tab. 4.) Mezi identifikovanými antigeny by bylo dobré zdůraznit proteiny CapB, Pila, D-alanyl-D-alanin karboxypeptidasu, FTS\_0414, PdpE a IglE, které reprezentují potencionální nebo dobře známé faktory virulence (118-122).

Společnou vlastností TPR domén je schopnost tvorby multiproteinových komplexů a zprostředkování protein-proteinových interakcí. Díky těmto vlastnostem se TPR proteiny často uplatňují jako co-chaperony a to zejména v případě proteinů teplotního šoku (8). V naší práci bylo zjištěno, že mutantní kmen *inFTS\_1680* není schopen adaptace na teplotní stres. V této souvislosti jsme se rozhodli testovat vazebné interakce proteinu FTS\_1680 s několika typickými zástupci proteinů teplotního šoku, a to pomocí bakteriálního dvouhybridového systému BACTH. Avšak s použitím zvoleného systému jsme nebyli schopni identifikovat žádné vazebné interakce mezi proteinem FTS\_1680 a cílenými proteiny. BACTH systém je prezentován jako vhodný pro studium proteinových interakcí, ke kterým dochází mimo cytoplasmu. I přesto mohou být výsledky získané v této části práce falešně negativní a to především vlivem přechodných interakcí, které nemusí být v rámci systému detekovány. Další příčinou neúspěšné identifikace může být lokalizace proteinové interakce v periplasmatickém prostoru, který se ukázal jako problematický při testování jiných dvouhybridových bakteriálních systémů (123) a zároveň není jasné, zda nepředstavuje komplikaci také při analýze pomocí BACTH systému. V této části práce jsme se také snažili připravit nativní rekombinantní protein, který by mohl být využit k objasnění chaperonové funkce TPR proteinu FTS\_1680. Purifikace FTS\_1680 proteinu za nativních podmínek však nebyla doposud úspěšná.

Zajímavým zjištěním plynoucím z bioinformatických studií je vysoká homologie proteinu FTS\_1680 s *E. coli* proteinem YfgM, u kterého byla nedávno prokázána interakce s translokačním systémem SecYEG (90). Dle zmíněné publikace se může protein YfgM jako součást periplasmatické chaperonové sítě uplatňovat v odpovědi na stresové podmínky (90). Přímá interakce s proteiny SecA a SecE, však doposud nebyla pozorována, nicméně nelze ji ani vyloučit. Nutno poznamenat, že oba

tyto proteiny ovlivňují replikaci *F. tularensis* v hostitelských orgánech (39). Publikované výsledky tak korespondují s našimi *in vivo* pozorováními.

Za účelem detailnější studie proteinu FTS<sub>1680</sub> byla provedena charakterizace bakteriálního proteomu. Protein FTS<sub>1680</sub> je predikován jako membránový protein. Pro potvrzení této predikce bylo využito Triton X-114 fázové separace pro izolaci proteinů *F. tularensis* asociovaných s membránou. Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že FTS<sub>1680</sub> je skutečně membránový protein. Když vezmeme v potaz také predikci s využitím webového nástroje LipPred, lze spekulovat, že protein FTS<sub>1680</sub> může být modifikován acylovou skupinou, která může sloužit k ukotvení proteinu do membrány, což by mohlo umožnit proteinu FTS<sub>1680</sub> tvorbu membránově asociovaných proteinových komplexů. V tomto kontextu je zajímavá skutečnost, že další protein *Francisella* s TPR doménou, DipA protein, byl identifikován na povrchu SchuS4 kmene, kde tvoří membránově asociovaný komplex s vnějším membránovým proteinem FopA v průběhu růstu uvnitř makrofágů (124).

Nutno zmínit, že *trans* komplementací nativního genu se nepodařilo plně navrátit k původnímu fenotypu divokého kmene, a to v případě obou *in vitro* i *in vivo* experimentů. Náš přístup pro tvorbu inserčních mutantů využívající mobilní introny skupiny II vyvolává otázku potenciálních polárních efektů, které by mohly ovlivnit pozorovaný fenotyp. Nicméně, věříme, že v případě našich studií je tato možnost velmi nepravděpodobná.

V našich experimentech využíváme pro komplementaci plasmid, ve kterém je kódující sekvence klonována následně za GroES promotor (82). Neúplná komplementace může souviset s rozdílnou expresí genů zprostředkovanou nativním a groES promotorem, případně dalšími omezeními vyplývajícími z *trans* komplementací (122, 125). Nicméně, fenotyp divokého kmene byl téměř plně obnoven v *in vivo* experimentech a při posuzování tolerance k teplotnímu stresu. Kromě toho byly podniknuty další experimentální kroky, za účelem vyloučení potenciálních polárních efektů. Pomocí qRT-PCR nebyly prokázány žádné změny v expresi tzv. downstream genů *FTL\_1681*, *FTL\_1682*, a *FTL\_1683* v případě srovnání *inFTS\_1680* mutantního a původního mateřského kmene. Navíc mutagenese genů *FTL\_1681* a *FTL\_1682* neměla žádný vliv na proliferaci, virulenci a schopnost bakterie adaptovat se na teplotní stres. Výsledky těchto pozorování podporují závěrečné ustanovení, že geny následující za studovaným genem *FTS\_1680* (tzv. downstream geny), neovlivňují virulenci *F. tularensis*.

Závěrem lze říci, že tato práce zabývající se zapojením TPR-like proteinů v patogenesi *F. tularensis* identifikovala lokus *FTS\_1680* jako nový faktor virulence, který je nezbytný pro správnou intracelulární replikaci bakterie v hostitelské buňce, plnou expresi bakteriální

cytopatogenity, toleranci k teplotnímu stresu a *in vivo* virulenci. Dále byl protein kódovaný genem *FTS\_1680* identifikován jako protein asociovaný s membránou. Na základě získaných výsledků tedy protein *FTS\_1680*, spolu s proteiny PilF, *FTL\_205* a DipA reprezentuje další protein TPR-like rodiny, který je významný pro virulenci bakterie *Francisella*. Identifikace proteinových interakcí a objasnění funkce proteinu *FTS\_1680* by mohlo přispět k prohloubení znalostí a porozumění mechanismu vnitrobuněčného přežívání bakterie *F. tularensis*. Naše výsledky dále prokázaly, že *inFTS\_1680* mutantní kmen vyvolává Th1 buněčnou imunitní odpověď závislou na IFN- $\gamma$ , která je efektivní vůči následné infekci plně virulentním mateřským kmenem FSC200. Dále byly identifikovány nové imunoreaktivní antigeny mikroba *F. tularensis*, získané jak pro vakcinaci *inFTS\_1680* mutantním kmenem, tak i následnou infekci kmenem FSC200. Tyto proteiny tak přispívají k seznamu imunostimulačních bakteriálních proteinů vhodných pro tvorbu nové podjednotkové vakcíny.

## 7. ZÁVĚR

V disertační práci jsem se zabývala studiem TPR-like proteinů *F. tularensis*, které by mohly hrát roli v patogenesi tularemické infekce. Dosažené výsledky lze shrnout do následujících závěrů:

- Na základě bioinformatických studií byly identifikovány geny s predikovanou TPR doménou *FTS\_0201*, *FTS\_0778*, a *FTS\_1680*, pro které byly připraveny metodou inserční mutagenese TargeTron mutantní kmeny v modelovém organismu *F. tularensis* subsp. *tularensis* FSC200.
- Bylo zjištěno, že pouze mutantní kmen genu *FTS\_1680* projevuje oslabený fenotyp při replikaci a přežívání v myších makrofázích, stejně tak jako v myším modelu tularemické infekce.
- Protein *FTS\_1680* je významný pro množení bakterií v cytosolu hostitelských buněk a dále pro bakteriální cytopatogenitu uvnitř myších makrofágů.
- Protein *FTS\_1680* hraje významnou roli v adaptaci mikroba na teplotní stres.
- Mutantní kmen *inFTS\_1680* je schopen chránit myši kmene BALB/c před následnou subkutánní infekcí plně virulentním mateřským kmenem FSC200.
- Bakterie *inFTS\_1680* mutantního kmene jsou schopny distribuce a množení v myších orgánech, čímž umožňují vývoj protektivní imunitní odpovědi chránící před následnou infekcí plně virulentním mateřským kmenem FSC200.
- Imunizace myší mutantním kmenem *inFTS\_1680* vyvolává nadprodukcii cytokinu IFN- $\gamma$  spolu se zvýšenou hladinou imunoglobulinů třídy IgG1, IgG2a, IgG2b a IgA.
- Zapojením imunoproteomického přístupu byly nalezeny nové imunoreaktivní antigeny specifické pro virulentní kmen FSC200, které tak přispívají k seznamu proteinů vhodných pro tvorbu podjednotkové vakcíny.
- S využitím proteomického přístupu byl charakterizován *FTS\_1680* jako membránově vázaný protein.

---

## 8. LITERATURA

1. Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW. 2004. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2: 967-978.
2. Pallen MJ, Chaudhuri RR, Henderson IR. 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 6: 519-527.
3. Lamb JR, Tugendreich S, Hieter P. 1995. Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* 20: 257-259.
4. Broms JE, Edqvist PJ, Forsberg A, Francis MS. 2006. Tetratricopeptide repeats are essential for PcrH chaperone function in *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion. *FEMS Microbiol Lett* 256: 57-66.
5. Edqvist PJ, Broms JE, Betts HJ, Forsberg A, Pallen MJ, Francis MS. 2006. Tetratricopeptide repeats in the type III secretion chaperone, LcrH: their role in substrate binding and secretion. *Mol Microbiol* 59: 31-44.
6. Chakraborty S, Monfett M, Maier TM, Benach JL, Frank DW, Thanassi DG. 2008. Type IV pili in *Francisella tularensis*: roles of pilF and pilT in fiber assembly, host cell adherence, and virulence. *Infect Immun* 76: 2852-2861.
7. Chao J, Wong D, Zheng X, Poirier V, Bach H, Hmama Z, Av-Gay Y. 2010. Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1804: 620-627.
8. Cerveny L, Straskova A, Dankova V, Hartlova A, Ceckova M, Staud F, Stulik J. 2013. Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: role in virulence mechanisms. *Infect Immun* 81: 629-635.
9. Buttner CR, Sorg I, Cornelis GR, Heinz DW, Niemann HH. 2008. Structure of the *Yersinia enterocolitica* type III secretion translocator chaperone SycD. *J Mol Biol* 375: 997-1012.
10. McCoy GW, Chapin CW. 1911. Tuberculosis among Ground Squirrels (*Citellus Beecheyi*, Richardson). *J Med Res* 25: 189-198.
11. Forslund AL, Kuoppa K, Svensson K, Salomonsson E, Johansson A, Bystrom M, Oyston PC, Michell SL, Titball RW, Noppa L, Frithz-Lindsten E, Forsman M. 2006. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of *Francisella tularensis*. *Mol Microbiol* 59: 1818-1830.
12. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. 2002. Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 15: 631-646.
13. Saslaw S, Carhart S. 1961. Studies with tularemia vaccines in volunteers. III. Serologic aspects following intracutaneous or respiratory challenge in both vaccinated and nonvaccinated volunteers. *Am J Med Sci* 241: 689-699.
14. Ohara Y, Sato T, Fujita H, Ueno T, Homma M. 1991. Clinical manifestations of tularemia in Japan--analysis of 1,355 cases observed between 1924 and 1987. *Infection* 19: 14-17.
15. Steinemann TL, Sheikholeslami MR, Brown HH, Bradsher RW. 1999. Oculoglandular tularemia. *Arch Ophthalmol* 117: 132-133.
16. Stewart SJ. 1996. Tularemia: association with hunting and farming. *FEMS Immunol Med Microbiol* 13: 197-199.
17. Pechous RD, McCarthy TR, Zahrt TC. 2009. Working toward the future: insights into *Francisella tularensis* pathogenesis and vaccine development. *Microbiol Mol Biol Rev* 73: 684-711.
18. Krocova Z, Hartlova A, Souckova D, Zivna L, Kroca M, Rudolf E, Macela A, Stulik J. 2008. Interaction of B cells with intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Microb Pathog* 45: 79-85.
19. Fortier AH, Green SJ, Polsinelli T, Jones TR, Crawford RM, Leiby DA, Elkins KL, Meltzer MS, Nacy CA. 1994. Life and death of an intracellular pathogen: *Francisella tularensis* and the macrophage. *Immunol Ser* 60: 349-361.

20. Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. 2005. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun* 73: 5892-5902.
21. Duclos S, Desjardins M. 2000. Subversion of a young phagosome: the survival strategies of intracellular pathogens. *Cell Microbiol* 2: 365-377.
22. Kahn RA, Fu H, Roy CR. 2002. Cellular hijacking: a common strategy for microbial infection. *Trends Biochem Sci* 27: 308-314.
23. Lai XH, Golovliov I, Sjostedt A. 2001. *Francisella tularensis* induces cytopathogenicity and apoptosis in murine macrophages via a mechanism that requires intracellular bacterial multiplication. *Infect Immun* 69: 4691-4694.
24. Checroun C, Wehrly TD, Fischer ER, Hayes SF, 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.
25. Hrstka R, Krocova Z, Cerny J, Vojtesek B, Macela A, Stulik J. 2007. *Francisella tularensis* strain LVS resides in MHC II-positive autophagic vacuoles in macrophages. *Folia Microbiol (Praha)* 52: 631-636.
26. Golovliov I, Sandstrom G, Ericsson M, Sjostedt A, Tarnvik A. 1995. Cytokine expression in the liver during the early phase of murine tularemia. *Infect Immun* 63: 534-538.
27. Ismail N, Olano JP, Feng HM, Walker DH. 2002. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 207: 111-120.
28. Lin Y, Ritchea S, Logar A, Slight S, Messmer M, Rangel-Moreno J, Guglani L, Alcorn JF, Strawbridge H, Park SM, Onishi R, Nyugen N. 2009. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 31: 799-810.
29. Lindgren H, Shen H, Zingmark C, Golovliov I, Conlan W, Sjostedt A. 2007. Resistance of *Francisella tularensis* strains against reactive nitrogen and oxygen species with special reference to the role of KatG. *Infect Immun* 75: 1303-1309.
30. Bosio CM, Dow SW. 2005. *Francisella tularensis* induces aberrant activation of pulmonary dendritic cells. *J Immunol* 175: 6792-6801.
31. Conlan JW, Sjostedt A, North RJ. 1994. CD4+ and CD8+ T-cell-dependent and -independent host defense mechanisms can operate to control and resolve primary and secondary *Francisella tularensis* LVS infection in mice. *Infect Immun* 62: 5603-5607.
32. Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Cheung KK, Roberts MJ, Ludu JS, Letendre GW, Meierovics AI, Stephens G, Elkins KL. 2004. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J Bacteriol* 186: 6430-6436.
33. Meibom KL, Charbit A. 2010. The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. *Curr Opin Microbiol* 13: 11-17.
34. Raynaud C, Meibom KL, Lety MA, Dubail I, Candela T, Frapy E, Charbit A. 2007. Role of the *wbt* locus of *Francisella tularensis* in lipopolysaccharide O-antigen biogenesis and pathogenicity. *Infect Immun* 75: 536-541.
35. Sebastian S, Dillon ST, Lynch JG, Blalock LT, Balon E, Lee KT, Comstock LE, Conlan JW, Rubin EJ, Tzianabos AO, Kasper DL. 2007. A defined O-antigen polysaccharide mutant of *Francisella tularensis* live vaccine strain has attenuated virulence while retaining its protective capacity. *Infect Immun* 75: 2591-2602.
36. Thomas RM, Titball RW, Oyston PC, Griffin K, Waters E, Hitchen PG, Michell SL, Grice ID, Wilson JC, Prior JL. 2007. The immunologically distinct O antigens from *Francisella tularensis* subspecies *tularensis* and *Francisella novicida* are both virulence determinants and protective antigens. *Infect Immun* 75: 371-378.
37. Kraemer PS, Mitchell A, Pelletier MR, Gallagher LA, Wasnick M, Rohmer L, Brittnacher MJ, Manoil C, Skerrett SJ, Salama NR. 2009. Genome-wide screen in *Francisella novicida* for genes required for pulmonary and systemic infection in mice. *Infect Immun* 77: 232-244.

38. Maier TM, Casey MS, Becker RH, Dorsey CW, Glass EM, Maltsev N, Zahrt TC, Frank DW. 2007. Identification of *Francisella tularensis* Himar1-based transposon mutants defective for replication in macrophages. *Infect Immun* 75: 5376-5389.
39. Su J, Yang J, Zhao D, Kawula TH, Banas JA, Zhang JR. 2007. Genome-wide identification of *Francisella tularensis* virulence determinants. *Infect Immun* 75: 3089-3101.
40. Szymanski CM, Yao R, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. 1999. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 32: 1022-1030.
41. Wormald MR, Dwek RA. 1999. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure* 7: R155-160.
42. Karlyshev AV, Everest P, Linton D, Cawthraw S, Newell DG, Wren BW. 2004. The *Campylobacter jejuni* general glycosylation system is important for attachment to human epithelial cells and in the colonization of chicks. *Microbiology* 150: 1957-1964.
43. Egge-Jacobsen W, Salomonsson EN, Aas FE, Forslund AL, Winther-Larsen HC, Maier J, Macellaro A, Kuoppa K, Oyston PC, Titball RW, Thomas RM, Forsberg A. 2011. O-linked glycosylation of the PilA pilin protein of *Francisella tularensis*: identification of the endogenous protein-targeting oligosaccharyltransferase and characterization of the native oligosaccharide. *J Bacteriol* 193: 5487-5497.
44. Lewis VG, Ween MP, McDevitt CA. 2012. The role of ATP-binding cassette transporters in bacterial pathogenicity. *Protoplasma* 249: 919-942.
45. Thomas RM, Twine SM, Fulton KM, Tessier L, Kilmury SL, Ding W, Harmer N, Michell SL, Oyston PC, Titball RW, Prior JL. 2011. Glycosylation of DsbA in *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *J Bacteriol* 193: 5498-5509.
46. Hirano T, Kinoshita N, Morikawa K, Yanagida M. 1990. Snap helix with knob and hole: essential repeats in *S. pombe* nuclear protein nuc2+. *Cell* 60: 319-328.
47. Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, Hieter P. 1990. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 60: 307-317.
48. Lunelli M, Lokareddy RK, Zychlinsky A, Kolbe M. 2009. IpaB-IpgC interaction defines binding motif for type III secretion translocator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 9661-9666.
49. Job V, Mattei PJ, Lemaire D, Attree I, Dessen A. 2010. Structural basis of chaperone recognition of type III secretion system minor translocator proteins. *J Biol Chem* 285: 23224-23232.
50. Pallen MJ, Francis MS, Futterer K. 2003. Tetratricopeptide-like repeats in type-III-secretion chaperones and regulators. *FEMS Microbiol Lett* 223: 53-60.
51. Fullner KJ, Mekalanos JJ. 1999. Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 67: 1393-1404.
52. Luke NR, Howlett AJ, Shao J, Campagnari AA. 2004. Expression of type IV pili by *Moraxella catarrhalis* is essential for natural competence and is affected by iron limitation. *Infect Immun* 72: 6262-6270.
53. Mattick JS, Whitchurch CB, Alm RA. 1996. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* 179: 147-155.
54. Tonjum T, Koomey M. 1997. The pilus colonization factor of pathogenic neisserial species: organelle biogenesis and structure/function relationships--a review. *Gene* 192: 155-163.
55. Salomonsson EN, Forslund AL, Forsberg A. 2011. Type IV Pili in *Francisella* - A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen. *Front Microbiol* 2: 29.
56. Navarro L, Alto NM, Dixon JE. 2005. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* 8: 21-27.
57. Francis MS, Lloyd SA, Wolf-Watz H. 2001. The type III secretion chaperone LcrH co-operates with YopD to establish a negative, regulatory loop for control of Yop synthesis in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 42: 1075-1093.
58. Schroeder GN, Hilbi H. 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* 21: 134-156.

59. Barta ML, Zhang L, Picking WL, Geisbrecht BV. 2010. Evidence for alternative quaternary structure in a bacterial Type III secretion system chaperone. *BMC Struct Biol* 10: 21.
60. Koo J, Tammam S, Ku SY, Sampaleanu LM, Burrows LL, Howell PL. 2008. PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pilus secretin. *J Bacteriol* 190: 6961-6969.
61. Tiwari D, Singh RK, Goswami K, Verma SK, Prakash B, Nandicoori VK. 2009. Key residues in *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host. *J Biol Chem* 284: 27467-27479.
62. Hosogi Y, Duncan MJ. 2005. Gene expression in *Porphyromonas gingivalis* after contact with human epithelial cells. *Infect Immun* 73: 2327-2335.
63. Wu C. 1995. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 441-469.
64. De Maio A. 1999. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 11: 1-12.
65. Houry WA. 2001. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr Protein Pept Sci* 2: 227-244.
66. Young JC, Barral JM, Ulrich Hartl F. 2003. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci* 28: 541-547.
67. Acharya P, Kumar R, Tatu U. 2007. Chaperoning a cellular upheaval in malaria: heat shock proteins in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 153: 85-94.
68. Kohler S, Teyssier J, Cloeckert A, Rouot B, Liautard JP. 1996. Participation of the molecular chaperone DnaK in intracellular growth of *Brucella suis* within U937-derived phagocytes. *Mol Microbiol* 20: 701-712.
69. Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR, Ziprin R. 1998. Characterization of the thermal stress response of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 66: 3666-3672.
70. Takaya A, Tomoyasu T, Matsui H, Yamamoto T. 2004. The DnaK/DnaJ chaperone machinery of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is essential for invasion of epithelial cells and survival within macrophages, leading to systemic infection. *Infect Immun* 72: 1364-1373.
71. Nair S, Milohanic E, Berche P. 2000. ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 68: 7061-7068.
72. Pizarro-Cerda J, Cossart P. 2006. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *J Pathol* 208: 215-223.
73. Henderson B, Allan E, Coates AR. 2006. Stress wars: the direct role of host and bacterial molecular chaperones in bacterial infection. *Infect Immun* 74: 3693-3706.
74. Caplan AJ. 2003. What is a co-chaperone? *Cell Stress Chaperones* 8: 105-107.
75. Langer T, Lu C, Echols H, Flanagan J, Hayer MK, Hartl FU. 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-689.
76. Pearl LH, Prodromou C. 2001. Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv Protein Chem* 59: 157-186.
77. Freeman BC, Yamamoto KR. 2002. Disassembly of transcriptional regulatory complexes by molecular chaperones. *Science* 296: 2232-2235.
78. Johansson A, Berglund L, Eriksson U, Goransson I, Wollin R, Forsman M, Tarnvik A, Sjostedt A. 2000. Comparative analysis of PCR versus culture for diagnosis of ulceroglandular tularemia. *J Clin Microbiol* 38: 22-26.
79. Chamberlain RE. 1965. Evaluation of Live Tularemia Vaccine Prepared in a Chemically Defined Medium. *Appl Microbiol* 13: 232-235.
80. Karimova G, Dautin N, Ladant D. 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol* 187: 2233-2243.
81. Rodriguez SA, Davis G, Klose KE. 2009. Targeted gene disruption in *Francisella tularensis* by group II introns. *Methods* 49: 270-274.

82. Bonquist L, Lindgren H, Golovliov I, Guina T, Sjostedt 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.
83. Chong A, Wehrly TD, Nair V, Fischer ER, Barker JR, Klose KE, Celli J. 2008. The early phagosomal stage of *Francisella tularensis* determines optimal phagosomal escape and *Francisella* pathogenicity island protein expression. *Infect Immun* 76: 5488-5499.
84. Meibom KL, Dubail I, Dupuis M, Barel M, Lenco J, Stulik J, Golovliov I, Sjostedt A, Charbit A. 2008. The heat-shock protein ClpB of *Francisella tularensis* is involved in stress tolerance and is required for multiplication in target organs of infected mice. *Mol Microbiol* 67: 1384-1401.
85. Dieppedale J, Sobral D, Dupuis M, Dubail I, Klimentova J, Stulik J, Postic G, Frapy E, Meibom KL, Barel M, Charbit A. 2011. Identification of a putative chaperone involved in stress resistance and virulence in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 79: 1428-1439.
86. Broms JE, Lavander M, Sjostedt A. 2009. A conserved alpha-helix essential for a type VI secretion-like system of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol* 191: 2431-2446.
87. Balonova L, Hernychova L, Mann BF, Link M, Bilkova Z, Novotny MV, Stulik J. 2010. Multimethodological approach to identification of glycoproteins from the proteome of *Francisella tularensis*, an intracellular microorganism. *J Proteome Res* 9: 1995-2005.
88. Karpenahalli MR, Lupas AN, Soding J. 2007. TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8: 2.
89. Jiang M, Sullivan SM, Walker AK, Strahler JR, Andrews PC, Maddock JR. 2007. Identification of novel *Escherichia coli* ribosome-associated proteins using isobaric tags and multidimensional protein identification techniques. *J Bacteriol* 189: 3434-3444.
90. Gotzke H, Palombo I, Muheim C, Perrody E, Genevaux P, Kudva R, Muller M, Daley DO. 2014. YfgM is an Ancillary Subunit of the SecYEG Translocon in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*.
91. Qin A, Scott DW, Thompson JA, Mann BJ. 2009. Identification of an essential *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* virulence factor. *Infect Immun* 77: 152-161.
92. Stenmark S, Sunnemark D, Bucht A, Sjostedt A. 1999. Rapid local expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon after cutaneous *Francisella tularensis* infection in tularemia-immune mice. *Infect Immun* 67: 1789-1797.
93. Twine SM, Petit MD, Fulton KM, House RV, Conlan JW. 2010. Immunoproteomics analysis of the murine antibody response to vaccination with an improved *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS). *PLoS One* 5: e10000.
94. Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV. 2007. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 189: 561-574.
95. Pelletier N, Raoult D, La Scola B. 2009. Specific recognition of the major capsid protein of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus by sera of patients infected by *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett* 297: 117-123.
96. Janovska S, Pavkova I, Hubalek M, Lenco J, Macela A, Stulik J. 2007. Identification of immunoreactive antigens in membrane proteins enriched fraction from *Francisella tularensis* LVS. *Immunol Lett* 108: 151-159.
97. Janovska S, Pavkova I, Reichelova M, Hubaleka M, Stulik J, Macela A. 2007. Proteomic analysis of antibody response in a case of laboratory-acquired infection with *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Folia Microbiol (Praha)* 52: 194-198.
98. Eyles JE, Unal B, Hartley MG, Newstead SL, Flick-Smith H, Prior JL, Oyston PC, Randall A, Mu Y, Hirst S, Molina DM, Davies DH. 2007. Immunodominant *Francisella tularensis* antigens identified using proteome microarray. *Proteomics* 7: 2172-2183.
99. Sundaresh S, Randall A, Unal B, Petersen JM, Belisle JT, Hartley MG, Duffield M, Titball RW, Davies DH, Felgner PL, Baldi P. 2007. From protein microarrays to diagnostic antigen discovery: a study of the pathogen *Francisella tularensis*. *Bioinformatics* 23: i508-518.
100. Havlasova J, Hernychova L, Halada P, Pellantova V, Krejsek J, Stulik J, Macela A, Jungblut PR, Larsson P, Forsman M. 2002. Mapping of immunoreactive antigens of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Proteomics* 2: 857-867.

101. Havlasova J, Hernychova L, Brychta M, Hubalek M, Lenco J, Larsson P, Lundqvist M, Forsman M, Krocova Z, Stulik J, Macela A. 2005. Proteomic analysis of anti-Francisella tularensis LVS antibody response in murine model of tularemia. *Proteomics* 5: 2090-2103.
102. Twine SM, Mykytczuk NC, Petit MD, Shen H, Sjostedt A, Wayne Conlan J, Kelly JF. 2006. In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, Francisella tularensis, isolated from mouse spleen. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 1621-1633.
103. Twine SM, Petit MD, Shen H, Mykytczuk NC, Kelly JF, Conlan JW. 2006. Immunoproteomic analysis of the murine antibody response to successful and failed immunization with live anti-Francisella vaccines. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 999-1008.
104. Golovliov I, Twine SM, Shen H, Sjostedt A, Conlan W. 2013. A DeltaclpB mutant of Francisella tularensis subspecies holarctica strain, FSC200, is a more effective live vaccine than F. tularensis LVS in a mouse respiratory challenge model of tularemia. *PLoS One* 8: e78671.
105. Fulton KM, Zhao X, Petit MD, Kilmury SL, Wolfrim LA, House RV, Sjostedt A, Twine SM. 2011. Immunoproteomic analysis of the human antibody response to natural tularemia infection with Type A or Type B strains or LVS vaccination. *Int J Med Microbiol* 301: 591-601.
106. Chambers JR, Bender KS. 2011. The RNA chaperone Hfq is important for growth and stress tolerance in Francisella novicida. *PLoS One* 6: e19797.
107. Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, Sjostedt A. 2009. The 58-kilodalton major virulence factor of Francisella tularensis is required for efficient utilization of iron. *Infect Immun* 77: 4429-4436.
108. Taylor PD, Toseland CP, Attwood TK, Flower DR. 2006. LIPPRED: A web server for accurate prediction of lipoprotein signal sequences and cleavage sites. *Bioinformatics* 1: 176-179.
109. Bordier C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J Biol Chem* 256: 1604-1607.
110. Mittl PR, Schneider-Brachert W. 2007. Sel1-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal* 19: 20-31.
111. Horzempa J, O'Dee DM, Shanks RM, Nau GJ. 2010. Francisella tularensis DeltapyrF mutants show that replication in nonmacrophages is sufficient for pathogenesis in vivo. *Infect Immun* 78: 2607-2619.
112. Meibom KL, Forslund AL, Kuoppa K, Alkhuder K, Dubail I, Dupuis M, Forsberg A, Charbit A. 2009. Hfq, a novel pleiotropic regulator of virulence-associated genes in Francisella tularensis. *Infect Immun* 77: 1866-1880.
113. Pechous R, Celli J, Penoske R, Hayes SF, Frank DW, Zahrt TC. 2006. Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a Francisella tularensis live vaccine strain. *Infect Immun* 74: 4452-4461.
114. Cowley SC, Hamilton E, Frelinger JA, Su J, Forman J, Elkins KL. 2005. CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. *J Exp Med* 202: 309-319.
115. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 75: 163-189.
116. Chen W, KuoLee R, Shen H, Conlan JW. 2004. Susceptibility of immunodeficient mice to aerosol and systemic infection with virulent strains of Francisella tularensis. *Microb Pathog* 36: 311-318.
117. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. 2007. Innate and adaptive immunity to Francisella. *Ann N Y Acad Sci* 1105: 284-324.
118. Su J, Asare R, Yang J, Nair MK, Mazurkiewicz JE, Abu-Kwaik Y, Zhang JR. 2011. The capBCA Locus is Required for Intracellular Growth of Francisella tularensis LVS. *Front Microbiol* 2: 83.
119. Forslund AL, Salomonsson EN, Golovliov I, Kuoppa K, Michell S, Titball R, Oyston P, Noppa L, Sjostedt A, Forsberg A. 2010. The type IV pilin, PilA, is required for full virulence of Francisella tularensis subspecies tularensis. *BMC Microbiol* 10: 227.
120. Asare R, Abu Kwaik Y. 2010. Molecular complexity orchestrates modulation of phagosome biogenesis and escape to the cytosol of macrophages by Francisella tularensis. *Environ Microbiol* 12: 2559-2586.

121. Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM. 2007. In vivo negative selection screen identifies genes required for *Francisella* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6037-6042.
122. Robertson GT, Child R, Ingle C, Celli J, Norgard MV. 2013. IgE is an outer membrane-associated lipoprotein essential for intracellular survival and murine virulence of type A *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 81: 4026-4040.
123. Karimova G, Ladant D, Ullmann A. 2002. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int J Med Microbiol* 292: 17-25.
124. Chong A, Child R, Wehrly TD, Rockx-Brouwer D, Qin A, Mann BJ, Celli J. 2013. Structure-Function Analysis of DipA, a Virulence Factor Required for Intracellular Replication. *PLoS One* 8: e67965.
125. Brotcke A, Weiss DS, Kim CC, Chain P, Malfatti S, Garcia E, Monack DM. 2006. Identification of MglA-regulated genes reveals novel virulence factors in *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 74: 6642-6655.

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1. Publikace vztahující se k tématu disertační práci

#### Publikace I

Cervený L., Strasková A., Danková V., Hartlová A., Cecková M., Staud F., Stulík J.

Tetratricopeptide repeat motifs in the world of bacterial pathogens: Role in virulence mechanisms.

**Infection and Immunity, 2013; 81: 629-35.**

#### Publikace II

Danková V., Balonová L., Strasková A., Spidlová P., Putzová D., Kijek T., Bozue J., Cote Ch., Mou S., Worsham P., Szotaková B., Cervený L., Stulík J.

Characterization of TPR-like proteins in *Francisella tularensis*; identification of a novel locus required for virulence.

**Infection and Immunity, 2014 Sep 22; Epub ahead of print**

## Publikace I

## Publikace II

## 9.2. Ostatní publikace v recenzovaných časopisech

### Publikace I

**Straskova A., Cerveny L., Spidlova P., Dankova V., Belcic D., Santic M., Stulik J.**

Deletion of IglH in virulent *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 strain results in attenuation and provides protection against the challenge with the parental strain.

**Microbes and Infection, 2012; 14:177-87**

### Publikace II

**Fabrik I., Link M., Härtlova A., Dankova V., Rehulka P., Stulik J.**

Application of SILAC labeling to primary bone marrow-derived dendritic cells reveals extensive GM-CSF-dependent arginine metabolism.

**Journal of Proteome Research , 2014;13:752-62**