

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Studium interakce HU proteinu *Francisella tularensis* s hostitelskou buňkou

Bc. Veronika Hofmannová

Diplomová práce

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Study of the interaction of *Francisella tularensis* HU protein with a host cell

Bc. Veronika Hofmannová

Thesis

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická,
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Hofmannová**
Osobní číslo: **C18487**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Studium interakce HU proteinu *Francisella tularensis* s hostitel-
skou buňkou**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Studentka se seznámí s dostupnou literaturou týkající se bakterie *F. tularensis* a problematiky HU proteinu u *F. tularensis* a jiných bakterií. Ze získaných informací sepiše literární rešerši cca 20 normovaných stran včetně obrázků. Při vyhledávání literárních údajů studentka využije dostupných databází, hlavně NCBI a PubMed.

Experimentální část:

Příprava značeného proteinu pro studium lokalizace v hostitelské buňce (PCR, restriční štěpení, ligace, transformace bakterií – chemická transformace a elektroporace). Kultivace bakterií *E. coli* a *F. tularensis*. Kultivace a infekce hostitelských buněk. SDS-PAGE a western blot (protilátková detekce značeného proteinu). Mikroskopické techniky.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **prof. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **RNDr. Petra Špidlová, Ph.D.**
Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

PROHLAŠUJI:

Tuto práci jsem vypracoval/vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil/využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl/byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 7. května 2020

Podpis autora
Bc. Veronika Hofmannová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu Katedry biologických a biochemických věd - prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D., za možnost spolupráce při tvorbě diplomové práce s Katedrou molekulární patologie a biologie UO v Hradci Králové. Dále bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce – prof. RNDr. Zuzaně Bílkové, Ph.D., za její cenné rady a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Taktéž mé velké poděkování patří odbornému konzultantovi diplomové práce - RNDr. Petře Špidlové, Ph.D., za její vstřícnost, ochotu, pomoc při získávání potřebných informací či podkladů a za čas, který mi věnovala. V neposlední řadě bych zde ráda poděkovala všem pracovníkům z Katedry molekulární patologie a biologie UO v Hradci Králové, včetně PharmDr. Ivony Pávkové, Ph.D., za jejich cenné informace a podněty pro výzkumnou část této práce, zejména s problematikou fluorescenční mikroskopie.

ANOTACE

Tato práce je součástí projektu, který má za úkol zjistit, zda DNA vazebný protein HU bakterie *Francisella tularensis* interaguje s hostitelskou buňkou a pokud ano, jakým způsobem by ji HU protein mohl ovlivňovat.

V jednotlivých kapitolách této práce je vypracována problematika týkající se bakterie *F. tularensis* a jejího zařazení do taxomické nomenklatury, jsou vypsány prozatím známé faktory virulence a stručně shrnuty informace o bakteriálním genomu, ostrovu patogenity podílejícím se na virulenci a HU proteinu. Jelikož se *F. tularensis* řadí mezi intracelulární bakterie, je dopodrobna rozepsán proces interakce s různými typy buněk - ať nefagocytujícími nebo buňkami patřícími do monocyto-makrofágového systému. V dalších kapitolách je popsána laboratorní diagnostika *F. tularensis* a tularémie i jejích klinických projevů. Poslední kapitola je věnována v dnešní době hojně zkoumané problematice *F. tularensis* jako nástroje možného bioteroristického zneužití.

Experimentální část obsahuje tyto dílčí kroky: Kultivace bakterií *E. coli* TOP10 a XL-1 Blue a *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Příprava konstruktů značeného proteinu pomocí různých typů značek (GFP, histidinové (HIS) a HA kotvy) pomocí metod molekulární biologie (tzv. „overlap“ PCR, PCR, restriční štěpení, chemická transformace a elektroporace). Značený HU protein jsme prokazovaly pomocí SDS-PAGE a Western-blottingu. Studiu lokalizace proteinu v hostitelské buňce pomocí techniky fluorescenční mikroskopie předcházela izolace, kultivace a infekce myších kostně-dřeňových makrofágů (BMMs).

KLÍČOVÁ SLOVA

F. tularensis, HU protein, tularémie, PCR s překrývajícími se konci, Western-blotting, fluorescenční mikroskopie.

ANNOTATION

This thesis is part of a project that aims to determine if *Francisella tularensis* DNA binding protein HU interacts with the host cell, and if so, how the HU protein might affect it.

In theoretical part of the thesis the issue concerning the bacterium *F. tularensis* and its inclusion in the taxonomic nomenclature is elaborated, known virulence factors are described, and information about the bacterial genome, the pathogenicity island, which is involved in *Francisella* virulence, and HU protein are briefly summarized. Because of *F. tularensis* is intracellular bacterium its pathogenesis is described in detail, including the necessary interactions with various cell types – non-phagocytic or cells belonging to the monocyte-macrophage system. In the other chapters the laboratory diagnostics of *F. tularensis* and tularemia with its clinical manifestations are described. The last chapter is dedicated nowadays in detail studied problematics of *F. tularensis* misuse as a bioterroristic tool.

The experimental part contains these partial steps: Cultivation of *E. coli* TOP10 or XL-1 Blue and *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200. Preparation of fusion protein constructs using various types of epitope labels (GFP, HIS, HA tags) by using molecular biology methods (overlap PCR, PCR, restriction digestion, chemical transformation and electroporation). Labeled protein was detected by using SDS-PAGE and immunodetection. Protein localization studies by using fluorescence microscopy within the host cells were preceded by the isolation, culture and infection of mouse bone marrow derived macrophages (BMMs).

KEYWORDS

F. tularensis, HU protein, tularemia, overlap PCR, Western-blotting, fluorescence microscopy.

SEZNAM GRAFŮ

Graf č. 1 Kalibrační řada, metoda BCA.	101
---	-----

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Dokumentace růstu kolonií <i>F. tularensis</i> na různých typech médií: (A) pufovaný extrakt z kvasného uhlí; (B) čokoládový agar; (C) ovčí krevní agar; (D) cysteinový krevní agar [10; 17].	21
Obr. 2 - Schematické znázornění FPI u kmenů <i>F. tularensis</i> SchuS4, LVS a <i>F. novicida</i> U112 [31].	26
Obr. 3 - Siderofory zprostředkované získávání železa u <i>F. tularensis</i> [35].	27
Obr. 4 - Obecné schéma elektroporace [38].	29
Obr. 5 - Krystalografická struktura HU proteinu [42].	30
Obr. 6 - Jednotlivé kroky vzniku fagolyzozomu [47].	33
Obr. 7 - Model intracelulárního životního cyklu <i>F. tularensis</i> [48].	35
Obr. 8 - Endemické oblasti výskytu <i>F. tularensis</i> (šedě) [66].	41
Obr. 9 - Vznik "AD" fragmentu po „overlap“ PCR (vlastní zdroj).	64
Obr. 10 - Znázornění štěpení DNA pomocí libovolné restriční endonukleázy [92].	66
Obr. 11 - Příkladné znázornění restričního štěpení restričními enzymy [92].	67
Obr. 12 - Mapa plazmidu pCR®_4.0_TOPO [94].	71
Obr. 13 - Mapa plazmidu pKK_289_Km_GFP [91].	73
Obr. 14 - Transmisní fluorescenční mikroskop [99].	86
Obr. 15 - Agarózová elektroforéza po amplifikaci úseku AB.	94
Obr. 16 - Agarózová elektroforéza po amplifikaci úseku CD.	95
Obr. 17 - Amplifikace AD fragmentu pomocí „overlap“ PCR.	96
Obr. 18 - Ověření přítomnosti fragmentu AD v koloniích bakterie <i>E. coli</i> TOP10 transformovaných vektorem AD_pCR®_4.0_TOPO.	97
Obr. 19 - Kontrolní restriční štěpení enzymy <i>AseI</i> a <i>SacI</i> .	97
Obr. 20 - Elektroforéza vektorového plazmidu pKK_289_Km po restrikci enzymy <i>SacI</i> a <i>NdeI</i> .	98
Obr. 21 - PCR na koloniích <i>E. coli</i> XL-1 Blue, plazmid AD_pKK_289_Km. Standard O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.	99
Obr. 22 - PCR na koloniích <i>F. tularensis</i> FSC200, plazmid AD_pKK_289_Km. Standard O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.	100
Obr. 23 - Western-blotting HU_NLS_GFP (velikost cca 30 kDa).	103
Obr. 24 - Zeleně fluoreskující HU_NLS_GFP.	104
Obr. 25 - PCR na koloniích <i>E. coli</i> TOP 10/HU_NLS_HA_TOPO.	105

Obr. 26 - Restrikční štěpení plazmidu HU_NLS_HA_TOPO enzymy <i>AseI</i> a <i>SacI</i> (A) s kontrolní PCR reakcí (B).....	106
Obr. 27 - Elektroforéza vektorového plazmidu pKK_289_Km po restrikci enzymy <i>SacI</i> a <i>NdeI</i>	106
Obr. 28 - PCR na koloniích <i>E. coli</i> XL-1 Blue/HU_NLS_HA_pKK_289_Km.....	107
Obr. 29 - PCR na koloniích <i>F. tularensis</i> FSC200/HU_NLS_HA.....	108
Obr. 30 - PCR na koloniích <i>E. coli</i> / HU_NLS_HIS_TOPO.....	109
Obr. 31 - Kontrolní restrikce plazmidu HU_NLS_HIS_TOPO (A) a PCR (B).	110
Obr. 32 - Kontrolní elektroforéza po restrikci plazmidu HU_NLS_HIS_TOPO.	111
Obr. 33 - PCR na koloniích <i>E. coli</i> XL-1 Blue/HU_NLS_HIS_pKK_289_Km.	111
Obr. 34 - PCR na koloniích <i>F. tularensis</i> FSC200/HU_NLS_HIS.....	112
Obr. 35 - Protilátková analýza HU_HA, standard Precision Plus Protein TM .Kaleidoscope TM	113
Obr. 36 - Fluoreskující HU_HA protein uvnitř makrofágů.....	114

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 - Použitá antibiotika při experimentech.	48
Tab. č. 2 - Komponenty reakce pro PCR reakci katalyzované <i>Taq</i> DNA polymerázou.	63
Tab. č. 3 - Podmínky reakce pro PCR reakci katalyzované <i>One Taq Quick-Load</i> DNA polymerázou.	63
Tab. č. 4 - Složení PCR reakce za využití <i>PfuUltra II High Fidelity</i> DNA polymerase pro amplifikaci AB a CD fragmentů.	65
Tab. č. 5 - Podmínky reakce pro PCR reakci katalyzované <i>PfuUltra II High Fidelity</i> DNA polymerázy.	65
Tab. č. 6 - Restrikční štěpení plazmidu pCR [®] _4.0_TOPO nesoucí fragment AD se dvěma restrikčními enzymy <i>SacI</i> a <i>AseI</i>	68
Tab. č. 7 - Restrikční štěpení plazmidu pKK_289_Km_GFP restrikčními enzymy <i>NdeI</i> a <i>SacI</i>	68
Tab. č. 8 - Příklad složení ligační směsi.	72
Tab. č. 9 - Příprava kalibrační řady pro metodu BCA.	77
Tab. č. 10 - Složení 15% separačního PAA gelu (1 gel = 4,9 ml roztoku).	80
Tab. č. 11 - Složení 4% zaostřovacího gelu.	80
Tab. č. 12 - Složení separačního PAA gelu (1 gel = 4,9 ml roztoku).	81
Tab. č. 13 - Složení zaostřovacího gelu.	82
Tab. č. 14 - Koncentrace izolované chromozomální DNA <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC 200.	93
Tab. č. 15 - Velikosti jednotlivých fragmentů AB a CD.	94
Tab. č. 16 - Koncentrace fragmentů AB a CD a celková velikost úseku AD pro overlap PCR.	95
Tab. č. 17 - Komponenty pro ligační směs v poměru 3:1.	99
Tab. č. 18 - Změřená absorbance u kalibrační řady, metoda BCA.	101
Tab. č. 19 - Naměřená absorbance a koncentrace u jednotlivých proteinových frakcí.	102
Tab. č. 20 - Vypočtené množství jednotlivých vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu.	103

SEZNAM ZKRATEK

APC	antigen prezentující buňka (z angl. Antigen Presenting Cells)
ATP	adenosin trifosfát
BMMs	myší kostně-dřeňové makrofágy (z angl. Bone Marrow derived Macrophages)
BSL-2	stupeň biologického rizika kategorie 2 (z angl. BioSafety Level-2)
CDS	Centrum pro kontrolu nemocí (z angl. Center for Disease Control)
CFU	jednotky tvořící kolonie (z angl. Colony Forming Unit)
dsDNA	dvouvláknová DNA (z angl. double-stranded DNA)
ELISA	enzymová imunoanalýza (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FCP	fagozomy obsahující <i>F. tularensis</i> (z angl. <i>Francisella</i> -Containing Phagosome)
FCV	vakuoly obsahující <i>F. tularensis</i> (z angl. <i>Francisella</i> -containing vacuoles)
FIS	faktor pro inverzní stimulaci (z angl. Factor for Inversion Stimulation)
FPI	ostrov patogenity <i>F. tularensis</i> (z angl. <i>Francisella</i> Pathogenicity Island)
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. Green Fluorescent Protein)
GMO	geneticky modifikovaný organismus
HMG	skupina s vysokou mobilitou (z angl. High Mobility Group)
H-NS	histonům podobný strukturní protein nukleotidu (z angl. Histone-like Nucleoid Structuring)
IHF	faktor integrace hostitele (z angl. Integration Host Factor)
IL	interleukin
INF	interferon
LAMP-1,2	lysosomálně asociovaný membránový protein 1,2 (z angl. Lysosomal - Associated Membrane Protein 1,2)
LPS	lipopolysacharid

LVS	živý vakcinační kmen <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (z angl. Live Vaccine Strain)
MHC II.	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
NAPs	nukleoid asociované proteiny (z angl. Nucleoid-Associated Proteins)
NF- κ B	antiapoptotický nukleární transkripční faktor kappa B
NMR	nukleární magnetická rezonance (z angl. Nuclear Magnetic Resonance)
ORF	otevřený čtecí rámeček (z angl. Open Reading Frame)
PAMPs	molekulární struktury na povrchu buněk patogenních mikroorganismů (z angl. Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. Polymerase Chain Reaction)
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. Reactive Oxygen Species)
TFP	pilus typu IV (z angl. Type Four Pili)
Th	pomocné T-lymfocyty (z angl. T-helper)
TLR	Toll-like receptory (z angl. Toll-Like Receptors)
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. World Health Organization)

OBSAH

ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	19
1.1 Úvod do problematiky	19
1.2 Základní charakteristika <i>F. tularensis</i> a její zařazení dle taxonomické nomenklatury.	19
1.3 Biologický profil a faktory virulence.....	22
1.3.1 <i>F. tularensis</i> a její genom.....	23
1.3.2 Ostrov patogenity	24
1.3.3 Genetické nástroje pro manipulaci s genomem <i>F. tularensis</i>	28
1.3.4 HU protein.....	29
1.4 Molekulární mechanismy patogeneze <i>F. tularensis</i>	31
1.4.1 Receptorem zprostředkovaná endocytóza.....	32
1.4.2 Vstup <i>F. tularensis</i> do fagocytujících buněk	33
1.4.3 Intracelulární životní cyklus <i>F. tularensis</i>	34
1.4.4 Regulace imunitní odpovědi prostřednictvím interferonů	35
1.4.5 Modifikace buněčné smrti hostitelské buňky.....	36
1.4.6 Vrozená imunita	37
1.4.7 Získaná imunita	38
1.5 Laboratorní diagnostika <i>F. tularensis</i> a průkaz tularémie	39
1.6 Tularémie - epidemiologie	40
1.6.1 Klinické formy nákazy.....	41
1.6.2 Léčba tularémie	43
1.6.3 Vakcinační terapie	43
1.6.4 <i>F. tularensis</i> jako nástroj pro bioteroristické zneužití	45
2 CÍL PRÁCE.....	46
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
3.1 Použitý materiál.....	47

3.2	Aplikované metody	58
3.2.1	Kultivace bakterií <i>F. tularensis</i> a <i>E. coli</i>	58
3.2.2	Příprava zásobních zmražených kultur („štoků“) <i>E. coli</i> a <i>F. tularensis</i> ...	59
3.2.3	Izolace chromozomální DNA.....	59
3.2.4	Izolace plazmidové DNA.....	60
3.2.5	Stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA	61
3.2.6	Polymerase Chain Reaction (PCR; Polymerázová řetězová reakce).....	61
3.2.7	Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz	66
3.2.8	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu.....	69
3.2.9	Klonování s využitím TOPO [®] TA Cloning [®] Kitu.....	70
3.2.10	Ligace vektoru a inzertu.....	72
3.2.11	Transformace <i>E. coli</i>	73
3.2.12	Elektroporace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200	74
3.2.13	Příprava elektrokompetentních buněk <i>F. tularensis</i> FSC200	75
3.2.14	Příprava celobuněčného lyzátu (WCL), cytoplasmatické a membránové frakce po kultivaci <i>F. tularensis</i>	75
3.2.15	Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA.....	76
3.2.16	Purifikace fúzních proteinů HU_NLS_HA a HU_NLS_HIS	77
3.2.17	SDS – PAGE gelová elektroforéza proteinů	78
3.2.18	Western-blotting	82
3.2.19	Vizualizace proteinů v gelu a jejich imunodetekce	83
3.2.20	Fluorescenční mikroskopie – zviditelnění HU_HA, HU_NLS_HA, HU_NLS_GFP, HU_NLS_HIS.....	85
3.2.21	Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů	89
3.2.22	Infekce myších kostně-dřeňových makrofágů bakterií <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	90
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	92
4.1	<i>In silico</i> analýza	92

4.2	Izolace chromozomální DNA	93
4.3	PCR s překrývajícími se konci	93
4.4	TOPO klonování	96
4.5	Příprava vektoru AD_pKK_289_Km_GFP a transformace bakterií <i>E. coli</i> XL-1 Blue	98
4.6	Elektroporace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200	100
4.7	Kultivace a frakcionace <i>F. tularensis</i> nesoucí fúzní protein	100
4.8	SDS-PAGE proteinů	102
4.9	Protilátková analýza HU_NLS_GFP	103
4.9.1	Průkaz HU_NLS_GFP pomocí fluorescenční mikroskopie	104
4.10	Příprava <i>F. tularensis</i> exprimující HU_NLS_HA	104
4.10.1	PCR na koloniích <i>E. coli</i> TOP10	105
4.10.2	Příprava vektoru HU_NLS_HA_pKK_289_Km a transformace bakterií <i>E. coli</i> XL-1 Blue	106
4.10.3	Elektroporace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200	107
4.10.4	SDS-PAGE a protilátková analýza HU_NLS_HA	108
4.11	Příprava <i>F. tularensis</i> exprimující HU_NLS_HIS	109
4.11.1	PCR na koloniích <i>E. coli</i> TOP10	109
4.11.2	Příprava vektoru HU_NLS_HA_pKK_289_Km a transformace bakterií <i>E. coli</i> XL-1 Blue	110
4.11.3	Elektroporace <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FSC200	112
4.11.4	SDS-PAGE a protilátková analýza HU_NLS_HIS	112
5	ZÁVĚR	115
6	POUŽITÁ LITERATURA	116

ÚVOD

Tato práce je součástí projektu, jehož úkolem je potvrdit hypotézu o sekreci HU proteinu bakterie *Francisella tularensis*, jenž patří mezi tzv. DNA vazebné proteiny, a případné zkoumání interakce tohoto proteinu s hostitelskou buňkou.

F. tularensis, jakožto profesionální intracelulární bakterie, vstupuje prostřednictvím buněčných mechanismů do hostitelské buňky. Po vstupu do makrofágu se *F. tularensis* nachází ve fagozomu. Nejdříve vznikají rané a poté pozdější fagozomy obsahující *F. tularensis* (FCP z angl. *Francisella*-Containing Phagosome). Díky svým antimikrobiálním faktorům reprogramuje fagozomální maturaci, z pozdějšího fagozomu uniká a množí se v cytosolu, kde dojde k interakci se složkami imunitního systému. Faktor, napomáhající *F. tularensis* vyvážnout z fagozomu není prozatím popsán. Důležitou roli ve vstupu a intracelulární replikaci hraje sekreční systém typu VI, jenž je kódován tzv. ostrovem patogenity *F. tularensis* (FPI z angl. *Francisella* Pathogenicity Island). Buňky napadené touto bakterií jsou odsouzeny k buněčné smrti [1; 2].

Na molekulární úrovni byly prozatím u *F. tularensis* identifikovány jakožto faktory virulence lipopolysacharidy, kapsula a virulenční proteiny kódované právě FPI. Ke schopnosti bakterie vyvolat infekci ale nepřispívají jen proteiny kódované ostrovem patogenity. Poměrně nově objeveným faktorem virulence řadícím se mezi nukleoid asociované proteiny (NAPs z angl. Nucleoid-Associated Proteins), je tzv. HU protein. Bylo prokázáno, že exprese tohoto proteinu je důležitá pro virulenci *F. tularensis*, ale mimo jiné brání tuto bakterii i proti oxidačnímu stresu. Důležitou roli hraje HU protein i u ostatních druhů bakterií, např. u enterobakterií, konkrétně u *Escherichia coli* přispívá k iniciaci replikace DNA a k buněčnému dělení [3].

F. tularensis způsobuje infekční onemocnění - tularémii, jejímž prvotním hostitelem jsou zvířata, ale může docházet i k infekci člověka. S dnes prakticky neomezenými možnostmi migrace, byla tato bakterie zařazena mezi potenciální biologické zbraně, jelikož je extrémně virulentní a k propuknutí infekce postačí vdechnutí pouze 10 bakteriálních kolonií (CFU z angl. Colony Forming Unit) subtypu *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Ochranu před adaptivní imunitou si *F. tularensis* zajišťuje sekrecí různých faktorů z buňky. Pokud se tedy infekce rozšíří do ostatních tkání, dochází k selhání organismu a k smrti jedince, a pakliže se včas nezahájí léčba aminoglykosidovými antibiotiky, dosahuje mortalita až 30 % [2; 4].

K budoucím podrobnějším výzkumům jsou nezbytné metody molekulární biologie a proteomiky. Ať už by se jednalo o podrobnější studie týkající se celkové virulence bakterie, či jejího vniknutí a následného množení v buňce. Míra urgencye je kladena i na vytvoření případné účinné vakcíny nebo jiných alternativních léčebných metod.

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře molekulární patologie a biologie FVZ UO Hradec Králové. Pro účely diplomové práce byly využity kmeny *E. coli* TOP10 a XL-1 Blue a klinický izolát *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 získaný po epidemii ve Švédsku v roce 1998. V průběhu práce byly připraveny kmeny odvozené od *F. tularensis* FSC200, exprimující varianty fúzního značeného proteinu. Dalším bodem práce byla izolace kostně-dřeňových buněk a jejich diferenciaci v primární myši kostně-dřeňové makrofágy (BMMs z angl. Bone Marrow Derived Macrophages) z jednotného klonu myši BALB/c. Následovala frakcionace bakteriálních buněk, SDS-PAGE a protilátková analýza značeného proteinu pomocí metody Western-blotting. Doplnující mikroskopickou technikou - fluorescenční mikroskopií, byl lokalizován značený protein v samotné bakterii či v infikovaných myších makrofázích.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Úvod do problematiky

První izolace této bakterie, malého pleiomorfního Gram negativního kokobacila, se datuje roku 1912 v Tulare v Kalifornii, kde propuklo onemocnění malých hlodavců - tularémie. Tuto izolaci provedli MacCoy a Chapin. Vzhledem k tomu, že onemocnění propuklo v Tulare, bylo nejjednodušší pojmenovat izolované infekční agens *Bacterium tularense*. Název bakterie *Francisella tularensis* přišel až o několik let později [5; 6]. Klinickými projevy tohoto onemocnění u lidí se začal podrobněji zabývat Edvard Francis. Prováděl sérologické testy z krve nakažených a izoloval infekční agens. Na jeho počest byla bakterie za několik let pojmenována *Francisella tularensis* [6]. V roce 1920, byla tato bakterie nazvána jako „záhadná intracelulární bakterie“. Hlavním důvodem pro tento přívlastek byla pochopitelně nemožnost dostatečně objasnit interakci bakterie s hostitelskou buňkou a k tehdejšímu výzkumu nepřispěla ani absence znalosti genomových sekvencí *F. tularensis*, napomáhající většímu pochopení molekulárních mechanismů virulence [7].

F. tularensis se řadí mezi klasické zoonické patogeny. Často je nalézána u vektorů z kmene členovců - např. u klíšťat, much a komárů, kteří slouží k diseminaci bakterie k dalším obratlovcům, hlavně ke králíkům, zajícům a hlodavcům, včetně člověka. Možná i díky přenosu *F. tularensis* na tyto savce se mezi širokou veřejností zažil i druhý často používaný název pro tularémii. I v odborné literatuře ji lze najít pod pojmem zaječí nemoc [8]. Prostředí, ve kterém je bakterie schopna přežít je voda. Rozvoj patogeneze *F. tularensis* především závisí na schopnosti napadnout a replikovat se v makrofázích, jakožto hlavních hostitelských buňkách *in vivo* [9].

1.2 Základní charakteristika *F. tularensis* a její zařazení dle taxonomické nomenklatury

F. tularensis lze vystihnout jako nesporeujícího, nepohyblivého, malého Gram negativního kokobacila velikosti 0,2-0,7 μm , který je schopen perzistovat v prostředí poměrně dlouhou dobu a způsobovat tak onemocnění nejen u lidí [4]. Typicky dochází u lidí k nakažení hmyzím bodnutím (i klíšťaty), nebo při nešetrné manipulaci s nemocnými či mrtvými zvířaty, jako jsou

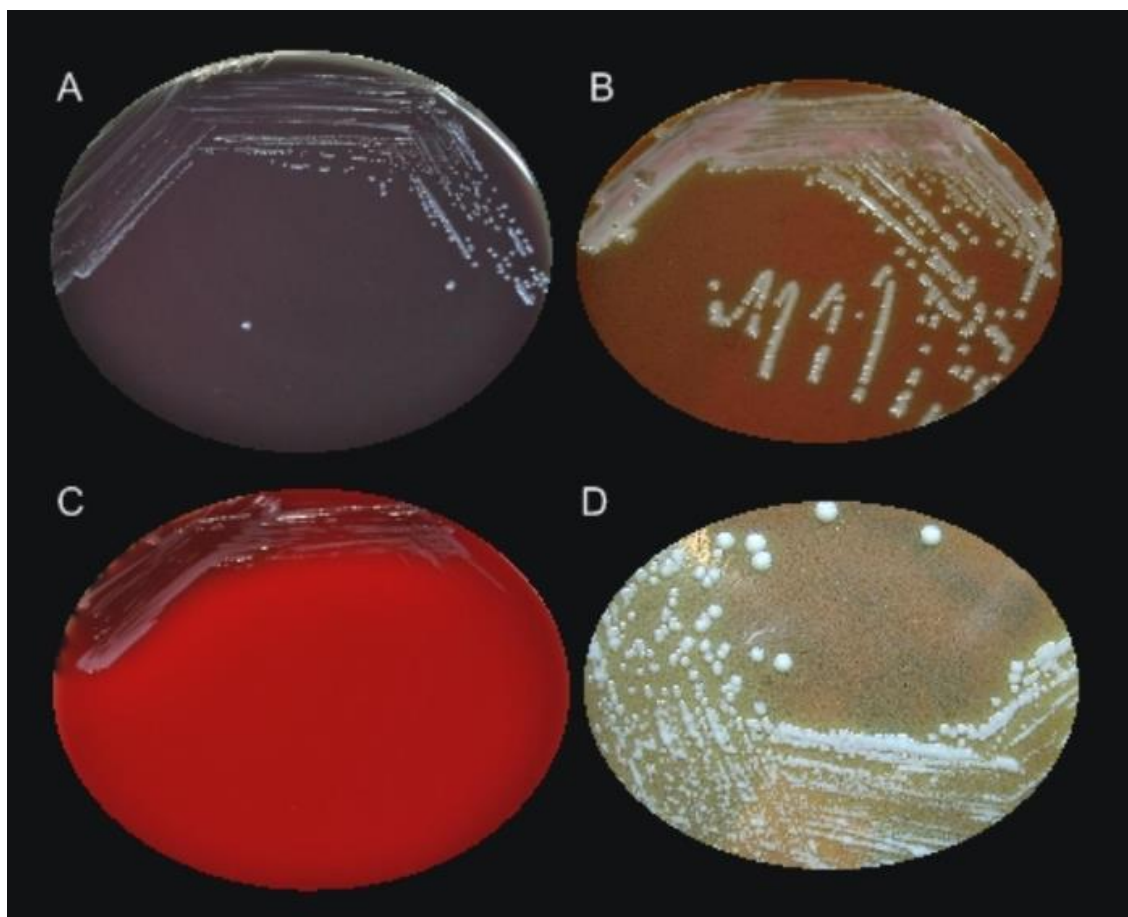
králíci, hlodavci. Nelze opomenout ani riziko kontaminované vody, jídla, pití a v laboratorních podmínkách hrozí často riziko nákazy inhalací bakteriálního aerosolu. Růstově patří mezi náročnější bakterie. Mnohdy vyžaduje i vícedenní kultivaci při 37 °C a atmosféře 5% CO₂ [10].

Francisella je jediným rodem z čeledi *Francisellaceae* a na základě sekvenační analýzy 16S rRNA se řadí do γ podtřídy proteobakterií. Dle fylogenetické analýzy byl nejvíce příbuzný rodu *Francisella* organismus *Wolbachia persica* parazitující na červech, který se nedávno přejmenoval a zařadil do rodu *Francisella*, jako *F. persica* [11]; [12]. Podobně byla prokázána fylogenetická podobnost 16S rRNA sekvence s lidskými patogeny *Coxiella burnetii* a se zástupci rodu *Legionella* [13].

U rodu *Francisella* se rozlišují tři subtypy na základě podobnosti v DNA sekvenci a ve složení mastných kyselin: *F. tularensis*, *F. novicida* a *F. philomiragia*. Klinicky významné jsou především poddruhy *F. tularensis*, které představují riziko pro člověka. *F. novicida* a *F. philomiragia* se sice subtypovými znaky podobají, ale jsou méně virulentní a svým metabolismem méně náročné na růstové podmínky v kontrastu s *F. tularensis* [13; 14]. Druhy *F. novicida* a *F. philomiragia* se pouze zřídka řadí mezi lidské patogeny. Jediní nakažení těmito druhy, kteří jsou dokumentováni, jsou osoby s poruchou imunitního systému [14].

V současné době jsou identifikovány 3 poddruhy *F. tularensis*, jež mohou způsobovat infekce u lidí a pouze dva z nich jsou klinicky významné: Poddruh *tularensis* (typ A), který způsobuje závažné, život ohrožující infekce, byl izolován v Severní Americe, i když v poslední době došlo i k vzestupu ve Střední Evropě [15]. Zatímco *holarctica* (typ B) je rozšířen po celé severní polokouli a způsobuje klinicky mírnější infekce, což ale neznamená, že je méně nebezpečný. Oba poddruhy jsou zneužitelné jako biologické zbraně, letální následek případného zneužití u lidí je znám pouze u poddruhu *tularensis* [14; 16]. Značná genetická podobnost mezi jednotlivými poddruhy *F. tularensis* značně ztěžuje typizaci. Mezi poddruhem typu A jsou navíc dvě hlavní subpopulace. Označují se A₁ a A₂ a jsou geneticky odlišné. Izoláty ze skupiny A₁ jsou geneticky nejrozmanitější, byly nalezeny v jedenácti státech USA, v Kanadě a ve Střední Evropě. Kdežto poddruh A₂, jakožto méně rozmanitá skupina, pochází z Kanady a čtyř států USA: Kalifornie, Wyomingu, Utahu a Nevady. Souhrnně se tedy oba typy jeví odlišně jak genotypicky, tak geograficky [15]. Třetí subspecies - *mediasiatica* je lokalizován především v oblastech Střední Asie a jeho virulence je téměř srovnatelná s poddruhem *holarctica* [15].

K základní charakteristice bakterie se řadí i možnosti její identifikace (více viz kapitola 1.5). Jak již bylo zmíněno výše, *F. tularensis* se řadí mezi kultivačně náročnější bakterie. Vyžaduje specifické požadavky pro růst na živném médiu – např. železo a cystein či cystin (sloučeniny, jejichž součástí jsou - SH skupiny). Tyto náročné požadavky pro kultivaci splňuje nejen čokoládový agar, ale i MacConkey agar nebo např. thioglykolátový vývar. Dnes se ve většině případů tyto živné půdy dodávají s ovčí nebo koňskou krví, peptonem a glukózou do laboratoří komerčně. *F. tularensis* vytváří na agarových plotnách typicky hladké, šedobílé kolonie, o velikosti 2-4 mm s opalescentním leskem po 48 hodinách kultivace. Nazelenalého zralého vzhledu kolonie vykazují nejméně po třech dnech kultivace za zvýšené tenze CO₂ (viz Obr. 1). Co se týká biochemických zkoušek pro identifikaci, je *Francisella* oxidáza i ureáza negativní, β- laktamáza pozitivní [10; 17].



Obr. 1 - Dokumentace růstu kolonií *F. tularensis* na různých typech médií: (A) pufovaný extrakt z kvasného uhlí; (B) čokoládový agar; (C) ovčí krevní agar; (D) cysteinový krevní agar [10; 17].

1.3 Biologický profil a faktory virulence

Na povrchu bakteriální (prokaryotické) buňky je buněčný obal. Ten má dvě nebo tři vrstvy - semipermeabilní vnitřní cytoplasmatickou membránu, buněčnou stěnu, v případě některých bakterií je na povrchu kapsula (pouzdro) [18; 19]. Je vědecky objasněno, že zcela virulentní mikroorganismy jsou zapouzdřeny. Divoké kmeny *F. tularensis* a kmen LVS jsou na svém povrchu opatřeny exosacharidovou kapsulou. Ovšem ne všechny druhy patřící do rodu *Francisella* mají kapsulu – u druhů *F. novicida* a *F. philomigaria* kapsula prokázána nebyla [4; 20]. Pouzdro je pro *F. tularensis* nezbytné z hlediska ochrany proti sérovému komplementu, ale k přesné detailní analýze složení kapsuly ještě nedošlo. Dostupná fakta o této struktuře doplňuje znalost o shlcích genů přítomných v SchuS4 (kmen *F. tularensis* subsp. *tularensis*) genomu, které se podílí na kódování biosyntézy polysacharidů, ze kterých je kapsula složena [4]. Kromě ochrany před fagocytózou slouží pouzdro pro bakterie jako ochrana před vyschnutím. Bakterie bez kapsuly postrádají virulenci a ztrácí schopnost vyvolat antimikrobiální imunitní odpověď zprostředkovanou leukocyty [18].

Další ze tří vrstev buněčného obalu - buněčná stěna je složena z peptidoglykanu (mukopolysacharidu). Plní funkci ochrany před okolními podmínkami, především dodává buňce potřebný tvar, slouží jako kotva pro bičíky a fimbrie, jež vychází z cytoplasmatické membrány a prostřednictvím buněčné stěny prostupují skrz buňku [18; 19].

Postupným sekvenováním jednotlivých poddruhů *F. tularensis* se odhalila přítomnost genů, kódujících speciální typ vlasovitého útvaru na povrchu bakterie - pilu typu IV (Tfp z angl. Type Four Pili). Tfp nejsou zdaleka exprimovány pouze *F. tularensis*. Tento multifunkční vláknitý útvar nacházíme u široké škály odlišných bakterií - např. enteropatogenní *E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp. Mezi funkce Tfp patří nejen to, že zajišťují pohyblivost, ale napomáhají i tvorbě biofilmu, adhezi k hostitelské buňce a výměně DNA. Tfp se mimo jiné významně podílí na virulenci, zejména Gram negativních bakterií. Z toho vyplývá, že jakýkoli rozvrat Tfp má za následek jejich sníženou virulenci [21]. To, jakými molekulárními mechanismy se Tfp zapojují do virulence bakterie, je stále velkou vědeckou hádankou [22].

Na základě rozdílného složení buněčné stěny se rozlišují Gram pozitivní a Gram negativní bakterie. Vnitřní vrstva u Gram negativních bakterií obsahuje peptidoglykan, vnější vrstva se skládá z fosfolipidů, lipopolysacharidů (LPS) a lipoproteinové vrstvy s povrchovými proteiny [18]. Hlavní složkou vnější stěny u Gram negativních bakterií jsou lipopolysacharidy (LPS),

čili endotoxiny. Skládají se z O-antigenu, lipidu A a centrálního polysacharidu [18]. Interakcí a tvorbou komplexu LPS s MD-2 proteinem na Toll-like receptorech (TLR z angl. Toll-Like Receptors), nacházejících se na makrofázích a endoteliálních buňkách, se aktivuje prudká signální kaskáda, jež má za následek uvolňování prozánětlivých cytokinů. LPS u zástupců rodu *Francisella* má poměrně nízkou biologickou aktivitu ve srovnání např. s enterobakteriemi [4]. Je prokazatelná identita O-antigenů *F. tularensis* subsp. *tularensis* a subsp. *holarctica*, u *F. novicida* se O-antigen liší [4]. Neobvyklá lipopolysacharidová stavba u této bakterie a částečně i přítomnost kapsuly napomáhá *F. tularensis* znemožnit fagozom-lyzosomální fúzi uvnitř fagocytujících buněk a uniknout tak přirozené imunitní odpovědi [21].

Genetická informace se v bakteriálních buňkách uchovává ve formě nukleoidu - uzavřené kruhové molekuly nukleové kyseliny bez jaderné membrány. Mimo jadernou hmotu cytoplazma obsahuje v hojném počtu další struktury - nejčastěji inkluze, plazmidy a 70 S ribozomy, na jejichž velké podjednotce probíhá genová exprese při translaci [19].

1.3.1 *F. tularensis* a její genom

Postupem let, díky rozvíjejícím se technologiím a nárokům na sekvenaci či studium genomu, zejména nebezpečných biologických agens, došlo i ke genomické analýze *F. tularensis* a studiu antigenních složek pro vývoj vakcíny a pochopení jednotlivých mechanismů infekce [13]. V minulosti se postupy na vývoj zbraní zneužívajících virulenci bakterie zabývaly státy bývalého Sovětského Svazu a USA [13]. Možná i proto s ohledem na nízkou infekční dávku a snadný přenos byla *F. tularensis* zařazena Centrem kontroly nemocí v USA (CDS z angl. Center for Disease Control) do kategorie A mezi potenciálně vojensky a teroristicky zneužitelné organismy společně s *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, botulotoxinem, viry hemoragických horeček *Lassa*, *Ebola*, *Marburg* a viru pravých neštovic [23].

Vědci zabývající se studiem polymorfismu genomu *F. tularensis* i jeho postupným sekvenováním odhalili, že jednotlivé izolované kmeny mají různé genomy a liší se virulencí pro člověka. Znalost genomu bakterie byla pro vědce nepostradatelným mezníkem, stejně jako nalezení odpovídající metody pro konstrukci cílených delečních mutantů [24]. U některých kmenů jsou dokonce jen nepatrné odlišnosti v pouhých setinách procent - např. u kmenů FSC200 izolovaného v Evropě (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) a OSU18 (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) izolovaného v USA [13].

Genom kmene SchuS4 (*F. tularensis* subsp. *tularensis*) je složen z 1 892 819 bp stočených do kruhového chromozomu, zahrnující 1804 kódujících sekvencí, z nichž 302 sekvencí je pro *F. tularensis* unikátních. V této oblasti se identifikovalo 25 genů s nejasnými bakteriálními homology, z čehož vyplývá, že mohou kódovat prozatím neznámé faktory virulence. V kmeni LVS (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) i v genomu kmene *F. novicida* je prakticky stejné genové obsazení, jako u *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Z toho vyplývá, že tato skupina genů nemůže sama o sobě odpovídat za vysokou virulenci *F. tularensis* subsp. *tularensis*. Jakékoli narušení genů v této oblasti dává za vznik mutantním bakteriím, které se vyznačují odlišnou schopností přežívání v makrofázích. Analýza této oblasti genů v genomu byla provedena nejprve u subtypu *F. novicida* a oblast se nazývá ostrov patogenity (FPI z angl. *Francisella* Pathogenicity Island). Postupně se FPI, s velikostí asi 30 kbp s nízkým zastoupením GC párů a vyšším obsahem AT, který není nikde jinde v celém zbytku genomu, zkoumá u všech typů rodu *Francisella* [4; 13].

1.3.2 Ostrov patogenity

Mezi přirozené niky vysoce patogenní bakterie, jakou nepochybně *F. tularensis* je, se řadí vnitřní prostředí hostitele. Díky tomu, že je schopna si vyvinout sofistikované nástroje pro přežití v buňce, s čímž souvisí odbourání buněčných obranných mechanismů za současného stěžejního intracelulárního množení v profesionálních fagocytech, ji považujeme za vysoce virulentní [25]. V kapitole 1.3 jsou již zmíněny některé faktory podílející se na virulenci - jako specifická stavba buněčné stěny, jejíž hlavní složkou jsou LPS a dále pouzdro bakterie. Postupně jednotlivé kapitoly odhalí další faktory zvyšující virulenci potenciál *F. tularensis*.

Ostrov patogenity (FPI) obsahuje 16-19 otevřených čtecích rámců (ORF z angl. Open Reading Frame) a hraje nepostradatelnou úlohu ve virulenci bakterie [26]. FPI se nachází ve všech genomech jednotlivých subtypů rodu *Francisella*. FPI se vyskytuje ve dvou kopiích u *F. tularensis* a pouze v jedné kopii u *F. novicida* a *F. philomiragia* [14; 26].

Francisella není bakterie bohatá na přítomnost regulačních proteinů. Jeden z prozatím popsáných pozitivních regulačních proteinů - MgIA u *F. tularensis* reguluje její intracelulární parazitismus tím, že v FPI reguluje expresi několika genů v operonech *igl* a *pdp* (jakákoli mutace v těchto genech způsobuje oslabení virulence). Gen *iglC* navíc napomáhá formovat

fagozom a tím zabránit lysozomální fúzi, uniknout do cytosolu hostitelské buňky při replikaci a vyvolat její apoptózu [4; 27; 28]. Rozložení jednotlivých genů FPI je shrnuto na Obr. 2.

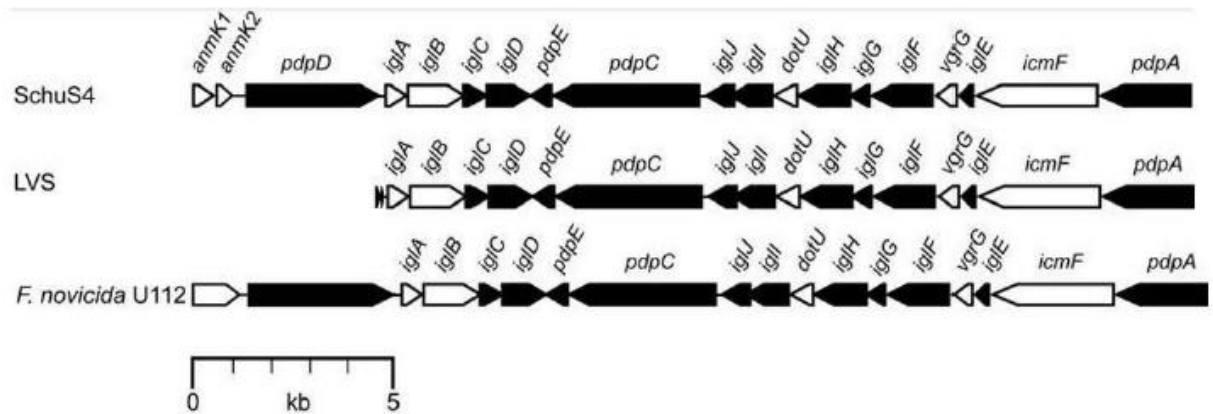
Rozdíly ve virulenci kmenů jsou spojeny s aktivitou citrulin ureidázy. Tato deamináza společně s L-glutaminázou a L-asparginázou dávají vznik amoniaku, který napomáhá přežití patogena uvnitř makrofágů. Pokud je *F. tularensis* v okyseleném médiu, aktivitou těchto enzymů dochází ke zvýšení pH v důsledku tvorby amoniaku. Produkce citrulin ureidázy se často využívá k odlišení jednotlivých vysokovirulentních subspecies (subsp. *tularensis*) od nízkovirulentních (subsp. *holarctica*). Nízká aktivita L-glutaminázy je spojena s nízkou virulencí [13].

Postupnou genomovou analýzou se ve vědeckých studiích často skloňují další geny, které se určitým způsobem podílí na virulenci bakterií rodu *Francisella*. V této souvislosti se uvažuje o Tfp. Ví se, že jeho regulace závisí na proteinu MgIA. U ostatních bakterií slouží pilus typu IV jako virulenční faktor [13].

Při studii interakce dvou odlišných zástupců rodu *Francisella* s hostitelskými eukaryotními buňkami byl potvrzen význam exprimovaného integrálního membránového proteinu FsaP. Tento protein je jedinečný pro *F. tularensis* a je exprimován na vnější straně membrány kmene LVS. Tento protein napomáhá *F. tularensis* adherovat k slizničním povrchům a napomáhá rozvoji patogeneze onemocnění. U *F. novicida* a u kmene LVS (subtyp *holarctica*) se testoval vliv proteinu FsaP na jejich adherenci k eukaryotním buňkám A549 (neboli lidské plicní rakovinné epitelové buňky). Zajímavé je, že *F. novicida*, která tento protein neexprimuje ve své membráně, neadheruje k buňkám A549. V porovnání s tím, kmen LVS, který FsaP exprimuje, adheruje k testovaným buňkám mnohem ochotněji a tím dochází i ke snadnější fagocytóze. Proto byly kmenem LVS infikovány i myši a byla prokázána významná produkce protilátek o vysokém titru proti FsaP proteinu. Dá se proto prognostikovat vakcinogenní potenciál tohoto proteinu a s tím spojené další podrobnější analýzy k objasnění jeho role v patogenezi tularémie [29].

Při prvotní fázi infekce bakterií rodu *Francisella* vzniká uvnitř profesionálních fagocytů fagozom. Během svého počátečního růstu sídlí bakterie uvnitř fagozomu, který je poután k membráně. Později v době proliferace bakterie expanduje do cytoplasmy. Kyselá fosfatáza patří mezi nepostradatelné proteiny bakterií. Klíčem k přežití bakterií uvnitř makrofágů tedy dle studií spočívá v kyselé hydrolyze fosfomonoesterů se schopností tlumit respirační vzplanutí. Genomová sekvence *F. tularensis* SchuS4 kóduje 4 kyselá fosfatázy - *acpA*, *acpB*, *acpC* a *hap*. *AcpA* je polyspecifická periplasmatická kyselá fosfatáza, která je hojně

exprimována kmenem *F. tularensis* a vykazuje aktivitu fosfolipázy C. U *F. novicida* se prokázalo, že kompletní delecí *acpA* (vznikem mutantního kmene) se nejen snížila fosfatázová aktivita, ale mutantní bakterie vykazovaly i vyšší citlivost k intracelulárnímu usmrcení [30].

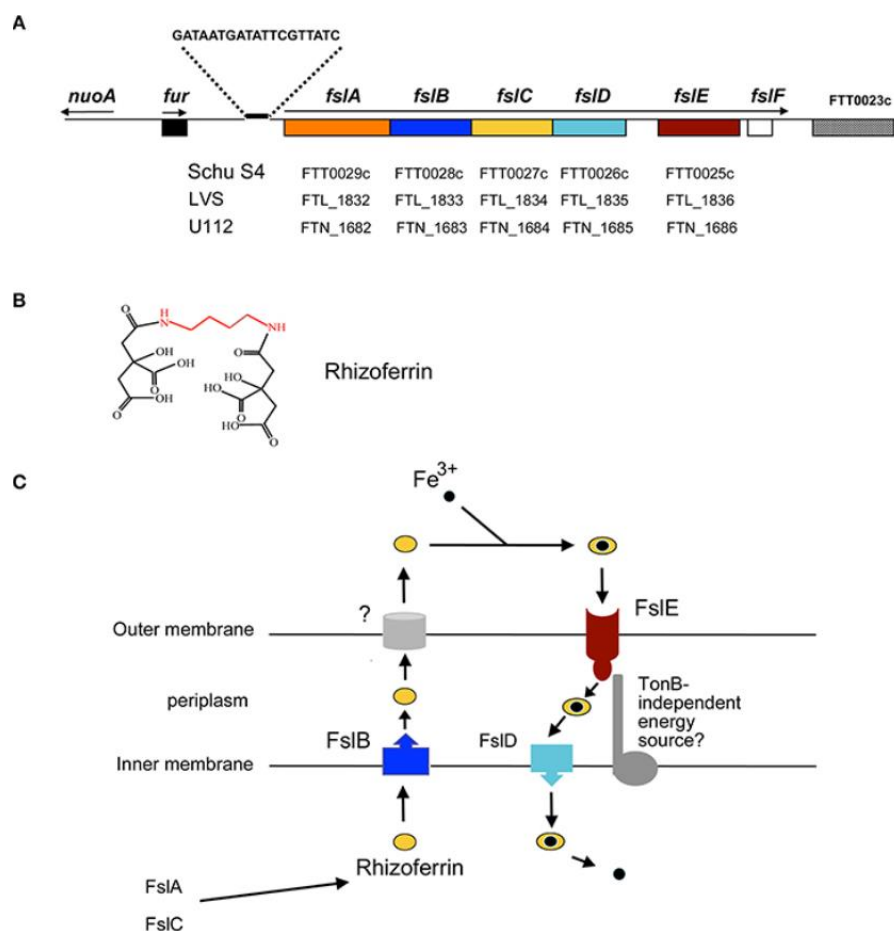


Obr. 2 - Schematické znázornění FPI u kmenů *F. tularensis* SchuS4, LVS a *F. novicida* U112 [31].

Jak je patrné, ORF místa jsou identická u všech uvedených kmenů s výjimkou *anmK* a *pdpD* lokusů. U kmene LVS došlo k obrovské delecí těchto lokusů. Měřítko má demonstrovat velikost ORF míst.

Černě značenými místy jsou označeny geny, jejichž transkripce vznikají proteiny bez jakékoli homologie u jiných bakterií. Naopak bílé šipky označují geny, jejichž expresí vznikají proteiny homologní s dalšími bakteriálními systémy [31].

V celkovém souhrnu asi těch nejdůležitějších faktorů virulence pro bakterie rodu *Francisella* nesmí být opomenut důležitý vliv železa, jakožto stopového prvku. Je známo, že jak eukaryotní, tak prokaryotní organismy ke svému životu potřebují tento esenciální prvek pro nejrůznější biochemické cykly. Železo patří mezi prvky nezbytné obecně pro interakci bakterie s hostitelem. Pouze dva mikroorganismy – *Borrelia burgorferi* a *Lactobacillus sp.* nevyužívají ve svém metabolismu železo [32; 33]. U *F. tularensis* byl na základě studií predikován gen (*fur* gen - viz Obr. 3), který se podílí na metabolismu železa a ke své plné funkci využívá jeho dvojmocné ionty. Bakterie tyto ionty získávají přímo z hostitelských buněk např. z hemu [13; 34].



Obr. 3 - Siderofory zprostředkované získávání železa u *F. tularensis* [35].

A - Zobrazení kompletního lokusu *fur-fsl* *F. tularensis* subsp. *tularensis*. V horní části je zobrazen chromozom subsp. *tularensis* a jemu odpovídající geny jsou vyznačeny u kmenů *F. tularensis* SchuS4, LVS a *F. novicida* U112. Černé šipky značí směr a rozsah jednotlivých transkribovaných sekvencí.

B - Siderofor Rhizoferrin u *F. tularensis*. Tato sloučenina je složena ze dvou citrátových molekul, spojených amidovými vazbami k putrescinu (označen červeně).

C - Schéma získávání železa prostřednictvím sideroforu a role *fsl* operonu. FslA a FslC, jakožto produkty operonu, kódují syntézu sideroforu prostřednictvím enzymů a ten je pak uvolňován do extracelulárního prostředí díky zásahu FslB a některých dalších neznámých komponent membrány. Úkolem receptorů FslE společně s FslD je adsorbovat vzniklý komplex železo se sideroforem. S otazníkem je naznačen v obrázku TonB receptor. Není prozatím známo, zda-li zesiluje účinek FslE [35].

1.3.3 Genetické nástroje pro manipulaci s genomem *F. tularensis*

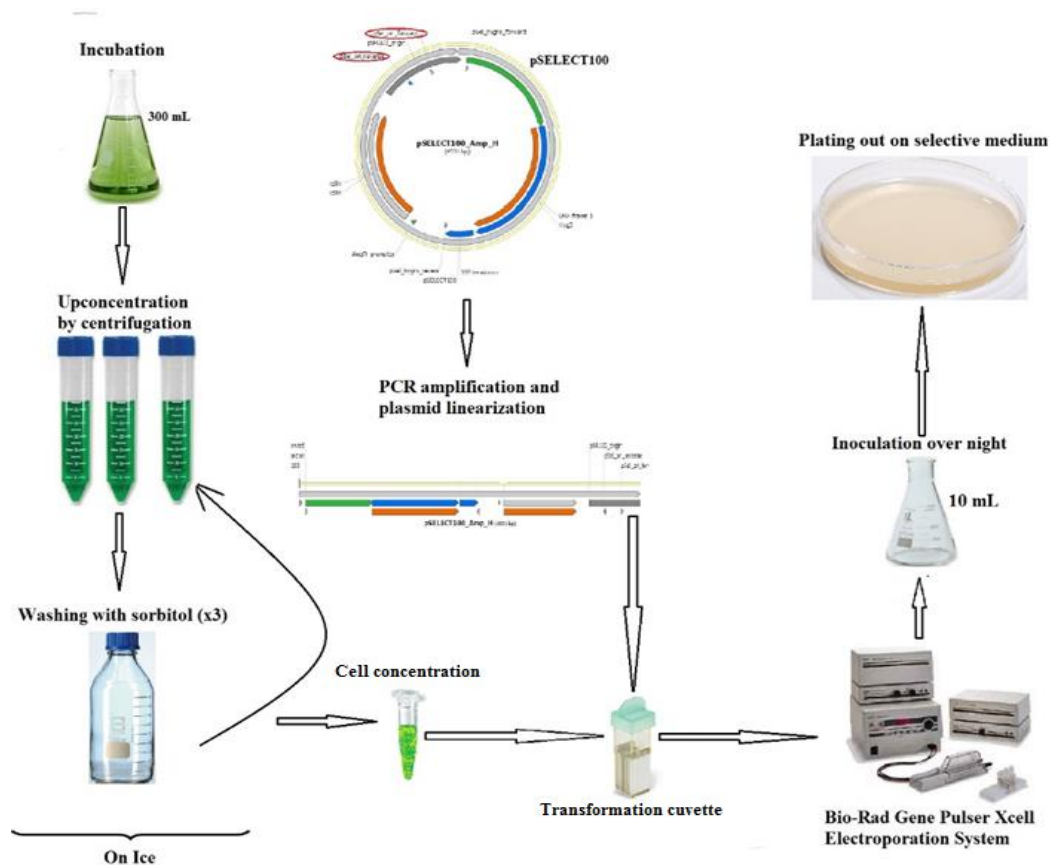
K pochopení mechanismů patogeneze, včetně podrobnějšího zkoumání faktorů virulence, růstu či proliferace *F. tularensis*, byly vyvinuty mutantní kmeny, u kterých byly za využití metod molekulární biologie inaktivovány geny, či skupina genů nezbytných pro zkoumanou vlastnost. S měnícími se podmínkami prostředí, vystavení oxidačnímu stresu, změnami teploty kultivace, variabilitou odpovědi bakterie na prostředí hostitele byly odhaleny esenciální geny, které ovlivňují zkoumané vlastnosti bakterie [4].

Mezi metody genetické manipulace, kde se exogenní genetická informace včleňuje do genomu mikroorganismu, patří konjugace, transformace, elektroporace či kryotransformace [4]. U bakterií rodu *Francisella* platí, čím více virulentní bakterie, tím hůře geneticky modifikovatelná.

Konjugací dochází k přímému přenosu plazmidové genetické informace pomocí pilů mezi donorovým a recipientním organismem (většinou mezi konjugačními bakteriemi) [36].

Chemická transformace byla provedena pouze u *F. novicida*. Tento druh manipulace je závislý na sestaveném plazmidovém konstrukt a na délce DNA, která se má do plazmidu inkorporovat. V daném experimentu byly přerušeny geny kódující vznik restričních enzymů, které bakterii přirozeně chrání proti cizorodé DNA [4; 37]. Novější technikou je **kryotransformace**, která se ukázala být účinná nejen u *F. novicida*, ale i u dalších druhů. Póry v membráně bakterií sloužící k včlenění cizorodé DNA, se vytvoří postupným rozmrazením při 37 °C po předchozím rychlém zamražení pomocí suchého ledu či kapalného dusíku.

Elektroporací jsou buňky vystaveny vysokému napětí, při kterém se účinněji než pomocí kryotransformace otevřou póry exopolysacharidového pouzdra a DNA může proniknout do bakterií. Pro *F. tularensis* se využívá následujícího nastavení elektroporační aparatury: napětí 2,5 kV, kapacita 25 μ F a odpor 600 Ω [4; 36]. Pro ilustraci je níže obecný postup elektroporace vyobrazen na Obr. 4.



Obr. 4 - Obecné schéma elektroporace [38].

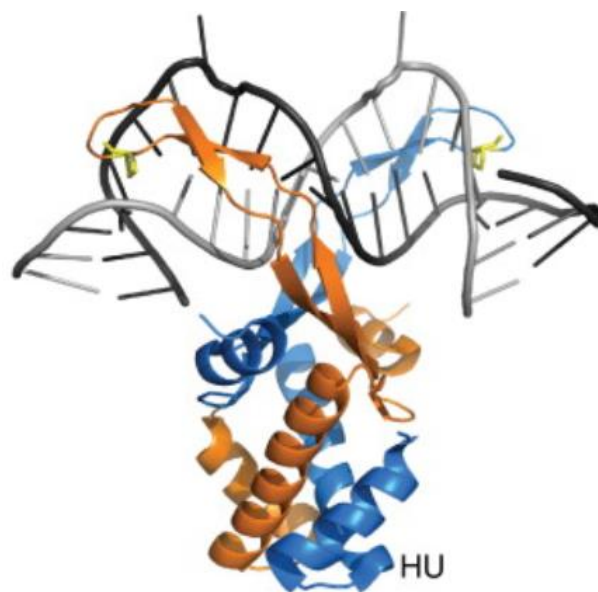
Nejdříve je třeba vyset na kultivační plotny zásobní kultury bakterií a kultivovat je v termostatu při 37 °C. Z ploten se bakterie přeočkují do předeřátého Chamberlainova média a kultivace probíhá při 37°C a 200 rpm. Po inkubaci se buňky centrifugují, promyjí se 0,5 M sacharózou (zde sorbitol) a resuspendují se ve 2 ml 0,5 M sacharózy. Následně se připraví alikvoty po 200 µl (koncentrace 1×10^{10} buněk/ml). Přibližně 100 ng plazmidu se smíchá se 100 µl elektrokompetentních buněk - směs se inkubuje 10 minut při laboratorní teplotě. Poté již dochází k samotné elektroporaci v 0,2 cm květech za daných podmínek. Po elektrickém šoku se okamžitě přidá 1 ml (zde 10 ml) Chamberlainova média a kultura se inkubuje při 37 °C a 200 rpm. Nesmí chybět selekce na McLeod půdě s příslušným antibiotikem (v našem případě u *F. tularensis* s koncentrací kanamycinu 20 µg/ml média).

1.3.4 HU protein

HU byl poprvé popsán v roce 1975 jako histonu podobný protein u kmene *E. coli* U93, kde hraje důležitou roli v iniciaci replikace DNA, ochraně proti oxidačnímu stresu a při metabolismu galaktózy [39]. Nejdříve byl označován jako faktor U. Později na základě podobnosti s histony, proteiny s vysokou mobilitou (HMG z angl. High Mobility Group) jako protein HU. Řadí se k jaderným proteinům, které stabilizují jednotlivé nukleotidové komplexy, a proto je přesnější označovat ho jako zástupce nukleoid-asociovaných proteinů (NAPs z angl. Nucleoid-Associated Proteins).

Odlišují se čtyři skupiny proteinů patřících mezi nukleoid-asociované proteiny: HU, H-NS (z angl. Histon-like Nucleoid Structuring), IHF (z angl. Integration Host Factor) a FIS (z angl. Factor for Inversion Stimulation). Mimo toto dělení jsou známy také další histonu-podobné proteiny, které se liší homologií [39]. Svůj název dostaly na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností - nízká molekulová hmotnost, vysoký počet kopií v buňce a podléhají vysokému elektrostatickému napětí [40].

HU protein se váže na dsDNA nízkoafinitně, bez sekvenční specifity. Pokud v DNA dojde ke změnám, kterými se myslí mezery, přesahy, defekt ve spojení, váže se HU protein k této DNA vysokoafinitně. HU protein se vyskytuje v buňce ve formě homo nebo heterodimerů. U bakterií ze skupiny *Enterobacteriaceae* (např. *E. coli*), je protein tvořen podjednotkami HU α a HU β , které jsou kódovány geny *hupA* a *hupB*. V jiných bakteriích, např. v *Mycobacterium tuberculosis* nebo *F. tularensis*, má HU protein podobu homodimeru, tj. obsahující pouze HU β podjednotku, která je kódována *hupB* genem. Strukturně byl protein několika prokaryotních organismů analyzován metodou NMR (nukleární magnetické rezonance) a rentgenové krystalografie. HU podjednotka se skládá z α -helixu, jenž je obklopený dvěma β -listy – viz Obr. 5. [3; 39; 41].



Obr. 5 - Krystalografická struktura HU proteinu [42].

Monomery jsou zbarveny v oranžové a modré barvě. Struktury jsou znázorněny v rovině ohnuté DNA.

Tento malý histonu podobný protein v přítomnosti topoizomerázy I zavádí do DNA negativní nadšroubovicové vinutí. Účastní se DNA replikace, ale i rekombinací a oprav - např. pokud bakterie musí překonat různé obranné mechanismy při vniku do hostitelské buňky. Mezi další obecné vlastnosti HU proteinu patří jeho důležité uplatnění v buněčném cyklu v stacionární fázi, ale pomáhá i při situacích, kdy je buňka v různých stresových podmínkách (chrání DNA proti působení volných radikálů) [41].

Zkoumaným se HU protein stává zejména u patogenních bakterií, protože u nich ovlivňuje nejen jejich metabolismus. Reguluje expresi genů podílejících se na virulenci a rovněž bylo popsáno, že u kmene LVS (*F. tularensis* subsp. *holarctica*) je HU protein vylučován z buňky do extracelulárního matrix a může hrát roli v adhezi bakterie s kolagenem v respiračním epitelu buňky [3; 43].

U *F. tularensis* subsp. *holarctica* je HU protein kódován genovým lokusem FTS_0886. Bylo prokázáno, že u *F. tularensis* HU protein ovlivňuje virulenci této patogenní bakterie a také hraje roli v odolnosti vůči oxidativnímu stresu [3].

V dalších kapitolách budou popsány zbylé mechanismy virulence související s imunopatogenezí buňky a to schopnost intracelulární replikace bakterií rodu *Francisella* a její schopnost regulovat apoptózu buňky, tím pronikat z napadené buňky a infikovat další makrofágy.

1.4 Molekulární mechanismy patogeneze *F. tularensis*

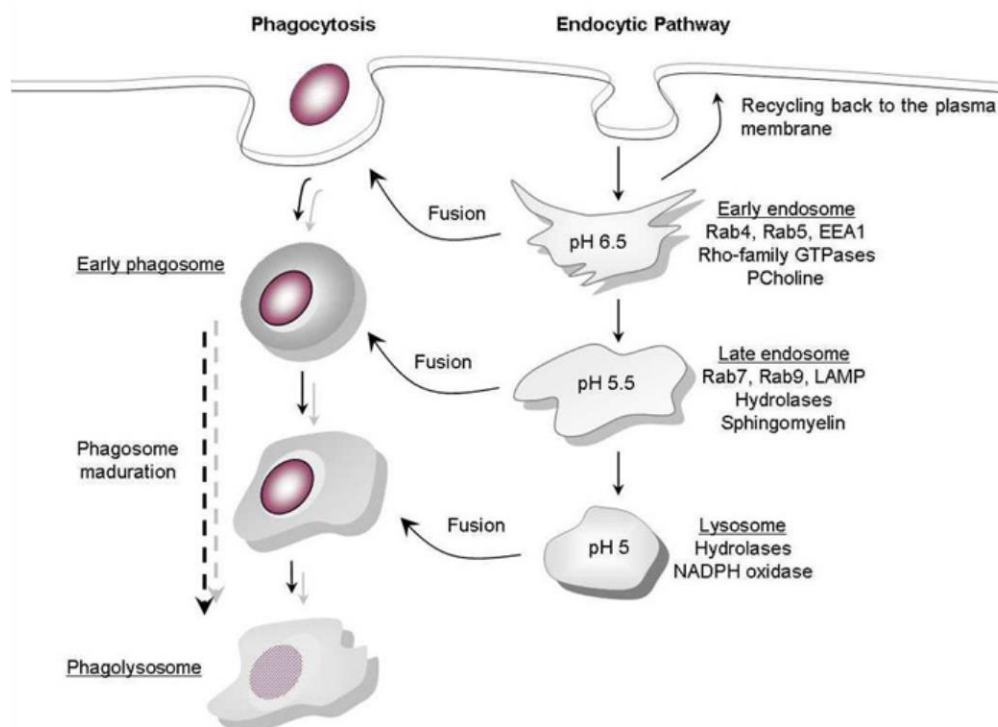
F. tularensis patří mezi patogenní intracelulární bakterie. Obrovskou výhodou je její schopnost napadat a množit se v řadě typů buněk jak nefagocytujících (hepatocyty, epitelální buňky a endotelové buňky), tak v zástupcích buněk monocyto-makrofágového systému (makrofágy a dendritické buňky) [7]. Tím, že proliferuje v odlišných typech tkání, narušuje tím jejich fyziologickou funkci a vyvolává zánětlivou reakci, která danou tkáň poškozuje a v tom tkví její virulence. Na rozdíl od jiných patogenních bakterií nepotřebuje ani produkci běžných virulenčních faktorů, mezi které patří např. exotoxin [7].

Vrozená odpověď imunitního systému na *F. tularensis* je interakcí bakteriálních proteinů TUL4 a FTT1103 s TLR bílkovinnými receptory na povrchu cytoplasmatických membrán u buněk imunitního systému, které jsou pravděpodobně zodpovědné za produkci

prozánětlivých cytokinů během infekce [44]. Obecně se na rozeznání tohoto patogenního mikroorganismu podílí i další komponenta imunitního systému - jako komplementové systémy, úklidové (scavenger) receptory, či lektiny nebo integriny. Jejich aktivací dojde k úpravě aktinového cytosketu buňky a následně je buňka připravena pohltit mikroorganismus prostřednictvím fagocytózy, díky tvorbě panožek. Hostitelská buňka má na svém povrchu speciální receptory, díky kterým může být umožněna tzv. receptory zprostředkovaná endocytóza [45].

1.4.1 Receptorem zprostředkovaná endocytóza

Tento receptor je z biochemického hlediska glykoprotein, který se nachází v membráně v tzv. *coated pits* (potažených jamkách). V místech obrácených do cytosolu se nachází polypeptidová klathrinová síť kolem jamek. Tato síť napomáhá vtlačit jamku společně s receptorem a navázaným ligandem do nitra buňky. Následujícím odškrcením vzniká transportní (klathrinový) váček. Ten obsahuje specificky receptorem navázanou molekulu, která je dále v buňce zpracována. Jakmile se receptor uvolní z ligandového komplexu, vrací se zpět na membránu a dále se využívá. Po tomto kroku vzniká časný endozom, také fagozom. Jeho pH se pohybuje okolo 6,5 (tedy kyselější než v cytosolu, což je dáno čerpáním H^+ z cytosolu pomocí ATP pumpy do endozomu). Mikrotubuly v buňce zajišťují posun časného endozomu do středu buňky, tím se dává za vznik pozdnímu endozomu a dochází tak k většímu okyselování. V pozdním endozomu jsou již přítomny některé enzymy z Golgiho aparátu, které ještě nezajistí degradaci obsahu váčku, ale dojde k zahájení proteolytického štěpení. Fúzí pozdního endozomu a lysozomu vzniká fagolyzozom (podrobně naznačeno na Obr. 6). Lysozomy jsou organely obsahující hydrolytické enzymy (proteázy, lipázy, fosfatázy či nukleázy), které jsou aktivní při velmi kyselém pH (4,5-5). Zde již dochází k úplné likvidaci obsahu ve váčku [46]. *F. tularensis* svými mechanismy brání vzniku fagolyzozomu a proniká tak dál do cytosolu buňky.



Obr. 6 - Jednotlivé kroky vzniku fagolysozomu [47].

Při fagocytóze dochází k internalizaci molekul do časných endozomů. Část (zejména receptory a klathrinové sítě) se opět využívají k další endocytóze, což je zajištěno jejich opětovným transportem k plazmatické membráně. Další složky jsou transportovány dál do buňky a postupně dochází k jejich degradaci. Při těchto krocích dochází ke koordinaci prostřednictvím sekvenčně aktivních molekul, které regulují odpovídající spojení složek za vzniku fagolysozomu [47].

1.4.2 Vstup *F. tularensis* do fagocytujících buněk

Pozoruhodná je interakce *F. tularensis* s hostitelskými buňkami, která byla nedávno blíže prostudována v *in vitro* studiích. Pro zvýšení úspěšnosti internalizace bakterie dovnitř makrofágů, je zapotřebí opsonizace v séru za pomoci komplementu C3 a jeho příslušného receptoru C3R. Komplement C3 se svým příslušným receptorem významně podílí i na vstupu *F. tularensis* do dendritických buněk [48]. Byly prokázány i další možné cesty vstupu *F. tularensis* do hostitelské buňky – mannózový receptor, přes který jsou fagocytovány neopsonizované bakterie, dále Fcy receptor i scavengerový receptor třídy A [48]. Na pohlcení bakterie skrz komplement C3 je kladen důraz z hlediska patogeneze, protože je potlačeno oxidativní vzplanutí [49]. Makrofágy vytvoří asymetrické klikaté panožky (pseudopodia), která bakterii obklopí, následně pohltní a vytvoří se fagozom [49].

V nedávno publikované studii byly identifikovány ke vstupu *F. tularensis* do myších makrofágů linie J774 i lipidové rafty, které potažmo využívá k zabránění její intracelulární

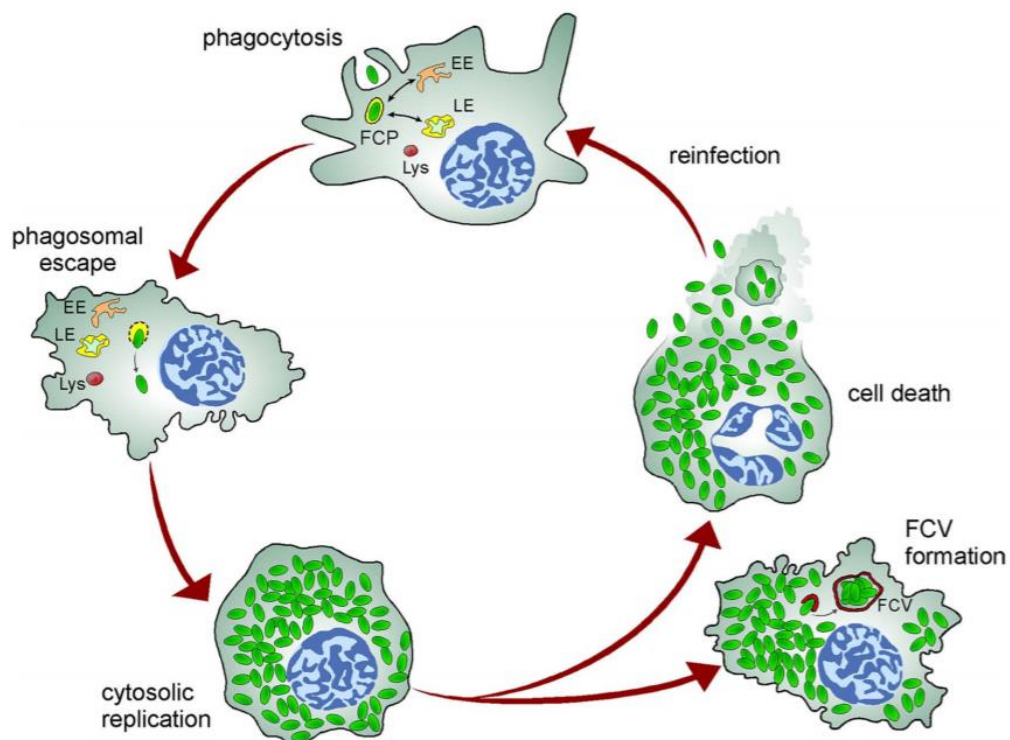
degradace. Lipidový raft je nabitý cholesterolem a kaveolinem-1. Rafty s obsahem cholesterolu hrají klíčovou roli pro množení bakterie v cytosolu hostitelské buňky, při vstupu raftem bez obsahu cholesterolu nebyl prokázán žádný intracelulární růst [48]. Jakmile *F. tularensis* vstoupí i do erytrocytů (jakožto nejdéle žijících krevních buněk), je bakterie roznášena krevní cestou po celém organismu, ale nedochází k jejímu efektivnímu množení. V těchto buňkách si *Francisella* udržuje pouze svůj konstantní rezervoár [50].

1.4.3 Intracelulární životní cyklus *F. tularensis*

F. tularensis, jakožto patogenní intracelulární bakterie, je schopná si svými mechanismy upravit vnitřní prostředí buňky tak, že se stane příznivé pro její množení. Fagozom či fagolizosom nejsou přirozená prostředí, ve kterých bakterie stráví většinu životního cyklu. Její dominantou se stává únik do cytosolu, kde se musí vyrovnat s neadaptivním imunitním systémem [51]. Do cytosolu makrofágů *Francisella* proniká jinými mechanismy nezávislými na pH [51].

Fagozom je organela ohraničená plazmatickou membránou. Fagozom projde několika maturačními kroky - viz kapitola 1.4.1 (zejména je důležitá jeho acidifikace), až po vznik degradujícího fagolizosomu. Po fagocytóze se *F. tularensis* nachází v tzv. membránou ohraničeném FCP (z angl. *Francisella* Containing Phagosom). FCP jakožto časný endozom na svém povrchu exprimuje marker EEA-1 a Rab-5 GTPasu 5 minut po infekci. Jeho důležitou součástí je membránově vázaný komplex NADPH oxidázy produkující superoxidové anionty. *Francisella* brání, jak složení enzymového komplexu na membráně, tak samotné produkci reaktivních forem kyslíku (ROS z angl. Reactive Oxygen Species) [2; 51].

Po splynutí časného endozomu s pozdním endozomem 15-30 minut po infekci, exprimuje na svém povrchu již proteiny LAMP-1 a LAMP-2 (z angl. Lysosomal-Associated Membrane Protein 1,2). Před fúzí fagozomu s degradujícím lysozomem nastává stěžejní krok pro *F. tularensis*, protože z této endocytární dráhy je schopna uniknout a pro její množení už nadále slouží cytosol makrofágu [2]. Z fagozomu do cytosolu je schopna proniknout asi 30 - 60 minut po infekci [51]. To, že *Francisella* uniká do cytosolu a tam se dál množí, je dáno expresí zejména *mgla* a *iglC* genů, které mají své místo na ostrovu patogenity. To je pozadím tvorby modifikované membrány fagozomu, jeho nesplynutí s lysozomem a *F. tularensis* je tak dán čas na rozrušení membrány fagozomu a průnik do cytosolu [2; 4], jak naznačuje Obr. 7.



Obr. 7 - Model intracelulárního životního cyklu *F. tularensis* [48].

Velká část bakterií v cytosolu byla nalezena v LAMP-1 pozitivních, membránou ohraničených vakuolách označovaných jako FCV (z angl. *Francisella* Containing Vacuoles). V těchto vakuolách byly s užitím technik fluorescenční a elektronové mikroskopie odhaleny morfologicky nezměněné bakterie. Na povrchu membrány FCV se nachází protein specifický pro autofagii LC3. Procesem autofagie se buňky zbavují nežádoucích patogenů uvnitř buňky tvorbou autofagozomů a jejich následným splynutím s lysozomy. Ale ani tento proces nezajistí zničení *F. tularensis*. Autofagii si v buňce řídí sama bakterie a využívá tento proces pro svůj intracelulární parazitismus [52].

1.4.4 Regulace imunitní odpovědi prostřednictvím interferonů

Mnoho studií i publikací naznačuje, že aktivované makrofágy prostřednictvím $\text{INF-}\gamma$ regulují intracelulární proliferaci *F. tularensis* a vysvětlují roli tohoto cytokinu v kontrole primárních infekcí. Studium lidských i myších makrofágů infikovaných vysoce virulentním kmenem *F. tularensis* SchuS4 byla potvrzena hypotéza, že $\text{INF-}\gamma$ sice ovlivňuje replikaci bakterie v cytosolu aktivovaných makrofágů, ale už méně zasahuje do fagozomálního úniku. Navíc bylo

zjištěno, že výskyt FCV u aktivovaných makrofágů je dramaticky snížen. Příčinou je zřejmě omezení proliferace bakterie v cytosolu, která ovlivňuje následující vznik FCV [53].

INF- γ je glykoprotein s pleiomorfními funkcemi, zapojující se do řady imunitních odpovědí. Ty jsou v konečném důsledku zprostředkovány heterodimerním povrchovým receptorem (INF- γ R), který aktivuje dráhy signální kaskády signálu a reguluje genovou expresi. Jeho produkce je zajištěna NK-buňkami a aktivovanými T-lymfocyty. Podporuje aktivaci makrofágů, reaguje svým vyplavováním jako odpověď na fagocytózu a následnou prezentaci antigenu skrz MHC buňky II. typu nebo kontroluje buněčnou proliferaci a apoptózu [54].

Přítomností *F. tularensis* v cytosolu makrofágů se do extracelulárního prostředí vylučuje INF- β . Okolní buňky jsou tak schopny rychleji zareagovat rozeznáním molekulárních struktur či „vzorů“, které jsou typické pro patogenní mikroorganismy (PAMPs z angl. Pathogen-Associated Molecular Pattern molecules) pyroptózou a nedochází tak masivnímu pomnožení patogena v dalších buňkách [51; 55].

1.4.5 Modifikace buněčné smrti hostitelské buňky

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt obecně slouží k eliminaci nepotřebných nebo poškozených buněk z organismu s absencí známek zánětu. V našem případě se jedná o odstranění buněk napadených virovou či bakteriální infekcí. Modifikace aktivace kaspáz a jaderných endonukleáz slouží jako účinný nástroj intracelulárních bakterií pro přežití v hostitelské buňce. *F. tularensis* vyvolává apoptózu skrz aktivaci proteáz - kaspázy-1 a kaspázy-3 a její únik do cytosolu je nezbytný k aktivaci translokace antiapoptického nukleárního transkripčního faktoru B (NF- κ B) [56].

Na aktivaci kaspázy-1 je závislá pyroptóza (typ apoptózy), ale definuje se jako prozánětlivá programovaná buněčná smrt. K aktivaci této kaspázy-1 dochází v inflamazomu (multiproteinový komplex v cytosolu hostitelské buňky). Kaspáza-1 reaguje na NOD-like receptory v cytosolu, které rozeznávají přítomnost PAMPs v inflamazomu. Následuje vytvoření pórů v membráně, vypuštění aktivovaných prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18, aktivují se další substráty či kaspázy, což vede k udržení a zesílení zánětu [56; 57].

V důsledku aktivace apoptotických kaspáz je vyplavován i cytochrom c, nacházející se v mitochondriích, který se zapojuje do aktivace apoptotických drah – aktivuje pro-kaspázu 9 na kaspázu-3 a z těchto uvedených proteinů vzniká velký komplex apoptozom. *F. tularensis* je

tedy schopna v buňce vyvolat buněčnou smrt se znaky apoptózy (poškození mitochondrií a aktivace kaspáz, kondenzace jádra a fragmentace DNA). Napadá tak další buňky (i nefagocytující) a dostává se volně do extracelulárního prostoru [58].

1.4.6 Vrozená imunita

Vrozená imunita urychleně reaguje svojí humorální složkou (komplementový systém, interferony, proteiny v séru) a buněčnou složkou (fagocytující či cytotoxické buňky) na přítomnost nejrůznějších patogenů a rozeznává je podle struktur a složek, které mají vzájemně identické [59].

Makrofágy představují důležitou obranu ze složek vrozené imunity proti *F. tularensis*, jakožto intracelulární bakterii, a zároveň vědcům slouží jako nejrozšířenější dostupný model pro výzkum patogeneze infekce této bakterie. Mimo makrofágy byla v experimentech prokázána schopnost replikace i uvnitř dendritických buněk, hepatocytů, neutrofilů a alveolárních epiteliálních buněk typu II. Jak již bylo zmíněno výše, pro bakterii je typický fagozomální únik, množení se v cytosolu hostitelské buňky a pozdější rozsáhlá migrace do mimobuněčného prostoru a s tím spojené infikování dalších buněk. Proto, aby měla *Francisella* dostatek aminokyselin se stává závislou na hostitelských buňkách (makrofázích), ve kterých patřičnými mechanismy spustí autofagii jejích buněčných organel, protože tyto stavební kameny není schopna sama nasyntetizovat *de novo* [60; 61].

Posléze makrofágy podléhají buněčné smrti. To v závislosti na aktivaci kaspázy-1 i kaspázy-3 inflamazomem a uspíšené translokaci cytosolického NF- κ B do jádra k indukci anti-apoptotických genů, stejně jako uvolnění IL-1 β a IL-18 mimo buněčný prostor, jako odpověď na přítomnost *F. tularensis* v cytosolu. Zmíněné cytokiny jsou později důležité pro aktivaci adaptivní imunity prostřednictvím Th1 a Th17 [62]. Je důležité poznamenat, že testováním infekce na myších se prokázalo, že cytokiny začnou být detekovatelné až po 48-72 hodinách od infekce. Z hlediska vrozené imunity se do boje proti bakterii zapojuje NK buňkami produkováný antimikrobiální INF- γ , dále TNF- α , IL-12. Bylo prokázáno, že podáním rekombinantního IL-12 ihned po infekci, který funguje jako silný stimul pro produkci INF- γ k aktivaci makrofágů, se zaznamenala snížená bakteriální zátěž a zvýšené přežití buněk [62].

V další studii byla dokázána účinná inhibice růstu *F. tularensis* podáním INF- γ *ex vivo* infikovaným makrofágům. Aktivované makrofágy následně účinněji produkují enzymy pro tvorbu oxidu dusnatého pro boj s intracelulárními patogeny a pro zmírnění infekce [62].

V boji proti infekci způsobené *F. tularensis* hrají další roli i buňky přirozené imunity - neutrofilů, využívající toxické ROS a různé degradační enzymy. V širokém repertoáru mechanismů dovolujícím neutrofilům zneškodnit přítomného patogena, hraje důležitou roli i aktivace NADPH-oxidázy v membráně fagolysosomu. Enzym katalyzuje přeměnu molekulárního kyslíku na superoxidové ionty, které se pomocí superoxid-dismutázy přeměňují na peroxid vodíku a další toxické produkty. I s tímto poměrně složitým mechanismem si *Francisella* umí poradit ve svůj prospěch. Neutrofilů jí poskytují bezpečné, či dokonce ideální replikační místo. Je schopna inhibovat NADPH-oxidázu a s tím spojenou produkci ROS, uniknout z fagozomu a persistovat v cytosolu neutrofilů [59; 62; 63]. K časnému přežití infekce je nezbytné, aby neutrofilů produkovaly nezbytné cytokiny či chemokiny, které by podpořily migraci důležitých efektorových buněk do místa infekce [62].

1.4.7 Získaná imunita

Správné pochopení mechanismů specifické imunity je předpokladem pro návrh úspěšné vakcíny nejen proti tularémii. K její aktivaci je třeba spolupráce s nespecifickou (vrozenou imunitou) a až poté může dojít k aktivaci a klonální expanzi antigen specifických buněk (T- a B-lymfocytů). *Francisella* si vyvinula mechanismy, kterými potlačuje produkci cytokinů buňkami nespecifické imunity, jež by aktivovaly specifické T a B lymfocyty. Jedná se např. o omezení exprese genů vyvolané produkcí INF- γ a potlačení prezentace antigenů na antigen prezentujících buňkách (APC z angl. Antigen Presenting Cells). Komplikací pro eliminaci z organismu je i intracelulární parazitismus bakterie kvůli nepřístupnosti B-lymfocytárních produkovaných protilátek. Jejich hladina tak často nekoreluje s běžnou antiinfekční ochranou [59; 62].

T-lymfocyty rekonvalescentních myší produkují cytokiny INF- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 či 22, jako odpověď na přirozenou infekci. V dalších experimentech se plánuje výzkum cytokinů na zvířecích modelech s cílem objasnit jejich roli v obranné odpovědi vůči *F. tularensis* [64].

Do kontroly infekce se významně zapojují CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocyty. Lze očekávat, že se do boje proti infekci významněji zapojují CD4⁺ T-lymfocyty, které mají schopnost rozeznat exogenní antigeny zprostředkované skrz mononukleární fagocyty. Spojením antigen prezentující buňky (APC), jež na svém povrchu exprimuje MHC II. typu s Th1 lymfocitem, je zahájena produkce INF- γ a následná aktivace makrofágů [62; 64].

1.5 Laboratorní diagnostika *F. tularensis* a průkaz tularémie

K průkazu této intracelulární bakterie se využívá kombinace různých technik. Od vhodně zvolené metody detekce se odvíjí výsledek a průběh onemocnění a včasné nasazení antibiotické terapie. Mezi klasické testy průkazu *F. tularensis* v biologickém materiálu lze zařadit **kultivaci**. Tato metoda průkazu je časově velmi náročná a vyžaduje šetrnou laboratorní práci s tímto infekčním agens kvůli vysokému riziku inhalační infekce. K růstu vyžaduje obohacená média. Běžně se využívá tzv. CHAB agar (čokoládový krevní agar obohacený o cystein) a v termostatu na něm roste bakterie optimálně při 37 °C. Mimo tento agar se dá užít i neselektivní agarový extrakt s aktivním uhlím, který také podporuje růst. Pokyny vydané Světovou zdravotnickou organizací (WHO z angl. World Health Organization) doporučují kromě CHAB agaru kultivaci *F. tularensis* i na čokoládovém agaru, ovčím krevním agaru či na Thayer-Martin agaru. Je-li kultura obohacená o cystein, obvykle jsou viditelné kolonie během 18-24 hodin. Při běžné kultivaci se doba prodlužuje na 2-4 dny. Na CHAB agaru rostou 2-4 mm velké kolonie, zeleno-bílé barvy, hladké a lehce mukózní. V médiích s krví je okolo kolonií malá zóna α -hemolýzy. Na pomnožení je možnost využití Müeller-Hintonova bujónu. Pro vědecké účely se nejčastěji využívá Chamberlainovo médium [65; 66].

Rutinním zavedeným přístupem je detekce **lipopolysacharidu (LPS)** pomocí enzymové imunoanalýzy, tj. ELISA testu (z angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) v séru pro průkaz tularémie. K testování se využívají monoklonální protilátky proti LPS *F. tularensis*. Díky využití monoklonální protilátky se vyšetření stává specifitější než **sérologická detekce protilátek**. Ty totiž nejsou v krvi přítomny do 2 týdnů i déle po infekci, což diagnostiku značně komplikuje a hrozí riziko i zkřížené reaktivity protilátek s jinými organismy (např. *Brucella*, *Proteus* a *Yersinia* subsp.). Běžně se kontroluje hladina IgM, IgA a IgG [66; 67; 68].

Další zajímavé metody, které lze využít k diagnostice jsou **imunohistochemické testy**, **fluorescenční mikroskopie** či **imunoelektronová mikroskopie**. Jejich užití je limitující z hlediska omezené dostupnosti, časové náročnosti a nízké reprodukovatelnosti [65].

Žádný z dostupných testů nenahradí testování genomové DNA klasickou **PCR reakcí**. K identifikaci *F. tularensis* se využívají speciálně navržené primery, které nasedají na specifické úseky DNA (*tul4* a *fopA*), které kódují membránové proteiny. Oproti kultivaci je test rychlý a velmi specifický a prioritně se využívá pro identifikaci organismů, které jsou špatně či dlouho kultivovatelné [69].

Jedna z novějších technik - **PCR na čerstvých histologických řezech**, se zdá být velmi senzitivním a specifickým diagnostickým testem. Vědci byl vyvinut PCR test, který umožňuje detekci infekčního agens již ve formalinu zpracované zvířecí či lidské tkáni (nejčastěji v lymfatických uzlinách, či rozříznutém vředu). Tato metoda si proto získala příznivce zejména u personálu, který přijde do styku s infekčním biologickým materiálem z hlediska vyšší bezpečnosti manipulace [65]. Kromě tkáně jako biologického materiálu se dá v jiných metodách využít i sputum, záleží na klinickém stádiu onemocnění. Málokdy se vyšetření rutinně provádí ze vzorku krve pacienta [66].

S postupným rozvojem molekulárně-biologických metod se bakteriální populace začaly testovat sekvenačními technikami. Analýzou primární sekvence konzervativní ribozomální podjednotky se některé neznámé druhy bakterií daly taxonomicky zařadit podle čeledi, či dokonce druhu. Např. *F. tularensis* a *F. philomiragia* mají z 98 % geneticky identickou **16S ribozomální podjednotku** [70].

1.6 Tularémie - epidemiologie

Tularémie je akutní horečnaté onemocnění. Řadí se mezi zoonózy a je způsobené intracelulární bakterií *F. tularensis*. Z epidemiologického hlediska je její výskyt soustředěn do severní polokoule Země, nejfrekventovaněji ve Skandinávii, Severní Americe (Kanada, USA, Mexiko), Japonsku a v Rusku. Toto onemocnění, které napadá nejen zvířata, ale i člověka, bylo hlášeno mj. i v zemi bývalé Jugoslávie, dále z Turecka, Španělska, Kosova či Švýcarska. Dá se říct, že se jedná o poměrně rozšířené infekční onemocnění (Obr. 8) [71; 72].



Obr. 8 - Endemické oblasti výskytu *F. tularensis* (šedě) [66].

Incidence této nákazy nepodléhá Světové zdravotnické organizaci. Z tohoto důvodu jsou špatně dohledatelná jakákoli data nemocných v celosvětovém měřítku. V rámci již v minulosti proběhlých studií se nashromáždily a zpracovaly hlášené případy onemocnění: ve Švédsku v letech 1973 - 1985 více než 500 případů [73], v Japonsku na severovýchodě bylo nahlášeno 1335 případů v období 1924 - 1987 [74]. Zaznamenaly se i případy v Turecku, kde počet nakažených v letech 1988 - 1998 přesáhl 205 případů [75], zatímco na Slovensku v období 1985 - 1994 bylo nahlášeno 126 případů [76]. Dá se předpokládat s ohledem na nespecifické symptomy, které provází onemocnění a z dat dostupných pouze z konce 20. století, že tyto informace jsou nedostatečné a mnoho případů nebylo včas či dobře diagnostikováno [66].

1.6.1 Klinické formy nákazy

Tularémie se manifestuje různými klinickými formami po inkubační době, obvykle po 3-6 dnech, nespecifickými symptomy - horečkou, bolestmi hlavy, zimnicí, nevolností či bolestmi v krku [77].

Mezi nejčastější klinický projev se považuje **ulceroglandulární forma** onemocnění, záleží také v menší míře na místě vstupu bakterie do těla hostitele (člověka). Tato forma nákazy je způsobena členovcem, který nejprve parazitoval na nakaženém zvířeti, poté dojde k přenosu onemocnění kousnutím. Člověk začne mít po 3-6 dnech výše popsané nespecifické příznaky a mimo to se v místě vstupu infekce vytvoří vřed, obvykle na dolních končetinách (pokud je

vektorem klišťě). Z vředu se poměrně snadno začnou bakterie šířit lymfatickým systémem do regionálních uzlin, které se pod nápoem bakterií začnou zvětšovat, či se stávají otevřeným vředem. Nejen, že posléze dochází k rozsevu do ostatních tkání (slezina, játra, plíce, centrální nervový systém), ale tato forma otevřeného vředu se i špatně hojí (i roky). Ulceroglandulární forma je málokdy fatální pro pacienta, přitěží se stává dlouhá doba rekonvalescence po prodělané infekci [66].

Mezi vzácnou variantu ulceroglandulární formy nákazy se řadí **okuloglandulární forma** onemocnění. Místem vstupu infekce je v tomto případě spojivka, v důsledku přenosu bakterií skrz špičky prstů. Projevuje se vředy na spojivce, otoky očních víček, hnisavými výtoky a bez nasazení vhodné léčby se infekce šíří do lokálních lymfatických uzlin [66; 78].

Požítím infikované vody, či potravin se manifestuje **orofaringeální** nebo **gastrointestinální forma** tularémie. První popisovaná forma se projevuje atypickou bolestí v krku se zvětšenými mandlemi, tvorbou žluto-bílé pseudomembrány s oteklými krčními lymfatickými uzlinami. Závažnost gastrointestinální formy nemoci se odvíjí od infekční dávky. U pacienta se mohou objevit akutní nebo dlouhotrvající průjmy, které se zvrhnou v akutní smrtelné onemocnění z důvodu rozsáhlé ulcerace střeva [66].

Mezi nejzávažnější a nejobávanější formu, spojenou s inhalací bakterií (závažné je vdechnutí i méně než 10 CFU, nad 10 CFU je již identifikována vysoká mortalita), se považuje tzv. **plicní forma**. Často se vyskytuje jako komplikace předchozích popsaných forem tularémie s příznaky pneumonie nebo se nákaza projeví po vdechnutí biologického aerosolu v souvislosti s teroristickým zneužitím [79]. Diagnostika je považována za obtížnou, rentgenové obrazy plic se ukazují jako velice variabilní a mnohdy u pacientů chybí i příznaky pneumonie. Případy výskytu této formy se spojují s manipulací se senem, se kterým je spojené vysoké generování prachu, eventuálně v něm mohli pobývat nakažení hlodavci, a pacientům následně začaly komplikovat stav prudké záchvaty kašle [66; 78].

Závažnost onemocnění se odvíjí od místa vstupu infekce, od infekční dávky a subtypu *F. tularensis*, který vyvolal onemocnění. Nákaze *F. tularensis* subsp. *tularensis* podlehne 60 % pacientů, v případě nasazení antibiotik úmrtnost klesá pod 10 %. Kdežto u subtypu *F. tularensis* subsp. *holarctica* umírá 1-10 % nakažených a díky včasné medikaci je mortalita téměř nulová [66; 79].

1.6.2 Léčba tularémie

V současné době neexistuje účinná a bezpečná vakcína jako možná prevence proti nákaze. Pouze některé skupiny antibiotik se zdají být efektivní v léčbě tularémie, a lze je použít jako profylaxe po expozici *F. tularensis* [80]. Jsou jimi aminoglykosidová antibiotika (streptomycin a gentamicin) jako léky první volby, dále fluorochinolony (moxifloxacin, gatifloxacin, trovafloxacin) a tetracykliny (např. doxycyklin). Ciprofloxacin (patřící mezi fluorochinolony) se testoval *in vitro* u myši nakažených kmenem SchuS4 [81]. Toto antibiotikum se v současné době nedoporučuje kvůli vzniku bakteriální rezistence. [66].

Vědci usilují o vývoj nových strategických terapeutických postupů, které zahrnují nejen vývoj nových antibiotik nebo nový způsob kombinace stávajících antibiotik. Usiluje se o snížení virulence *F. tularensis* či zlepšení vrozené (prostřednictvím TLR receptoru) i adaptivní imunitní odpovědi hostitele na infekci [80]. Je to zejména z toho důvodu, že většinou antibiotika užívaná jako možnost první volby jsou velmi toxická, zejména pro děti nebo kojící ženy, ale jsou zároveň baktericidní. Použití tetracyklinových antibiotik (bakteriostatická antibiotika) jako léčebného prostředku s sebou nese riziko relapsu infekce [80].

Studována je i role specifických protilátek v boji proti infekci. Velkou podporu měla tato terapie před objevením antibiotické možnosti léčby. Ukázalo se, že specifické protilátky přispívají k ochraně proti infekci svými profylaktickými i terapeutickými účinky [82]. Imunní séra s vysokým titrem anti-MPF IgM a IgG (z angl. Membrane Protein Fraction of *F. tularensis* SchuS4) se zdají být s velkou pravděpodobností účinná v kombinaci s antibiotiky k získání rychlejší reakce imunitního systému [80].

1.6.3 Vakcinační terapie

Poslední dobou vzrostl zájem o navrhování vakcín proti *F. tularensis* z důvodu její snadné využitelnosti k bioteroristickým a vojenským útokům.

Výzkum pro tvorbu vakcíny započal již ve dvacátých a třicátých letech 20. století vývojem živé celobuněčné vakcíny Foshay (pojmenovanou podle vědce, který vakcínu připravil). Touto vakcínou bylo imunizováno několik lidí v USA. Ochrana selhala po dávce 740 CFU vysokovirulentního kmene *F. tularensis* SchuS4. Z toho důvodu práce na tomto typu vakcíny byla ukončena se závěrem, že vyvolává nízký stupeň ochrany při testování na zvířatech a imunizací lidí došlo pouze ke snížení počtu nakažených a změně průběhu nemoci [83].

Později v 50. letech se opakovaným pasážováním podařilo vyvinout živý vakcinační kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* (LVS z angl. Live Vaccine Strain). Tento oslabený kmen se dá potenciálně využít jako vakcína proti plicní formě tularémie inhalačním podáním. Poprvé byl podán laboratorním pracovníkům amerického armádního lékařského výzkumného ústavu infekčních chorob (U. S. Army Medical Research Institute of Infection Diseases), u kterých sice došlo k poklesu laboratorní tularémie, ale u všech vakcinovaných jedinců nedošlo ke stejné reakci, na podanou dávku je tedy odlišná imunogenita [84]. Tento mutantní kmen nemá schválenou licenci, protože doposud není znám mechanismus oslabení a existuje možnost, že by se kmen mohl stát opět virulentním. Jakožto dostupnou očkovací látku, ji lze podávat pouze u rizikových skupin pacientů. I přesto se konstrukt tohoto kmene považuje za úspěšný a vědce posouvá v jejich další činnosti [85].

Díky plné dostupnosti genomu *F. tularensis* se mohou identifikovat vhodné virulentní geny pro inaktivaci a geny nezbytné pro intracelulární parazitismus *F. tularensis*. Problém nastává v predikci stupně zeslabení těchto genů, protože nedostatečné zeslabení má za následek prudkou remisi onemocnění. Naopak nadbytečné utlumení těchto genů vyvolává zkrácené přežívání bakterie *in vivo* a dochází k nedostatečné imunitní odpovědi na přítomnost patogena. V jedné vědecké práci byl z kmene LVS vytvořen deleční mutant $\Delta purMCD$ [86], další vědecké práce se zacílily na další klíčové geny virulence. Celkový fenotyp sestaveného mutantu je závislý nejenom na cílovém genu, ale i na bakteriálním poddruhu. Např. delece v genu *iglC* v FPI vyvolala defekt v intracelulárním růstu u kmene LVS, zatímco u kmene SchuS4 pouze nedošlo k vyvolání imunitní odpovědi [87]. I z tohoto důvodu se vědci snaží utlumovat další geny (*pdpB*, *dsbB*, *fumA*, *carB*, FTT_0742), aby se vytvořil vhodný kandidát na výrobu vakcíny [85].

S nástupem genového inženýrství vyvstala i možnost zkonstruovat DNA vakcínu. Ta by poskytovala mnohé výhody - relativně levná příprava ve srovnání s jinými vakcínami ať na bázi celých buněk či proteinů a rovněž efektivnější skladování (lze skladovat i při pokojové teplotě). DNA vakcína by také poskytovala nejen protilátkami zprostředkovanou imunitu, ale i buněčnou imunitu, která je klíčová pro ochranu před *F. tularensis*. I přes zde vyjmenované a další výhody je tvorba této vakcíny náročná a limitující. Příkladem je výsledek studie, ve které DNA vakcína obsahovala identifikované epitopy CD8⁺ T-lymfocytů dříve infikovaných lidí, které sice naindukovaly silnou imunitní odpověď CD8⁺ T-lymfocytů, ale CD4⁺ odpověď byla značně omezená [88; 89].

1.6.4 *F. tularensis* jako nástroj pro bioteroristické zneužití

V letech 1932 - 1945, kdy probíhala čínsko-japonská válka, se úmyslně vyvolávala u lidí tularémie pro potřeby výzkumu. O rok později, v roce 1946, v bývalém Sovětském svazu a USA, dokonce existovaly programy pro vývoj biologických zbraní obsahující *F. tularensis*. V roce 1969 americký prezident Richard Nixon oznámil zrušení programu o amerických biologických zbraních a k potvrzení oznámení podepsal v roce 1972 Úmluvu o zákazu vývoje, výroby a skladování biologických zbraní a toxinů i jejich ničení. Nicméně do této doby není pořád jasné, zda-li se i další země nezapojily do vývoje zbraně obsahující tento patogen. Bohužel program měl pokračování v Sovětském svazu do 90. let. Během té doby došlo k vývoji kmenů *F. tularensis*, které byly antibioticky rezistentními nebo byly k dispozici kmeny, které vyvolávaly onemocnění i u očkovaných jedinců [90].

Potenciál využití *F. tularensis* jako biologické zbraně byl uznán i WHO před rokem 1970. Byl vytvořen scénář útoku vzdušnou cestou a chování bakterie při úniku do vzduchu. Vědci a lékařští pracovníci se shodli, že infekčnost *F. tularensis* je srovnatelná s infekcí *M. tuberculosis* (původcem plicní tuberkulózy), kdy k infekci vnímavé osoby postačí pouze 10 CFU. Zato k propuknutí antraxu způsobené *B. anthracis* je třeba k inhalaci 8 000 - 50 000 spór, takže *Francisella* je mnohem nebezpečnější [23; 90].

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo:

1. Připravit konstrukt/y nesoucí sekveci kódující fúzní protein (část HU proteinu fúzovaná s epitopem umožňujícím imunodetekci či purifikaci).
2. Vytvořit mutantní kmen odvozený od *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200, který bude fúzní protein exprimovat.
3. Určit lokalizaci fúzního proteinu v rámci bakteriální buňky.
4. Pokusit se nalézt fúzní protein v hostitelských buňkách po infekci připraveným mutantním kmenem.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použitý materiál

BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- *E. coli* TOP10 firma InvitrogenTM; Kalifornie, USA; katalogové číslo (k. č.) 45-0030 (*F⁻mcrAΔ(mmr-hsdRMS-mcrBC)Φ80lacZΔM15ΔlacX74recA1araD139Δ(ara-leu)7697galUgalKrrpsL(Str^R)endA1nupGλ-*)
- *E. coli* XL-1 Blue firma Agilent Technologies; Kalifornie; USA; k. č. 200249 (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIq ZΔM15 tn10 (Tet^R)*)
- *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 (izolát kmene; *Francisella* Strain Collection (FSC) of the Swedish Defense Research Agency; Umeå; Švédsko)
 - Deleční kmen *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200/ΔHU (připravený konstrukt FVZ UO)
 - *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200/HU_HA (připravený konstrukt FVZ UO)
 - *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200/HU_NLS_HA (konstrukt připravený v rámci této práce)
 - *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200/HU_NLS_HIS (konstrukt připravený v rámci této práce)
 - *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200/HU_NLS_GFP (konstrukt připravený v rámci této práce)
- Laboratorní inbrední myši firma Velaz s. r. o.; Praha, Česká republika; kmen BALB/c; k. č. 028; haplotyp H2d

S těmito kmeny se pracovalo v laboratořích určených pro práci s GMO (s geneticky modifikovanými organismy) se stupněm biologického rizika kategorie BSL-2 (z angl. BioSafety Level-2) a byl kladen důraz na dodržování správné laboratorní praxe.

ANTIBIOTIKA

Tab. č. 1 - Použitá antibiotika při experimentech.

název antibiotika	výrobce
Kanamycin sulfát	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri; USA k. č. 70560-51-9
Gentamicin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri; USA k. č. 1405-41-0
Penicilin (10 000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma- Aldrich [®] ; Missouri; USA k. č. P0781

VEKTORY

pCR[®]4.0_TOPO; firma Invitrogen[™]; Kalifornie, USA; klonovací vektor; pUC *ori*, *P_{lac}*, *lacZ*, Kan^R, Amp^R;

pKK_289_Km_GFP; *E. coli* / *F. tularensis* shuttle vektor, Ft *ori*, p15a *ori*, Km^R, groES promotor [91];

pKK_289_Km_HU_NLS_GFP; tato práce;

pKK_289_Km_HU_NLS_HA; tato práce;

pKK_289_Km_HU_NLS_HIS; tato práce.

ENZYMY MODIFIKUJÍCÍ NUKLEOVÉ KYSELINY

▪ POLYMERÁZY

Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer; firma New England BioLabs[®] Inc.; Massachusetts, USA k. č. M0273S

OneTaq[®] Quick-Load[®] 2X Master Mix with Standard Buffer; firma New England BioLabs[®] Inc.; Massachusetts, USA; k. č. M0486S

PfuUltra II High-Fidelity DNA Polymerase; Agilent Technologies; Kalifornie; USA; k. č. 600380

▪ LIGÁZY

Quick Ligase; firma New England Biolabs[®] Inc.; Massachusetts, USA; k. č. M220 0L

▪ **RESTRIKČNÍ ENZYMY**

Restrikční endonukleáza *AseI*; firma New England Biolabs® *Inc.*; Massachusetts; USA
k. č. R0526S

Restrikční endonukleáza *NdeI*; firma New England Biolabs® *Inc.*; Massachusetts;
USA; k. č. R0111S

Restrikční endonukleáza *SacI*; firma New England Biolabs® *Inc.*; Massachusetts; USA
k. č. R3156L

▪ **NUKLEÁZY**

Benzonase® Nuclease; firma Sigma-Aldrich®; Missouri; USA; k. č. E1014-25KU

OLIGONUKLEOTIDY byly dodány od firmy Generi Biotech s.r.o.; Hradec Králové; Česká republika; lyofilizát jsme resuspendovaly v destilované vodě dle pokynu výrobce a připravily zásobní roztoky - v našem případě 0,1 mM. Nezbytné pro další práci je si zásobní roztok 10x naředit (10 µl 0,1 mM primeru + 90 µl destilované vody).

HU_NLS (*AseI*)_Fw; k. č. 1684S4; **primer A**

T_m

5'- ACA ATT AAT ATG ATA GCT AAA GAA GCA GAT GTT AC-3' 62 °C

HU_NLS_Rev; k. č. 1684S5; **primer B**

5'- TCT CCC TTA CTA TTT TTT AAA GCT TTA GTT ACT GC-3' 60 °C

GFP_Fw; k. č. 1684S6; **primer C**

5'- AAG CTT TAA AAA ATA GTA AGG GAG AAG AAC TTT TCA-3' 60 °C

GFP_(*SacI*)_Rev; k. č. 1684S7; **primer D**

5'- ACA GAG CTC ATC CAT GCC ATG TG- 3' 60 °C

HU_NLS_(*SacI*)_HIS; k. č. 1840H6

5'- GAG CTC TCA GTG GTG GTG GTG GTG ATT TTT TAA AGC TTT AGT TAC
TG-3' 56 °C

HU_NLS_HA_(*SacI*)_Rev; k. č. 1773R6

5'- GAG CTC TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA ATT TTT TAA AGC
TTT AGT TAC TGC-3' 60 °C

pKK_R3; k. č. 1846C7

5' - GTA TTC ACT CCA GAG CGA TGA - 3' 62 °C

CHEMIKÁLIE

Název	Firma; sídlo; stát
1,4-bis (acryloyl)piperazin, PDA	Fluka; Bucharest; Rumunsko
Agaróza (PCR agarose)	Bio-Rad; Kalifornie; USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich [®] , Missouri; USA
APS (persíran sodný)	Bio-Rad, Kalifornie; USA
Bacto agar	Difco; Oxford; Velká Británie
β-merkapt ethanol	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
BBL [™] Hemoglobin	Becton Dickinson; New Jersey; USA
BBL [™] IsoVitalex Enrichment	Becton Dickinson; New Jersey; USA
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad; Kalifornie, USA
BSA (100x) Purified	New England BioLabs [®] Inc.; Massachusetts; USA
Butan-2-ol	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri; USA
Bromfenonolová modř	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri; USA
10x CutSmart Buffer	New England BioLabs [®] Inc.; Massachusetts; USA
10x Standard <i>Taq</i> reaction Buffer	New England BioLabs [®] Inc.; Massachusetts; USA
10x <i>PfuUltra</i> II Reaction Buffer	Agilent Technologies; Kalifornie; USA.
2x Quick Ligase Reaction Buffer	New England BioLabs [®] Inc.; Massachusetts; USA
CaCl ₂	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
Calcium Panthotenate	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri; USA
Colloidal Blue Stain kit, CBB-G-250	Invitrogen [™] ; Kalifornie; USA
Complete, EDTA free inhibitory proteáz	Roche Diagnostics; Basilej; Švýcarsko
DAPI	Sigma-Aldrich [®] ; Missouri, USA

Diethyléter	Penta Laboratories, Kalifornie; USA
Difco™ GC Medium Base	Becton Dickinson; New Jersey; USA
DL- methionine	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
DL- proline	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
DL-serine	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
DL-threonine	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
DL-valine	Fluka; Bucharest; Rumunsko
DMEM médium/HighGlukose™	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
DMSO (dimethyl sulfoxide)	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
dNTP set, PCR Grade 100 mM	QIAGEN®; Hilden; Německo
Ethanol	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
FeSO ₄ ·7H ₂ O	ICN Biomedicals Inc.; Videaň; Rakousko
Fetal Bovine Serum Heat Inactivated (FBS)	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Gene Ruler 1kb DNA Ladder ready-to-use	Thermo Scientific; Massachussetts; USA
Glukóza	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
Glycin	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Glycerol	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
HyperLadder™ 25 bp	Bioline s.r.o.; Praha; Česká republika
Imidazol	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Isopropanol	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
KCl	Erba Lachema s.r.o.; Brno; Česká republika
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Kyselina octová	Penta Laboratories; Kalifornie; USA

L-arginine-HCl	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
L-aspartic acid	Sigma-Aldrich®; Missouri, USA
LB agar, Powder	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
L-conditioned medium (z L929 buněk)	ÚMP FVZ UO HK
L-cysteine-HCl	Fluka; Bucharest, Rumunsko
L-histidine-HCl	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
L-isoleucin	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
L-leucine	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
L-lysine-HCl	Sigma-Aldrich®; Missouri, USA
L-tyrosine	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Luria Growth medium	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Methanol	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
NaCl	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Na ₂ EDTA	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
NaSCN	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
NEBBuffer 4 (10x)	New England BioLabs® Inc.; Massachusetts; USA
Nonidet P40 (NP40)	Roche Diagnostics, Basilej; Švýcarsko
6x Orange DNA Loading Dye	New England BioLabs® Inc.; Massachusetts; USA
6x gel Loading Dye Purple, no SDS	New England BioLabs® Inc.; Massachusetts; USA
PBS	ÚMP FVZ UO HK
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
PDA	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
PIERCE™ SpinColumns Screw Cap (69705)	Thermo Scientific; Massachusetts; USA
Resolving Gel Buffer	Bio-Rad; Kalifornie; USA
Sacharóza	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
SDS (dodecylsírán sodný)	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA

SOC Outgrowth Medium	New England BioLabs® <i>Inc.</i> ; Massachusetts; USA
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain	Invitrogen™, Kalifornie; USA
SYBR Safe DNA Gel Stain	Invitrogen™; Kalifornie; USA
TAE buffer 50x	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
TBS	ÚMP FVZ UO HK
TBS-T 0,05%	ÚMP FVZ OU HK
TEMED (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)	Bio-Rad; Kalifornie; USA
Tris (hydroxymetyl)aminometan	Penta Laboratories; Kalifornie; USA
Thiamin-HCl 1,5 M Buffer pH 8,8	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Tris-HCl	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
Trypanová modř	Erba Lachema s.r.o.; Brno; Česká republika
Trypton	Oxoid s.r.o.; Brno; Česká republika
Tween 20	Sigma-Aldrich®; Missouri; USA
Yeast extract	Serva Electrophoresis; Heidelberg; Německo
50 bp DNA Ladder	New England BioLabs® <i>Inc.</i> ; Massachusetts; USA

KOMERČNÍ SOUPRAVY

BM Chemiluminiscence Blotting Substrate (POD)

Roche Diagnostics; Basilej; Švýcarsko

QIAquick® Gel Extraction Kit

QIAGEN®; Hilden; Německo

QIAprep® Spin Miniprep Kit

QIAGEN®; Hilden; Německo

Kalibrační roztoky pro metodu BCA; BSA o konc. 1 mg/ml

Sigma-Aldrich®; Missouri; USA

- Činidlo I metoda BCA (Bicinchoninic Acid solution)

- Činidlo II metoda BCA (Copper II sulfate solution)

Talon Metal Affinity Resin

Takara s.r.o.; Kalifornie; USA

TOPO[®] TA Cloning[®] Kit

Invitrogen[™]; Kalifornie; USA

Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit

Promega; Wisconsin; USA

PROTILÁTKY

Králičí imunní sérum proti *F. tularensis* (1:1000 v 3% BSA)

KMPB, FVZ UO HK

Alexa Fluor[™] 488 Goat anti-rabbit IgG

Invitrogen[™]; Kalifornie; USA; k. č. A11008

Alexa Fluor[™] 488 Goat anti-mouse IgG

Invitrogen[™]; Kalifornie, USA; k. č. A11029

Alexa Fluor[™] 594 DAM (Donkey anti-mouse)

Invitrogen[™]; Kalifornie; USA; k. č. R37115

AlexaFluor[™] 594 DAR (Donkey anti rabbit)

Invitrogen[™]; Kalifornie; USA; k. č. R37119

Anti-HA tag antibody (FITC)

Abcam[®]; Cambridge; Velká Británie; k. č. ab1208

Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-GFP

Abcam[®]; Cambridge; Velká Británie; k. č. ab183734

Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP

DacoCytomation; Glostrup; Dánsko; k. č. P0399

Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-HA Tag/HRP

Abcam[®]; Cambridge; Velká Británie; k. č. ab128131

Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-HA Tag

Abcam[®]; Cambridge; Velká Británie; k. č. ab9110

Monoclonal Mouse IgG1 anti-HIS Tag

QIAGEN[®]; Hilden; Německo; k. č. 34660

Polyclonal Goat Anti-mouse Immunoglobulin/HRP

DacoCytomation, Glostrup; Dánsko; k. č. P0447

PIERCE™ HA epitope TAG antibody agarose conjugate

Thermo Scientific; Massachusetts; USA; k. č. 26182

KULTIVAČNÍ PŮDY A MÉDIA

BMMs médium

- Složení:
 - DMEM médium/HighGlucose™; Sigma Aldrich®; Missouri; USA; k. č. SH300 22.01
 - Z tohoto média odebrat 100 ml a přidat 50 ml FBS a 50 ml média z L929 buněk
 - 10% FBS, Heat Inactivated; Sigma-Aldrich®, Missouri; USA; k. č. F4135
 - 10% médium z L929 buněk
 - 50 U/ml Penicilin + 50 µg/ml Streptomycin (jen pro první pasáž), zásobní roztok o koncentraci 10 000U/ml Penicilinu a 10 mg/ml Streptomycinu (Sigma-Aldrich®; Missouri; USA; k. č. P0781-100ml)

McLeod kultivační půda

- pracovní roztok č. 1 (1 l), složky povařit do rozpuštění a připravovat v den přípravy ploten
 - GC Medium Base (72 g)
 - Deionizovaná voda (1 l)
- Pracovní roztok č. 2 (1 l), složky smíchat a nechat bobtnat do druhého dne
 - Hemoglobin (20 g)
 - Deionizovaná voda (1 l)
- Oba roztoky po přípravě sterilizovat v autoklávu při 121 °C 20 minut Po ochlazení na 50 °C sterilně smíchat a přidat 20 ml IsoVitalexu™. V případě potřeby do půd přidat přídatné látky – v našem případě antibiotika. Půdy rozlít do Petriho misek a nechat ztuhnout, standardně pak uchovávat v lednici.

LB půda (Luria-Bertani)

- Složení:
 - 10 g Tryptone
 - 5 g Yeast extract

- 10 g NaCl
- Doplňit deionizovanou vodou do 1 l
- 1,5 g agaru/100 ml
- Složky navážit, dolít deionizovanou vodou a autoklávovat. Po sterilizaci je nutné agar ochladit ve vodní lázni na 50 °C a rozlít do Petriho misek.
- Sterilně dle potřeby přidávat před rozléváním např. kanamycin (50 µg/ml).
- Připravené pŕdy popsat na základě přidaného antibiotika a uchovávat v lednici.

Chamberlainovo médium

<i>Roztok 1</i>	% koncentrace	gramů na 2 litry
L-arginin-HCl	0,040	0,800
L-cystein-HCl	0,020	0,400
L-histidin-HCl	0,020	0,400
L-isoleucin	0,040	0,800
L-leucin	0,040	0,800
L-lysin-HCl	0,040	0,800
DL-prolin	0,200	4,000
DL-serin	0,040	0,800
DL-threonin	0,200	4,000
DL-valin	0,040	0,800
DL-methionin	0,040	0,800
<i>Roztok 2</i>		
Glukóza	0,400	8,000
<i>Roztok 3</i>		
NaCl	1,000	20,000
KH ₂ PO ₄	0,100	2,000
K ₂ HPO ₄	0,100	2,000
<i>Roztok 4</i>		
L-asparagová kyselina	0,040	0,800
L-tyrosin	0,040	0,800

Přídavné složky do roztoku 1

	% konc.	Navážit	ml vody	celkem 2 l média
Thiamin-HCl	0,0004	0,02 g	10	4 ml roztoku
Spermin tetrahydrochlorid	0,0040	0,08 g	10	10 ml roztoku
Pantothenát vápenatý	0,0002	0,01 g	10	4 ml roztoku

Přídavné složky do roztoku 2

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,0135	0,675 g	10	4 ml roztoku
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0002	0,01 g	10	4 ml roztoku

Postup

- Roztoky 1, 2, 3 a 4 rozpustit v 200 ml deionizované vody a k roztokům 1 a 2 přidat jejich přídavné složky.
- Do roztoku 4 postupně přidávat 3M NaOH (5-7 ml) do rozpuštění zákalu.
- Roztoky postupně smíchat v jeden za stálého míchání.
- U média upravit pomocí HCl pH na hodnotu 6,3 a objem doplnit deionizovanou vodou do 2 l.
- Směs před uskladněním filtrovat přes jednorázový filtr (s velikostí pórů 0,22 μm) do sterilních lahví a uskladnit v lednici.

PUFRY

PBS

- Složení:
 - 10mM Na₂HPO₄
 - 150 mM NaCl
 - 2 mM KCl
 - 2 mM KH₂PO₄
 - pH = 7,4

TBS

- Složení:
 - 50 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - pH 7,5

TBST-T 0,05%

- Složení:
 - 50 mM Tris
 - 150 mM NaCl
 - pH 7,5
 - 0,05% Tween

3.2 Aplikované metody

3.2.1 Kultivace bakterií *F. tularensis* a *E. coli*

Očkování bakteriálních kultur jsme prováděly v laminárním boxu (Safeflow 1.2 flowbox). Díky filtraci vzduchu pomocí speciálních HEPA filtrů se zamezuje jakékoli kontaminaci od částic či nežádoucích mikroorganismů.

Na počátku naší práce jsme kultivovaly bakterii *E. coli*. Tato fakultativně anaerobní Gram negativní tyčinkovitá bakterie roste na LB médiu (jeho příprava viz výše). Do média bylo třeba přidat antibiotikum kanamycin, jehož finální koncentrace byla 50 µg/ml. Používaný plazmidový vektor (pCR[®]_4.0_TOPO, pKK_289_Km_GFP) obsahuje k tomuto antibiotiku rezistenci.

Pro *F. tularensis* jsme zajistily optimální podmínky růstu na McLeodově agaru při 37 °C (v 5215-2 SHEL LAB CO₂ inkubátoru) nebo v chemicky definovaném Chamberlainově médiu při 37 °C a 200 rpm (v třepacím inkubátoru Infors AG CH-4103). V případě potřeby jsme do médií přidaly kanamycin o koncentraci 20 µg/ml. Pro přípravu kultur jsme použily připravené zmražené zásobní kultury.

3.2.2 Příprava zásobních zmražených kultur („štoků“) *E. coli* a *F. tularensis*

Bakteriální kultury je třeba uchovávat v zamražené formě (bakteriální konzervy, „štoky“). Zásobní kultury popsané skladujeme při -80 °C v mrazáku (SANYO V. I. P Series MDF-U32V), či v -150 °C v hlubokomrazícím boxu (SANYO MDF-C2156VAN) ve speciálních kryotubách.

Konzervy bakterií *E. coli* TOP10 a *E. coli* XL-1 Blue jsme připravily sterilním smícháním 0,5 ml bakteriální kultury (připravena předem viz kapitola 3.2.1) a 0,5 ml 60% glycerolu.

Konzervy *F. tularensis*, které ve svém genomu nesly požadovaný produkt (tzv. „pozitivní klony“), jsme připravily následovně: pozitivní klony jsme sterilně přeočkovaly na McLeodovu plotnu obohacenou o kanamycin a nechaly kultivovat do druhého dne při 37 °C. Následně jsme kulturu setřely jednorázovou plastovou bakteriologickou kličkou po celém obvodu Petriho misky a resuspendovaly v 10 ml fyziologického roztoku. Pro hrubou orientaci množství kolonií jsme změřily optickou denzitu na denzitometru. Suspenzi jsme následně centrifugovaly v chladicí centrifuze (Eppendorf centrifuge 5804R) při 4 °C a 6200 g 15 minut. Vzniklou peletu jsme promyly fyziologickým roztokem a opětovně centrifugovaly za identických podmínek. Peletu jsme resuspendovaly v zamrazovacím roztoku (5 ml fyziologického roztoku s 10% glycerolem) a suspenzi jsme rozdělily do kryotub po 250 µl a kryotuby uložily do hlubokomrazícího boxu. U zmražených bakteriálních kultur je vedená přísná evidence, zejména se klade důraz na zapsání přesné pozice stojanu a umístění bakteriální kultury.

3.2.3 Izolace chromozomální DNA

Izolace chromozomální DNA bakterie *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 jsme prováděly pomocí Wizard® Genomic DNA Purification Kitu. Samotná izolace DNA je postavena na následujícím principu – nejdříve buňky zlyzovat (uvolní se DNA), poté z roztoku vysrážet proteiny a přečistit chromozomální DNA.

Bakteriální kulturu jsme z McLeod plotny setřely kličkou do 2 ml PBS pufru. PBS pufr jsme připravily rozpuštěním 1 tablety (k. č. P4417) v 200 ml deionizované vody. Získanou suspenzi jsme centrifugovaly 2 minuty při 6000 g v centrifuze Eppendorf; MiniSpin plus. Supernatant jsme opatrně odpipetovaly a k peletě jsme přidaly 600 µl lyzačního roztoku Nuclei Lysis Solution a směs pečlivě resuspendovaly a inkubovaly 5 minut při 80 °C (termoblok GRANT).

Po inkubaci jsme k suspenzi přidaly 3 μ l RNase Solution Mixu a směs jsme inkubovaly při 37 °C 15-30 minut.

Po ochlazení na laboratorní teplotu, jsme ke vzorku přidaly 200 μ l Protein Solution a směs protřepaly (vortex IKA MS3 Digital). Pro efektivnost precipitace proteinů je výrobcem doporučena následná inkubace na ledu po dobu 5 minut. Proteiny jsme ze směsi odstranily centrifugací při 13 000 – 16 000 g po dobu 3 minut.

Následoval poslední a nejdůležitější krok celé izolace – precipitace chromozomální DNA a přečištění DNA. Supernatant získaný v předchozím kroku jsme pipetovaly do nové zkumavky a přidaly k němu izopropanol o objemu 600 μ l. Po promíchání následovala centrifugace 2 minuty při 6000 g. Peletu (DNA) jsme promyly 600 μ l 70% ethanolu. Po centrifugaci 2 minuty při 13 000 – 16 000 g jsme ethanol odstranily a zkumavku ponechaly asi 10-15 minut vyschnout. K izolované DNA jsme přidaly hydratační roztok v množství 100 μ l (Rehydration Solution) a inkubovaly 5 minut při 65 °C nebo přes noc při 4 °C. Čistotu a koncentraci výtěžku jsme si ověřily spektrofotometricky.

3.2.4 Izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA jsme využily komerční soupravy QIAprep[®] Spin Miniprep Kitu. Narostlou bakteriální kulturu s plazmidem jsme centrifugovaly 3 minuty při 17 000 g, (Heraeus PICO 21 Centrifuge, Thermo Scientific). Peletu jsme poté resuspendovaly v 250 μ l pufru s RNásou A, dokud směs nebyla homogenní. Následně jsme přidaly 250 μ l lyzačního pufru P₂. Po jemném promíchání jsme suspenzi ponechaly inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě (proběhla lýza). Po vysrážení proteinů jsme k lyzátu přidaly 350 μ l N₃ pufru a promíchaly do vzniku homogenní směsi. Zkumavku se suspenzí jsme centrifugovaly 10 minut při 17 000 g. Získaný supernatant jsme přenesly do speciálních Spin Column s filtrem, které jsou výrobcem umístěny do 2 ml zkumavek. Při následné centrifugaci 1 minutu při 17 000 g, se plazmidová DNA zachytila na filtr kolonky, a filtrát jsme odstranily. DNA jsme promyly 500 μ l PB pufru a následně 750 μ l PE pufru s ethanolem (17 000 g, 1 minutu). Pro kompletní odstranění zbytků ethanolu jsme centrifugaci zopakovaly.

Zkumavku s membránou jsme přenesly do nové 1,5 ml mikrozukmavky a doprostřed membrány jsme nanesly 50 μ l destilované vody. DNA jsme nechaly 1 minutu při pokojové teplotě rozpouštět a eluát jsme získaly centrifugací 1 minutu při 17 000 g.

Koncentraci získaného vodného roztoku plazmidové DNA jsme změřily spektrofotometricky. Pro ověření správnosti plazmidového vektoru jsme provedly dvojí kontrolu: kontrolní restrikcí s elektroforetickou separací a následně jsme plazmid nechaly sekvenovat na Středisku sekvenování, MBÚ, Praha.

3.2.5 Stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA

Stanovení čistoty a koncentrace izolované DNA se v molekulární biologii nejčastěji testuje spektrofotometrickými metodami. V našem případě jsme použily spektrofotometr UV-VIS IMPLÉN. Čistota DNA je stanovována z poměru hodnot absorbancí A260/A280. Vlnová délka 260 nm je zvolena díky velkému množství purinových zbytků a čistá DNA proto absorbuje světlo při této vlnové délce. Problém nastává, jestliže je vzorek znečištěn bílkoviny, které při této vlnové délce rovněž absorbují světlo. Absorpční maximum bílkovin se pohybuje okolo 280 nm díky přítomnosti tyrosinových skupin. Čistý a kvalitní vzorek DNA má čistotu 1,8 -2,0, podle poměru absorbancí A260/A280. Čím je hodnota vyšší, tím je vzorek čistější.

Koncentrace DNA se měří proti blanku (roztok, který byl použit pro hydrataci DNA, velmi často čistá voda). Koncentraci DNA jsme měřily v ng/μl. Do analyzátoru jsme pro měření vložily nanokyvetu LabelGuard™ Microliter Cell, na níž byl nanesen vzorek o objemu 3 μl. Pokud jsou vzorky DNA zředěny, není spektrofotometrická metoda dostatečně citlivou metodou a k určení koncentrace se využívají metody založené na interkalačních fluorescenčních barvivech (např. přístroj Qubit, Thermo Scientific).

3.2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR; Polymerázová řetězová reakce)

Polymerázová řetězová reakce patří mezi, v současné době, hojně využívané metody napříč laboratorními obory, tedy nejen v oblasti molekulární biologie. Metoda se opírá o základní kroky. Nejdříve dochází k denaturaci dvouřetězcové molekuly DNA po dobu nejčastěji 20 – 30 sekund při teplotě 94 °C. Tato teplota zajistí rozrušení vodíkových můstků a vznik dvou jednořetězcových vláken, z nichž jedno slouží jako templát pro reakci.

DNA polymeráza potřebuje ke své správné funkci primery (krátké oligonukleotidy o 20 – 25 nukleotidech) komplementární k oblastem, od kterých syntéza začíná probíhat. Primery se označují jako forward a reverse primer. Ke správnému a specifickému nasednutí primerů (annealingu) předchází snížení teploty na 50 – 65 °C. Optimální teplota nasednutí primerů se

odvozuje z teploty tání nukleotidů v primeru ($T_m = 4 \times (GC) + 2 \times (AT)$) tak, že teplota tání je snížena o 5 °C.

Tato metoda pracuje na podobném principu jako při replikaci DNA *in vivo*. Reakci katalyzuje termostabilní DNA polymeráza (např. *Taq* polymeráza, *Pfu* polymeráza, a další), která nasedá na templátový jednovláknový řetězec a na základě komplementarity bazí podle této „předlohy“ syntetizuje druhý komplementární řetězec. Procesem elongace narůstá nový řetězec ve směru 5' → 3'. Teplota syntézy DNA se odvíjí od použité DNA polymerázy (např. u *Taq* polymerázy je optimum aktivity mezi 72 – 80 °C) a čas elongace se volí v závislosti podle délky amplifikovaného fragmentu.

Kroky reakce se cyklicky opakují po 30-ti cyklech, které jsou většinou dostačující k amplifikaci fragmentu podle původní molekuly DNA. K metodě PCR byl použit DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal Cycler, BioRad, který dokáže během několika sekund upravit teplotu o několik stupňů Celsia.

3.2.6.1 PCR na koloniích

Často užívanou variantou PCR v molekulární biologii je tzv. **PCR na koloniích**. Tato metoda slouží k ověření kolonií po předchozí transformaci. Templátová DNA byla z jednotlivých narostlých kolonií připravena odebráním části kolonie *E. coli* z plotny sterilním párátkem a jejím resuspendováním v 10 µl LB média. Totožnou špičkou rozčárkujeme kolonie na nový LB agar s kanamycinem o koncentraci 50 µg/ml a kultivujeme přes noc při 37 °C v inkubátoru.

Templát z kolonií *F. tularensis* jsme připravily obdobně. Jednotlivé kolonie jsme resuspendovaly v 10 µl destilované vody a povařily při 95 °C 10 minut (termoblok GRANT). Po 10 minutách jsme zkumavky krátce centrifugovaly. Jednotlivé kolonie *F. tularensis* jsme obdobně jako u *E. coli* rozočkovaly na novou McLeod plotnu s kanamycinem (20 µg/ml). Komponenty, průběh a podmínky PCR reakce jsou přehledně vypsány v Tab. č. 2 a v Tab. č. 3. K syntéze DNA byla použita *Taq* polymeráza, k. č. M0486S; New England Biolabs[®], Inc.

Tab. č. 2 - Komponenty reakce pro PCR reakci katalyzované *Taq* DNA polymerázou.

komponenty reakce	objem [μl]
One <i>Taq</i> [®] Quick-Load [®] 2X Master Mix with Standard Buffer	6,25
Primer Fw (primer A)	0,25
Primer Rv (primer D)	0,25
H ₂ O	5,25
DNA templát	0,5

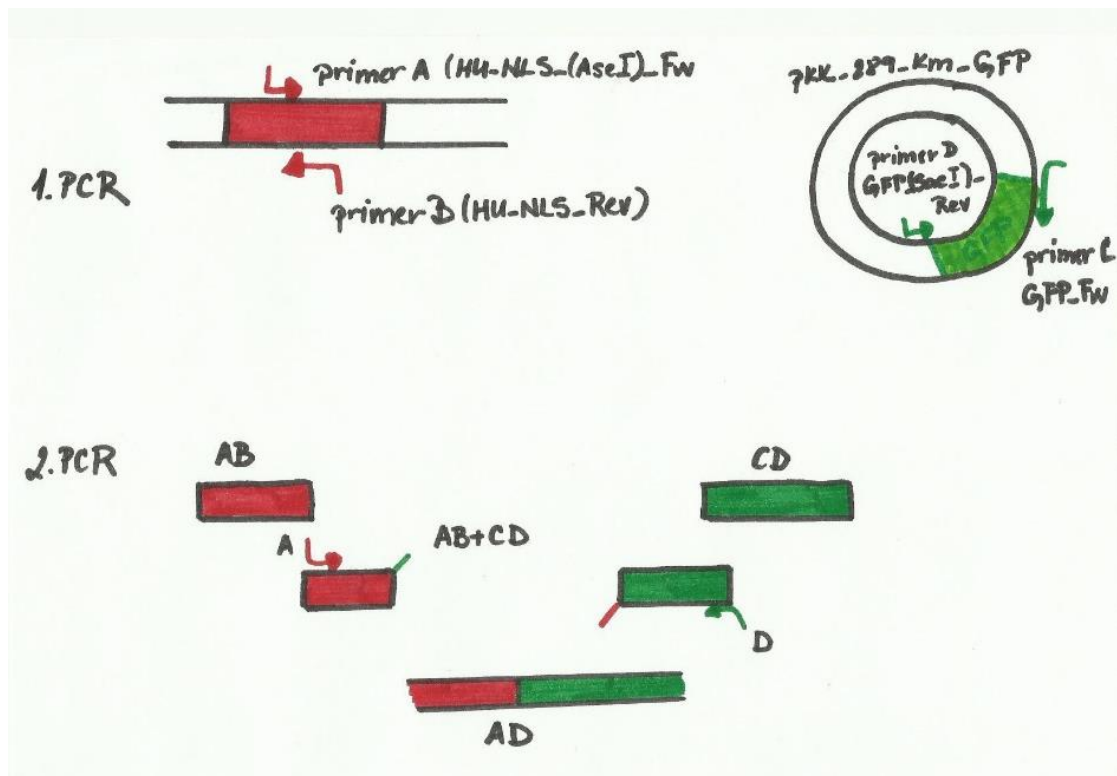
Tab. č. 3 - Podmínky reakce pro PCR reakci katalyzované One *Taq*[®] Quick-Load[®] DNA polymerázou.

jednotlivé kroky reakce	teplota [°C] / čas [s/min]
denaturace	94 °C / 30 s
denaturace	94 °C / 30 s
annealing	53 °C / 30 s
elongace	68 °C / 30 s
závěrečná elongace	68 °C / 3 min

30 cyklů

3.2.6.2 PCR s překrývajícími se konci

Tzv. „Overlap“ PCR je další z variant PCR metody. Primárně je používána pro delecí určité sekvence z DNA řetězce, nebo ke spojení několika (nejčastěji dvou) DNA fragmentů. Nejdříve jsou provedeny dvě samostatné PCR, v prvním kroku s primery A a B a poté s kombinací primerů C a D. Získané produkty reakce „AB“ a „CD“ jsou po přečištění použity v druhém kroku jako templát do tzv. „overlap“ PCR reakce s primery A a D. Během této reakce dojde pomocí překryvných sekvencí na 3' konci fragmentu „AB“ a 5' konci fragmentu „CD“ ke spojení DNA fragmentů do produktu „AD“ – pro snadnější pochopení viz Obr. 9.



Obr. 9 - Vznik "AD" fragmentu po „overlap“ PCR (vlastní zdroj).

Pro amplifikaci AB, CD a finálního AD fragmentu jsme použily *PfuUltra II* polymerázu (*PfuUltra II High Fidelity DNA polymerázu*), která se vyznačuje kromě polymerázové aktivity také 5' → 3' exonukleázovou aktivitou. Tato opravná (proofreadingová) aktivita umožňuje opravit chybně zařazené nukleotidy, a tím efektivně eliminovat chyby při čtení a replikaci templátu.

Komponenty reakce a podmínky pro amplifikaci pro první a druhý krok „overlap“ PCR jsou uvedeny níže, tj. v Tab. č. 4 a v Tab. č. 5.

Tab. č. 4 - Složení PCR reakce za využití *PfuUltra* II High Fidelity DNA polymerase pro amplifikaci AB a CD fragmentů.

komponenty reakce	objem [μl]	Komponenty reakce	objem [μl]
H ₂ O	19,75	Forward primer (A nebo C)	0,625
10 x <i>PfuUltra</i> II reaction buffer k. č. (200435; Agilent Technologies, Inc.)	2,5	Reverse primer (B nebo D)	0,625
10 mM dNTP mix	0,5	<i>PfuUltra</i> II High Fidelity DNA polymerase	0,5
DNA (chromozomální DNA <i>F. tularensis</i> FSC 200 nebo plazmidová DNA pKK_289_Km_GFP)	0,5		

Tab. č. 5 - Podmínky reakce pro PCR reakci katalyzované *PfuUltra* II High Fidelity DNA polymerázy

jednotlivé kroky reakce	teplota [°C] / čas [s/min]
denaturace	95 °C / 2 min
denaturace	95 °C / 20 s
annealing	50 °C / 20 s
elongace	72 °C / 30 s
závěrečná elongace	72 °C / 3 min

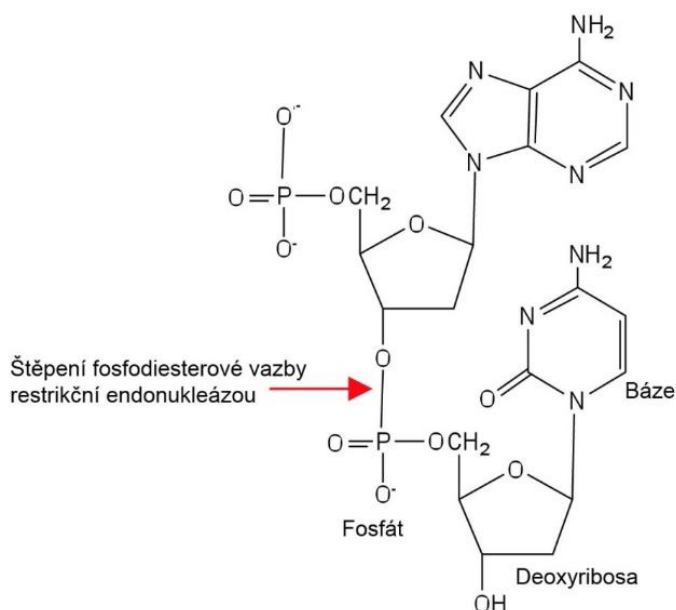
40 cyklů

V případě syntézy AD produktů slouží jako templát fragmenty AB a CD přidávané v ekvimolárním poměru a pro syntézu DNA jsme použily primery A a D.

3.2.7 Štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz

Restričním štěpením dochází k štěpení DNA díky bakteriálním restričním enzymům (restričním endonukleázám). Jejich aktivita je založena na hydrolyze fosfodiesterových vazeb na obou řetězcích dvouřetězcové DNA (viz Obr. 10).

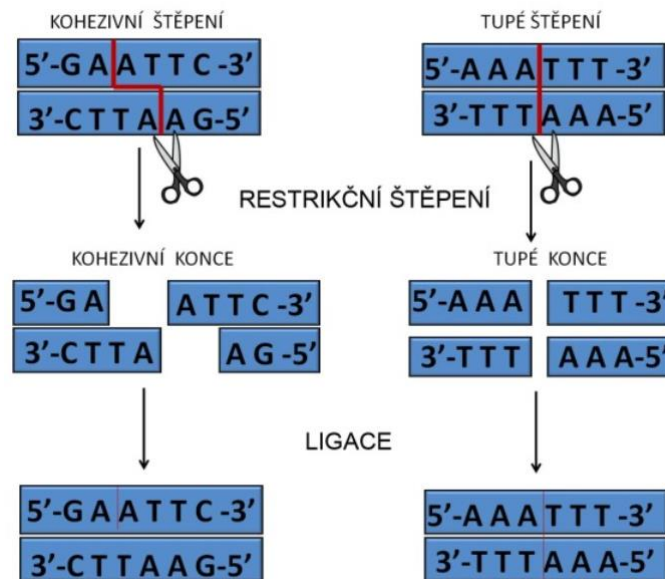
Restriktázy hrají podstatnou úlohu v defenzivě hostitelské buňky proti nežádoucím plazmidům či virům. Hostitelská DNA je proti těmto enzymům chráněna pomocí metyltransferázy, která metylací brání restrikcii, kdežto cizorodá DNA těmito mechanismy nedisponuje. Započne její štěpení ve specifické, čili rozpoznávací palindromické sekvenci, která určuje specifitu daného druhu restriktázy. Restriktázy mají ve světě molekulární biologie mnohá využití. V náš prospěch jsme tyto enzymy využily při klonování (konkrétně restriktázy II. typu) k vyštěpení cíleného fragmentu nebo při testování délek jednotlivých fragmentů, či při vklonování určitého fragmentu do zvoleného plazmidu [92].



Obr. 10 - Znázornění štěpení DNA pomocí libovolné restriční endonukleázy [92].

Jak bylo zmíněno výše, restriktázy svou činností štěpí DNA v rozpoznávací sekvenci, čímž vzniknou buď kohezivní (lepivé) nebo tupé konce (viz Obr. 11). Tupé konce vzniknou, pokud restriktáza štěpí v totožném místě na obou řetězcích DNA. Sice jsou oba kousky navzájem k sobě kompatibilní, ale problém nastává při klonování, kdy DNA inzert nemusí být do vektoru vložen v požadované orientaci. Proto se v případě klonování využívá restriktáz tvořících kohezivní konce. Při využití enzymu zajišťujícího kohezivní štěpení, vzniknou nestejně dlouhé konce, které se dají v dalších krocích spojit pomocí DNA ligázy a lze je

do plazmidu vložit pouze v jedné orientaci. Při klonování může tento úsek s přesahem hybridizovat s kohezivním koncem jiné molekuly DNA při štěpení stejnou restriktázou [92].



Obr. 11 - Příkladné znázornění restriktčního štěpení restriktázy [92].

V této práci jsme použily restriktční enzymy s tvorbou kohezivních konců *AseI*, *NdeI* a *SacI*. Rozpoznávací sekvence pro *SacI* je GAGCT↓C ve směru 5'→3', pro *NdeI* je CA↓TATG ve směru 5'→3', pro *AseI* se jedná o sekvenci AT↓TAAT ve směru 5'→3'. Reakce probíhá ve vodní lázni (Assistant3180) při 37 °C 2 hodiny. Štěpenou DNA jsme separovaly v agarózovém gelu a pokud bylo třeba, požadované fragmenty izolovaly.

Nejdříve jsme si dvěma restriktčními enzymy *AseI* a *SacI* vyštěpily sledovaný úsek AD z vektoru AD_pCR®_4.0_TOPO viz Tab. č. 6.

Tab. č. 6 - Restriční štěpení plazmidu pCR[®]_4.0_TOPO nesoucí fragment AD se dvěma restričními enzymy *SacI* a *AseI*.

komponenty reakce	objem [μl]
CutSmartBuffer [®] (10x)	2
k. č. (B720SS; New England Biolabs [®] , Inc.)	
Plazmid AD_pCR [®] _4.0_TOPO	1
<i>SacI</i> k. č. (R3156S, New England Biolabs [®] , Inc.)	1
Nuclease-free water (New England Biolabs [®] , Inc.)	16
inkubace 2 hodiny při 37 °C	
100 mM NaCl	0,4
<i>AseI</i>	1
inkubace 4 hodiny při 37 °C	

Následně jsme pomocí restričních enzymů *NdeI* a *SacI* vyštěpily GFP kotvu z plazmidu pKK_289_Km_GFP, abychom si plazmid připravily pro ligaci s inzertem AD (viz Tab. č. 7).

Tab. č. 7 - Restriční štěpení plazmidu pKK_289_Km_GFP restričními enzymy *NdeI* a *SacI*.

komponenty reakce	objem [μl]
CutSmartBuffer [®] (10x)	2
plazmid pKK_289_Km_GFP	17
<i>SacI</i>	0,5
<i>NdeI</i>	0,5
vodní lázeň 37 °C 2 hodiny	

3.2.8 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Elektroforetický princip využívá rozdílné velikosti fragmentů, tím pádem dochází k jejich odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato metoda se využívá pro fragmenty o velikosti od 100 bp do 50 kb. DNA se pohybuje od záporného pólu (katody) ke kladnému pólu (anodě), protože je záporně nabitá díky přítomnosti fosfátových skupin. Platí, že delší fragmenty putují elektrickým polem mnohem pomaleji než kratší [93].

Volba koncentrace agarózového gelu se odvíjí od velikosti separovaných molekul. Nejčastěji jsme volily koncentraci gelu 1% či 2%. Přípravě gelu předcházela navážka agarózy (SigmaLife Science; k.č. A5093-500G), kterou jsme rozpustily v 1x koncentrovaném TAE pufru (SERVA dodáván 50x koncentrovaný; k. č. 42549.01). Do tohoto roztoku jsme přidaly interkalační barvu, která se váže specificky na DNA (SYBR Safe DNA Gel Stain 10 000x concentrate in DMSO; Invitrogen™; k. č. S33102). Připravený roztok jsme v Erlenmayerově baňce krátce rozvařily v mikrovlnné troubě do rozpuštění všech složek. Roztok agarózy jsme nalily do plastové vaničky s hřebínkem, který zajistil tvorbu jamek v gelu, a gel jsme nechaly utuhnout.

Gel byl po jeho utužení přenesen do elektroforetické vany s 1x koncentrovaným TAE puftrem (TAE buffer 50x, SERVA). Do jamek v gelu jsme nanasly vzorky a pro odhad velikosti jednotlivých separovaných fragmentů i standard čili velikostní marker (do jedné či do obou jamek na obou stranách v gelu). DNA standard nejvíce používaný v našich experimentech je dodáván firmou Thermo Scientific – O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder ready-to-use (4 µl na jamku). Vzorek DNA jsme před aplikací na gel smíchaly s nanášecím puftrem - 6x Orange Loading Dye; Thermo Scientific.

Elektroforetická separace probíhala v elektroforetické aparatuře (I-MUPID ADVANCE) s následujícím nastavením: 100 V po dobu 30 minut. Vizualizaci DNA jsme provedly pomocí UV transiluminátoru v programu Infinity Capture.

Pokud bylo třeba DNA z agarózového gelu purifikovat, fragment DNA našeho zájmu jsme kópičkem vyřízly pod kontrolou UV lampy, a purifikaci DNA kitem (QIAquick® Gel Extraction Kit; QIAGEN®; k. č. 28706) jsme získaly vodný roztok DNA.

3.2.8.1 Izolace DNA z agarózového gelu

Do mikrozkušavky s gelem obsahujícím DNA jsme přidaly BufferQG (3 objemy na 1 objem gelu) a nechaly gel 10 minut rozpouštět při 50 °C (termoblok GRANT). Vzorek jsme každé 2 - 3 minuty promíchaly na vortexu (IKA MS3 Digital) a na konci inkubace jsme zkontrolovaly výslednou barvu roztoku – měla by být žlutá (při jiné barvě je třeba upravit pH).

V následujícím kroku jsme přidaly izopropanol, jehož objem se opět odvíjí od navážky gelu. Tuto směs jsme napipetovaly do zkumavky obsahující filtr (QIAquick spin column) a centrifugovaly (centrifuga MiniPico21 Centrifuge) 1 minutu při 17 900 g. V tomto kroku došlo k zachycení DNA na filtru. DNA jsme promyly pufr (Buffer QG) v objemu 500 µl a mikrozkušavku jsme centrifugovaly 1 minutu při 17 900 g. Před elucí jsme DNA dále promyly 750 µl PE pufru (BufferPE), inkubovaly 2-5 minut a centrifugovaly za stejných podmínek.

Obsah na dně jsme vylily a centrifugaci jsme zopakovaly ještě jednou pro odstranění veškerého přítomného ethanolu. QIAquick zkumavku s filtrem jsme umístily do připravené čisté 1,5 ml mikrozkušavky.

Poslední krok, který zbývá, je eluce k získání vodného DNA roztoku. Doprostřed filtrační membrány jsme pipetovaly 20 µl destilované vody a minutu nechaly DNA rozpouštět při laboratorní teplotě. Vodný roztok DNA jsme získaly centrifugací 1 minutu při 17 900 g. Získaný roztok DNA jsme uchovávaly v mrazáku pro pozdější použití.

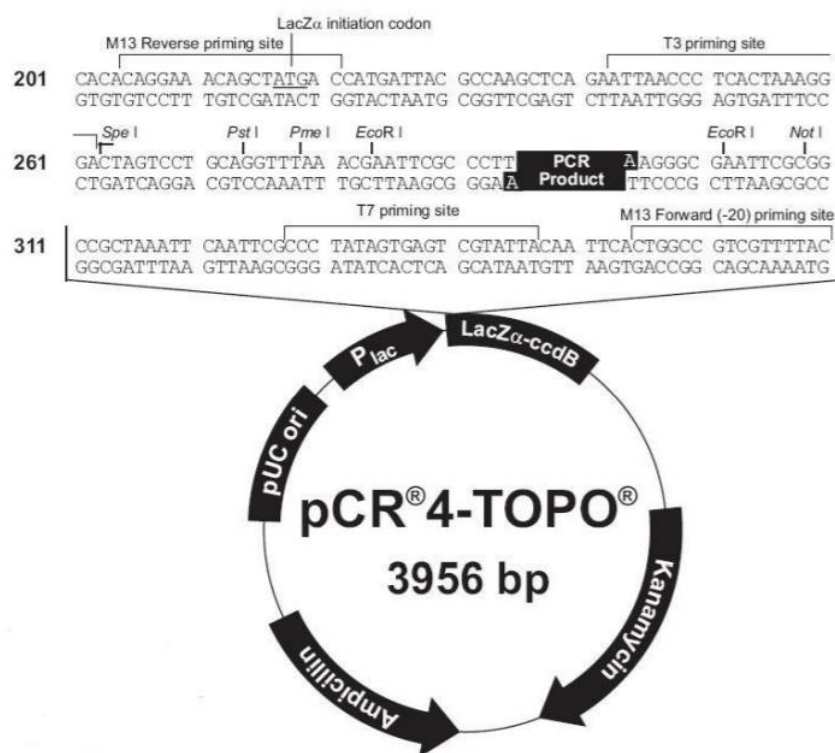
3.2.9 Klonování s využitím TOPO[®]TA Cloning[®] Kitu

K zaklonování PCR produktu AD jsme použily kit TOPO[®] TA Cloning[®] Kit; k. č. 45-0030; Invitrogen[™]. pCR[®]_4.0_TOPO vektor je upraven pro přímé klonování PCR fragmentů s 3'-A přesahem bez nutnosti použití DNA ligázy tím, že obsahuje odpovídající 3'-T přesahy (viz Obr. 12). Protože jsme pro syntézu AD fragmentu použily *PfuUltra* II polymerázu, která na rozdíl od *Taq* polymerázy netvoří 3'-A přesahy, bylo nutné tyto přesahy dosyntetizovat. V mikrozkušavce jsme smíchaly PCR produkt (10,65 µl), pufr pro *Taq* polymerázu (10x); k. č. B9014S; New England Biolabs[®], Inc. v množství 1,25 µl, 10 mM dATP (0,5 µl) a *Taq* polymerázu; k. č. B9014S; New England Biolabs[®], Inc. (0,1 µl) a směs jsme inkubovaly 20 minut při 72 °C (Thermoshaker TS-100 BIOSAN).

Poté jsme připravený PCR produkt s 3'-A přesahy v množství 4 µl smíchaly se Salt solution (1 µl) a pCR[®]_4.0_TOPO vektorem (1 µl). Připravený roztok se nechá inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě, aby se volné 3'-T konce plazmidu spojily s volnými 3'-A konci na PCR produktu a poté jsme směsí transformovaly chemokompetentní buňky *E. coli* TOP10.

Celkový objem (6 µl) směsi jsme přenesly ke 100 µl chemokompetentních buněk *E. coli* TOP10 a inkubovaly 30 minut na ledu. Následně jsme suspenzi přemístily na 30 sekund do vodní lázně (Assistant3180) předehřáté na 42 °C. Hned poté jsme zkumavku přesunuly na 2 minuty na led. K buňkám jsme přidaly 250 µl předehřátého SOC kultivačního média, které je součástí TOPO klonovacího kitu. Po přidání média jsme *E. coli* TOP10 inkubovaly v třepacím inkubátoru (Infors HT ECOTRON) 1 hod při 37 °C a nakonec jsme suspenzi vysely na selekční LB agar s kanamycinem (50 µg/ml) nebo ampicilinem (100 µg/ml).

Plotny jsme inkubovaly při 37 °C v inkubátoru (5115-2 ShellLab CO₂ Incubator) do následujícího dne, kdy jsme narostlé kolonie testovaly pomocí PCR na koloniích.



Obr. 12 - Mapa plazmidu pCR[®]_4.0_TOPO [94].

3.2.10 Ligace vektoru a inzertu

Ligace je důležitou součástí klonování *in vitro*. Dochází při ní ke spojení dvou fragmentů DNA pevnou fosfodiesterovou kovalentní vazbou (mezi 5'-fosfátovou skupinou jednoho nukleotidu a 3'-hydroxylovou skupinou ribózy či deoxyribózy druhého nukleotidu). Po katalytické stránce patří mezi nezbytné součásti ligačního procesu enzymy DNA ligázy. V molekulární biologii se tyto enzymy získávají z *E. coli* infikované fágem T4. V bakteriální buňce hraje tento enzym zásadní roli při replikaci, crossing-overu nebo reparaci DNA. DNA ligáza častěji spojuje lepivé konce DNA (vysvětlení v kapitole 3.2.7). Ligací se uzavírá proces tvorby rekombinantního plazmidu, kterým transformujeme příslušné bakterie [95].

Ligační reakce probíhá při 16 °C přes noc nebo při laboratorní teplotě. Pokud použijeme speciálně upravenou ligázu, postačí pro maximální redukovatelnost potenciálního vzniku nekonvalentních vazeb pouze 5 minut. V živém organismu probíhají sice enzymy katalyzované reakce při 37 °C, ale *in vitro* experimenty nedisponují možností případnou chybu v ligaci reparovat. Proto aktivita enzymu není sice optimální, ale dává se přednost prevenci vzniku chyb.

Před samotným experimentem se doporučuje využít kalkulátor ligace pro výpočet množství vektoru a inzertu na základě jejich velikosti a zvoleného ligačního poměru, dostupný na webových stránkách: http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html. Poměr volných konců plazmidu a použitého inzertu v ligační směsi jsme stanovily na 1:3. Reakce měla celkový objem 10 µl. Složení ligační směsi je uvedeno v Tab. č. 8.

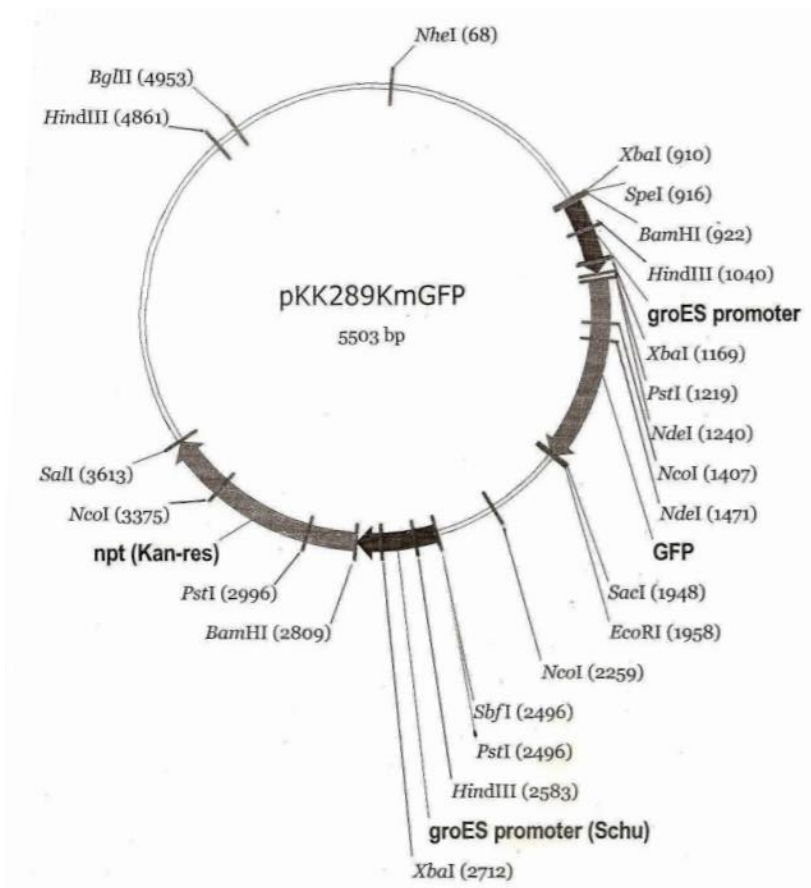
Tab. č. 8 - Příklad složení ligační směsi.

komponenty reakce	objem [µl]
Quick Ligase k. č. (M220OL; New England Biolabs [®] , Inc.)	0,5
Quick Ligase Buffer k. č. (B220OS; New England Biolabs [®] , Inc.)	5
pKK_289_Km_GFP	0,2
Inzert (AD)	3,5
H ₂ O	0,5

3.2.11 Transformace *E. coli*

Namnožení požadovaného fragmentu DNA lze, kromě PCR, uskutečnit i pomocí metody molekulárního klonování. Zásadní rozdíl je použití hostitelského organismu pro replikaci zkoumaného úseku DNA, často se jedná o kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) či bakterie (*E. coli*). V hostitelských buňkách se cizí úsek DNA mnohonásobně namnoží v připraveném klonovacím vektoru [96].

V této práci byly použity vektory pCR[®]_4.0_TOPO (viz Obr. 12) a pKK_289_Km_GFP (viz Obr. 13), které jsme použily pro transformaci bakterií *E. coli* TOP10 nebo *E. coli* XL-1 Blue.



Obr. 13 - Mapa plazmidu pKK_289_Km_GFP [91].

Při transformaci se využívá přirozené schopnosti bakteriálních buněk přijmout cizorodou DNA, nesenou plazmidem. K transformaci jsou třeba speciálně upravené buňky – kompetentní buňky, jejichž membrána se stává díky speciální kultivaci propustná.

V naší práci jsme používaly komerčně dostupné chemokompetentní buňky *E. coli* TOP10; distribuované firmou Invitrogen (viz kapitola 3.2.9) nebo *E. coli* XL-1 Blue; distribuované

firmou Agilent. Při transformaci jsme využívaly teplotní šok (krátká inkubace při 42 °C následovaná ochlazením na ledu), během něhož se zvýší propustnost bakteriální membrány a plazmidová DNA může projít do buňky.

K 100 µl chemokompetentních buněk *E. coli* XL1 Blue jsme přidaly ligační směs a inkubovaly 30 minut na ledu. Následoval teplotní šok opět při 42 °C 1 minutu. Poté jsme zkumavku s buněčnou směsí přesunuly na 2 minuty na led. K buňkám jsme přidaly 300 µl SOC média a zkumavku jsme umístily na 1 hod do třepacího inkubátoru při 37 °C, 200 rpm. Následně jsme obsah zkumavky vysely na LB plotny s kanamycinem (50 µg/ml) a plotny jsme umístily do termostatu do druhého dne. Stejně jako v případě TOPO klonování, tak i zde jsme provedly kontrolní PCR na koloniích k ověření přítomnosti inzertu, následovala izolace plazmidu a kontrolní restrikce.

3.2.12 Elektroporace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

Elektroporace je typ transformace, při kterém se za vhodně nastaveného elektrického proudu vytvoří v membráně *F. tularensis* póry, kterými posléze volně prochází plazmid s inzertem.

Přípravenou plazmidovou DNA nesoucí požadovaný inzert jsme v množství 100 ng přidaly ke 100 µl elektrokompetentních buněk FSC200 a inkubovaly 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci jsme směs přemístily do 0,2 cm elektroporačních kyvet (Bio-Rad) a elektroporovaly za těchto podmínek: 2,5 kV, 25 µF při 600 Ω. Ihned po elektrickém šoku jsme k bakteriím přidaly 1 ml Chamberlainova média předehřátého na 37 °C. Obsah kyvety jsme přenesly do 15 ml zkumavky a inkubovaly 4 hod při 37 °C v třepacím inkubátoru. Po inkubaci jsme kulturu centrifugovaly při pokojové teplotě 5 minut při 4000 g (Eppendorf 5804R). Supernatant jsme odstranily a peletu resuspendovaly ve 100 µl média a vysely na McLeod plotnu s kanamycinem (20 µg/ml). Plotny jsme inkubovaly 2-5 dní do nárůstu kolonií při 37 °C.

3.2.13 Příprava elektrokompetentních buněk *F. tularensis* FSC200

Ze zásobní zmražené kultury bakterií jsme vysely bakteriální suspenzi na 2 McLeod plotny. Plotny jsme inkubovaly 24-48 hodin dle nárůstu kolonií v termostatu při teplotě 37 °C. Bakterie z plotny jsme přeočkaly do předehřátého Chamberlainova média a kultivovaly v termostatu při stejné teplotě přes noc. Druhý den jsme bakterie přeočkaly do 50 ml čerstvého předehřátého Chamberlainova média na OD_{600 nm} 0,1 a nechaly kultivovat do OD_{600 nm} 0,3-0,6.

Po dosažení požadované optické denzity jsme bakterie centrifugovaly 15 minut ve 4 °C při 7300 g (Eppendorf 5804R) a dvakrát jsme bakterie promyly 0,5 M sacharózou. Peletu bakterií jsme resuspendovaly ve 2 ml 0,5 M sacharózy (koncentrace bakterií přibližně 1x 10¹⁰ buněk/ml) a připravily alikvóty po 200 µl, které jsme uchovávaly při – 80 °C.

3.2.14 Příprava celobuněčného lyzátu (WCL), cytoplasmatické

a membránové frakce po kultivaci *F. tularensis*

Ze zásobní kultury *F. tularensis* FSC200 a *F. tularensis* exprimující požadovaný fúzní protein (HU-NLS_GFP, HU-NLS_HA nebo HU-NLS_HIS) jsme zaočkaly do 30 ml Chamberlainova média (u kultur exprimujících fúzní protein s kanamycinem 20 µg/ml) na OD_{600 nm} 0,1 a kultury jsme inkubovaly přes noc při 37 °C v třepacím inkubátoru při 200 rpm.

Bakteriální kultury jsme centrifugovaly při 7300 g 15 minut při 4 °C (Eppendorf 5804R). Supernatant (kultivační médium) jsme uchovaly pro pozdější použití. Peletu bakterií jsme promyly PBS pufrem a resuspendovaly ve 2 ml PBS. K suspenzi jsme přidaly 40 µl 50x koncentrovaných inhibitorů proteáz (cOmplete, EDTA free, k. č. 05056489001; Roche Diagnostics), a 1 µl benzonasy (Benzonase[®] Nuclease; k. č. E 1014-25KU; Sigma-Aldrich[®]).

K lýze bakteriálních buněk jsme použily homogenizátor French Press Pressure Cell, Thermo Scientific. Lýzu jsme provedly 3x při 16 000 psí. Principem přístroje je vývoj vysokého tlaku (až 40 000 psí) na buňku, který vede k rovnoměrnému růstu intracelulárního tlaku. Po průchodu celou je vzorek vystaven rychlému snížení okolního tlaku. Intracelulární tlak se ale snižuje pomaleji a rozdíl těchto tlaků způsobí, že buněčná stěna praskne a uvolní intracelulární obsah. Přístroj jsme obsluhovaly dle návodu od výrobce. Po odstranění zbytků buněčných stěn

a nerozbitých bakterií jsme získanou suspenzi centrifugovaly 2x po 30 minutách při 6200 g při 4 °C. 1 ml WCL jsme přenesly do ultracentrifugační zkumavky (Polyallomer Centrifuge Tubes; k. č. 349 623, Beckman Coulter) a centrifugovaly při 100 000 g a 4 °C, 1 hod 20 minut k získání cytoplasmatické (supernatant) a membránové frakce (peleta); (Beckman Coulter Optima Max Ultracentrifuge).

Frakci membránových proteinů jsme získaly resuspendováním pelety ve 100 µl PBS s 0,1% NP40 (NonidetP40, k. č. 1332473; Roche Diagnostics) a 2 µl inhibitorů proteáz.

Použité kultivační médium jsme filtrovaly přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm (28 mm Syringe Filter Micron Membrane; k. č. 431229; Corning[®] Incorporated Corning R), přidaly inhibitory proteáz a poté koncentrovaly pomocí Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (k. č. UFC901024; Merck) 2x 40 minut při 5000 g a 4 °C.

Všechny buněčné frakce včetně koncentráту kultivačního média jsme dále analyzovaly pomocí SDS-PAGE pro stanovení celkové hladiny exprese fúzního proteinu. Tomuto kroku předcházelo stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA (kyseliny bicinchoninové).

3.2.15 Stanovení koncentrace proteinů pomocí metody BCA

Výběr metody pro stanovení koncentrace bílkoviny je stěžejní. V úvahu se bere mnoho faktorů, především charakter proteinu či jeho množství, nelze opomenout ani nároky na přesnost nebo specifčnost stanovení či finanční náročnost, ale i časovou náročnost. V rutinních laboratořích se pro stanovení koncentrace proteinu hojně využívají spektrofotometrické metody. Jejich obecným principem je absorpce světla stanoveného proteinu s přidanými činidly za vzniku barevné reakce, jehož intenzita odpovídá koncentraci měřeného proteinu ve vzorku [97].

Principem bicinchoninové metody je schopnost proteinů redukovat Cu^{2+} , jenž reaguje s peptidovou vazbou, na Cu^+ . Jednomocná měď následně reaguje s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za tvorby barevného komplexu, které se měří při 562 nm [97]. Reakční směs se připravuje smísením činidla I (Bicinchoninic Acid Solution; k. č. B9643-1L-KC; Sigma-Aldrich[®]) s činidlem II (Copper II sulfate solution; k. č. C2284; Sigma-Aldrich[®]). Obě činidla se mísí v poměru 50:1 (20 ml činidla I a 400 µl činidla II).

Nezbytností je před analýzou jednotlivých vzorků paralelně měřit koncentraci standardu, jehož koncentraci známe a po sestrojení kalibrační křivky stanovit koncentraci proteinu v analyzovaných vzorcích. Standardem pro kalibraci byl zvolen hovězí sérový albumin (BSA; konc. 1 mg/ml; k. č. P0914-10AMP; Sigma-Aldrich®), jehož koncentrační řadu jsme připravily podle Tab. č. 9.

5 µl vzorku jsme naředily 45 µl destilované vody a ke směsi jsme přidaly 1 ml připraveného činidla. Vzorky i kalibrační řadu BSA jsme inkubovaly 30 minut při 37 °C ve vodní lázni a poté spektrofotometricky proměřily.

Tab. č. 9 - Příprava kalibrační řady pro metodu BCA.

pořadí zkumavek	objem vody [µl]	objem BSA [µl]	objem činidla [ml]	koncentrace BSA [mg/ml]
1	50	-	1	0
2	40	10	1	2
3	30	20	1	4
4	20	30	1	6
5	10	40	1	8
6	-	50	1	10

3.2.16 Purifikace fúzních proteinů HU_NLS_HA a HU_NLS_HIS

Afinitní systémy napomáhají při vhodné volbě afinitní kotvy v kombinaci s fúzním proteinem k izolaci rekombinantních proteinů. V dnešní době je k dispozici mnoho komerčně dostupných afinitních kotev. Správná volba kotvy pro konkrétní aplikaci se odvíjí od využití, které jsou na fúzní protein kladena, např. umožňovat sekreci do média, či zvyšovat rozpustnost [98].

K izolaci fúzních proteinů HU_NLS_HA a HU_NLS_HIS byly využity 2 přístupy:

Protein HU_NLS_HA jsme purifikovaly pomocí agarózových kuliček s imobilizovanou protilátkou namířenou proti HA kotvě (PIERCE™ HA epitope TAG antibody agarose conjugate 2 – 2. 2. 14 (k. č. 26182; Thermo Scientific) a kolonek (PIERCE™ Spin Columns

Screw Cap 69705). 150 µl suspenze agarózových kuliček jsme pipetovaly do připravených kolonek a centrifugovaly 1 minutu při 12 000 g (MiniPico21 Centrifuge) a poté promyly 150 µl TBS pufru. K promytým kuličkám jsme přidaly 550 µl celobuněčného lyzátu *F. tularensis* exprimující fúzní protein a inkubovaly přes noc na rotátoru ve 4 °C. Druhý den jsme suspenzi centrifugovaly při 12 000 g 1 minutu, kuličky promyly 3x 500 µl TBS-T 0,05%. Protein jsme z kuliček eluovali 200 µl 3 M NaSCN a následně centrifugovaly při 12 000 g 1 minutu. Získaly jsme 200 µl eluátu a celý eluční krok jsme zopakovaly 3x.

Pro izolaci fúzního proteinu HU_NLS_HIS jsme využily metalochelatační typ afinitní chromatografie (IMAC z angl. Immobilized Metal Affinity Chromatography). Imidazolové skupiny histidinových zbytků kotvy specificky interagují s maticí (nejčastěji agaróza), na kterou je navázán ligand - nabitý prvek kovu (Ni^{2+} nebo Co^{2+}). V molekulární biologii je histidinová kotva velmi často využívána k purifikaci proteinů, protože pro buňku není metabolicky náročná, zejména díky své délce a nepozměňuje konformaci výsledného proteinu. Protein HU_NLS_HIS jsme purifikovaly pomocí sady TALON METAL Affinity Resin (k. č. 635503; Takara). 100 µl suspenze agarózových kuliček s kobaltnatými ionty jsme pipetovaly do připravených kolonek a centrifugovaly 1 minutu při 12 000 g (MiniPico21 Centrifuge) a poté promyly 500 µl TBS pufru. K promytým kuličkám jsme přidaly 500 µl celobuněčného lyzátu *F. tularensis* exprimující fúzní protein a inkubovaly 1 hodinu na rotátoru při pokojové teplotě. Poté jsme suspenzi centrifugovaly při 12 000 g 1 minutu a kuličky promyly - nejprve 500 µl TBS pufru s 10 mM imidazolem a poté 500 µl TBS pufru s 20 mM imidazolem. Ke kuličkám jsme přidaly 50 µl TBS pufru s 250 mM imidazolem a inkubovaly 10 minut při pokojové teplotě. Eluční frakci jsme získaly centrifugací při 12 000 g 1 minutu.

3.2.17 SDS – PAGE gelová elektroforéza proteinů

SDS polyakrylamid gelová elektroforéza proteinů umožňuje jejich separaci na základě rozdílné velikosti (molekulové hmotnosti). Tím, že se vzorek zahřeje na 95 °C, dojde k denaturaci přítomného proteinu a navázání molekul SDS (dodecylsírany sodného). Všechny přítomné proteiny získají stejný záporný náboj, úměrný velikosti proteinu.

K 85 µl 3x SDS vzorkového pufru bez β-merkptoethanolu (1,875 ml Tris-HCl pH 6,8, 3 ml glycerolu, 0,69 g SDS, 0,3 ml 0,1% bromfenolové modři a doplnit do 10 ml deionizovanou

vodou) jsme napipetovaly 15 μ l β -merkaptoethanolu. Z tohoto množství jsme pipetovaly do připravených a popsáných mikrozkušavek 10 μ l vzorkového pufru, vypočítané množství vzorku (dle koncentrace proteinu vypočtené dle metody BCA – viz kapitola 3.2.15) a objem jsme doplnily do 30 μ l destilovanou vodou. Připravené vzorky jsme nechaly inkubovat 5 minut při 95 °C v termobloku a poté jsme vzorky nanesly na gel.

Po napipetování vzorku na gel a jeho umístění do elektrického pole proteiny migrují ke kladné anodě na základě molekulového síta v polyakrylamidovém (PAA) gelu. Ke správnému hodnocení separovaných proteinů se využívá standard o známé molekulové hmotnosti.

K separaci jsme využily sadu Mini-PROTEAN[®]3 Cell; Bio-Rad. Pro samotnou diskontinuální elektroforézu byly připraveny 2 gely. 15% separační polyakrylamidový gel (viz Tab. č. 10); (mobilita iontů v tomto gelu je vysoká) a 4% zaostřovací gel (viz Tab. č. 11); (mobilita iontů v tomto gelu je nízká). Vycházely jsme z čerstvě připraveného zásobního roztoku 4,5 g akrylamidu a 0,12 g PDA (1,4 -bis (acryloyl)piperazin) v 15 ml destilované vody.

Separací gel se musí ihned po přidání TEMEDu aplikovat mezi skla a posléze převrstvit sekundárním butanolem (0,7 ml) saturovaného vodou (50 ml sekundárního butanolu a 10 ml deionizované vody). Gel jsme nechaly polymerovat 1 hodinu. Sekundární butanol jsme poté odstranily, nalily 4% zaostřovací gel a nasadily hřeben s jamkami. Polymerace opět probíhala 1 hod.

Tab. č. 10 - Složení 15% separačního PAA gelu (1 gel = 4,9 ml roztoku).

reagencie	objem [μl/ ml]
akrylamid + PDA	8,75 ml
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	4,35 ml
voda	4,15 ml
odvzdušnit	
10% SDS*	175 μl
10% APS**	44 μl
TEMED***	4,4 μl
neodvzdušňovat, polymerace	

* dodecylsírán sodný

** persírán amonný

*** N,N, N', N'-tetra-methyl-ethylendiamin

Tab. č. 11 - Složení 4% zaostřovacího gelu.

reagencie	objem [μl/ ml]
akrylamid + PDA	1,3 ml
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
voda	6,1 ml
odvzdušnit	
10% SDS	100 μl
10% APS	50 μl
TEMED	10 μl
neodvzdušňovat, polymerace	

Systémem protéká konstatní proud. Napětí v separačním gelu bude nižší než v zaostřovacím gelu, protože se liší pH přidaného pufru v obou gelech. Tím pádem se ionty mohou seřadit podle svých příslušných mobilit. Připravené zpolymerované gely jsme umístily do drážek

v elektrodovém držáku. Celou aparaturu jsme vložily do elektrodové vany. Do prostoru mezi skly jsme nalily po horní okraj tzv. horní pufr (15 g Tris, 72 g glycin, 2,5 g SDS a doplnit do 2,5 l dionizovanou vodou, pH 8,5), do vnějšího prostoru tzv. dolní pufr (15 g Tris, 72 g glycin, 2,5 g SDS, 0,5 g azid sodný, doplnit do 2,5 l deionizovanou vodou, pH 8,9). Do jednotlivých jamek jsme nanesly nejdříve standard (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, k. č. 161-0375; Bio-Rad) a posléze vzorky. Elektroforetickou aparaturu jsme uzavřely víkem a připojily se ke zdroji stejnosměrného napětí s tímto nastavením: 30 V (konstantní), 240 mA, zhruba 60 minut.

K separaci proteinů jsme používaly i tzv. **nízkomolekulární gely**, které se liší svým složením. Využily jsme taktéž sadu Mini-PROTEAN®3 Cell; Bio-Rad. Pro samotnou diskontinuální elektroforézu byly připraveny 2 gely: separační polyakrylamidový gel (viz Tab. č. 12); (mobilita iontů v tomto gelu je vysoká) a zaostřovací gel (viz Tab. č. 13); (mobilita iontů v tomto gelu je nízká). Vycházely jsme z čerstvě připraveného zásobního roztoku 7,2 g akrylamidu a 0,225 g PDA (1,4-bis (acryloyl)piperazin) v 15 ml destilované vody.

Tab. č. 12 - Složení separačního PAA gelu (1 gel = 4,9 ml roztoku).

reagencie	objem [μl/ ml]
akrylamid + PDA	5 ml
363,3 g Tris + 3 g SDS/1 l vody, upravit pH na hodnotu 8,45 pomocí 38 ml HCl a přidat 5 ml	
87% glycerol (261 ml glycerolu/39 ml vody)	1,88 ml
voda	3,04 ml
10% APS* (50 mg APS/0,5 ml vody)	75 μl
TEMED**	7,5 μl
neodvzdušňovat, polymerace	

*persíran amonný

** N,N, N', N'-tetra-methyl-ethylendiamin

Tab. č. 13 – Složení zaostřovacího gelu.

reagencie	objem [μl/ ml]
akrylamid + PDA	0,6 ml
363,3 g Tris + 3 g SDS/1 l vody, upravit pH na hodnotu 8,45 pomocí 38 ml HCl a přidat 1,86 ml	
voda	4,98 ml
neodvzdušňovat	
10% APS	75 μl
TEMED	7,5 μl
neodvzdušňovat, polymerace	

Separční gel se musí ihned po přidání TEMEDu aplikovat mezi skla a posléze převrstvit destilovanou vodou (0,7 ml). Gel jsme nechaly polymerovat 20-30 minut. Asi po půl hodině jsme nalily zaostřovací gel a nasadily hřeben s jamkami. Polymerace probíhala 1 hod. Do prostoru mezi skly jsme nalily po horní okraj tzv. horní pufr (60,6 g Tris, 89,6 g TRICIN, 5 g SDS a doplnit do 5 l deionizovanou vodou, pH 8,25), do vnějšího prostoru elektroforetické vany tzv. dolní pufr (363,3 g Tris, doplnit do 15 l deionizovanou vodou, upravit na pH 8,9 pomocí HCl). Do jednotlivých jamek jsme nanесли nejdříve standard (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards, k. č. 161-0375; Bio-Rad) a posléze vzorky. Elektroforetickou aparaturu jsme uzavřely víkem a připojily ke zdroji stejnosměrného napětí s tímto nastavením: 30 V (konstantní), 240 mA, zhruba 30 minut a poté 170 V (konstantní), 240 mA, zhruba 60 minut.

3.2.18 Western-blotting

Western-blotting je dalším krokem k analýze konkrétního proteinu po SDS-PAGE. Abychom mohly protein specificky identifikovat, musíme provést imunodetekci specifickou protilátkou. Ta ale nesnadno prostupuje gelem. Z toho důvodu se využívá přenosu proteinů z gelu na nitrocelulózovou či PVDF membránu. Proteiny si zachovávají stále negativní náboj (díky SDS z předchozí užití metody). Membrána váže putující proteiny z gelu díky vzniklému

elektrickému proudu za vzniku „otisku“ proteinů na membráně a to ve stejném rozložení, jaké vzniklo v gelu (= „blotting“). V této práci byl užit speciální typ western-blottingu – tzv. semi-dry blotting za homogenního elektrického pole.

PVDF membránu (Immun-Blot LF PVDF; k. č. 162-0264; Bio-Rad) o velikosti 5,5x8,4 cm (odpovídá velikosti gelu), jsme aktivovaly smočením v methanolu na 1 minutu a poté 3x promyly v transferovém pufru (15,15 g Tris, 72 g glycin, 1 l methanolu a objem se doplní do 5 l deionizovanou vodou). Do transferového pufru jsme namočily i připravené filtrační papíry (Whatman[®]; Sigma-Aldrich[®]).

Blotovací sendvič jsme sestavily následovně: spodní anodová část (+) → smočený silný filtrační papír Whatman (uhlazen válečkem, aby se vytlačily případné vzduchové bubliny) → PVDF membrána → gel s rozdělenými proteiny → 5 smočených filtračních papírů (nakonec opět uhladit válečkem) → katoda (-). Blotování probíhalo v Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell; Bio-Rad, za těchto podmínek: konstatní proud 170 mA, 25 V, 20 minut.

Po přenosu jsme gel i membránu smočily ve vodě, gel jsme využily pro barevnou vizualizaci separovaných proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue, kdežto membránu k imunodetekci.

3.2.19 Vizualizace proteinů v gelu a jejich imunodetekce

Vizualizaci proteinů v gelu jsme provedly pomocí koloidního modření (Colloidal Blue Staining Kit; k. č. LC6025; Invitrogen). Metoda je založena na barvení koloidním modrým barvivem v roztoku methanolu s kyselinou fosforečnou a vysokou koncentrací síranu amonného. Hydrofobicita roztoku koloidní modři snižuje množství volného barviva v roztoku, což má za následek vyšší afinitu barviva k proteinům a nižší zbarvení pozadí.

Dle návodu od výrobce jsme do kádinky smíchaly 55 ml deionizované vody, 20 ml methanolu, 5 ml roztoku B a 20 ml roztoku A. Gel jsme v připraveném roztoku a za stálého míchání na třepače (IKA HS 260 basic) inkubovaly 3 – 12 hodin.

Během 20-ti minutového přenosu proteinů z gelu na membránu, jsme připravily blokovací roztok, což je 5% sušené mléko; (k. č. 170-6404, Roth) rozpuštěné ve 100 ml TBS pufru s 0,05% Tweenem 20 (TBS-T-0,05%). Po přenosu jsme membránu 10 minut promývaly v TBS

pufri. Membránu jsme následně inkubovaly v připraveném blokovacím roztoku po dobu 1 hodiny. Dále se postup liší dle použité protilátky.

Protilátka proti GFP – Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-GFP (k. č. 183734)

Přes noc jsme membránu inkubovaly s primární protilátkou namířenou proti GFP při 4 °C. Tato protilátka se naváže na svůj antigen, je-li přítomen na membráně mezi separovanými proteiny. Protilátku jsme naředily 1: 5000 v 5% sušeném mléce v TBS-T 0,05% (1 µl protilátky do 5 ml pufri).

Druhý den jsme membránu důkladně promyly 6x5 minut v TBS-T 0,05%. Následovala inkubace se sekundární protilátkou (Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/ HRP; k. č. P0 399), která nám pomohla primární protilátku s navázaným proteinem prokázat, a to díky vazbě na Fc fragment králičí primární protilátky. Protilátku jsme ředily 1: 1000 (10 µl protilátky do 10 ml pufri s mlékem). Po inkubaci jsme membránu důkladně promyly 6x9 minut pufrem TBS-T 0,05% a 5 minut v TBS. Půl hodiny před koncem promývání jsme si připravily chemiluminiscenční roztok (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, POD; k. č. 11500 694 001; Roche) pro ECL analýzu: 1,6 ml roztoku A jsme smíchaly s 16 µl roztoku B a inkubovaly 30 minut ve tmě.

Promytou, lehce usušenou membránu jsme do připraveného roztoku ponořily na 1 minutu a poté jsme membránu vložily do kazety na vyvolávání RTG snímků. Membrána byla v této chvíli připravena na analýzu v temné komoře. Na membránu jsme v temné komoře přiložily RTG film (CL-XPosure™ Film; Thermo Scientific) ve zvolených intervalech a poté film vyvolaly pomocí přístroje Curix 60/CP1000 typ 9462, Agfa.

Protilátka proti HA kotvě – Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti HA-Tag/HRP (k. č. AB 128131)

Membránu po blokaci jsme inkubovaly přes noc s primární protilátkou proti HA kotvě, která je již konjugovaná s HRP (ředění 1: 5000 v 5% sušeném mléce v TBS-T 0,05%) při 4 °C na rotátoru. Druhý den jsme membránu promyly 6x9 minut v TBS-T 0,05%, 5 minut v TBS a následovalo vyvolání v temné komoře.

Protilátka proti HIS kotvě – Monoclonal Mouse IgG1 anti-HIS-Tag (k. č. 34660)

Membránu po blokaci jsme inkubovaly přes noc s primární protilátkou namířenou proti histidinové kotvě při 4 °C (ředění 1:3000) v 5% sušeném mléce v TBS-T 0,05%). Druhý den jsme membránu promyly 6x5 minut v TBST 0,05% a inkubovaly 1 hodinu se sekundární protilátkou (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/ HRP; k. č. P0447) ředěnou 1:1000 (10 µl protilátky do 10 ml pufru s mlékem). Po inkubaci jsme membránu promyly 6x9 minut pufrům TBS-T s 0,05%, 5 minut v TBS a následovalo vyvolání v temné komoře.

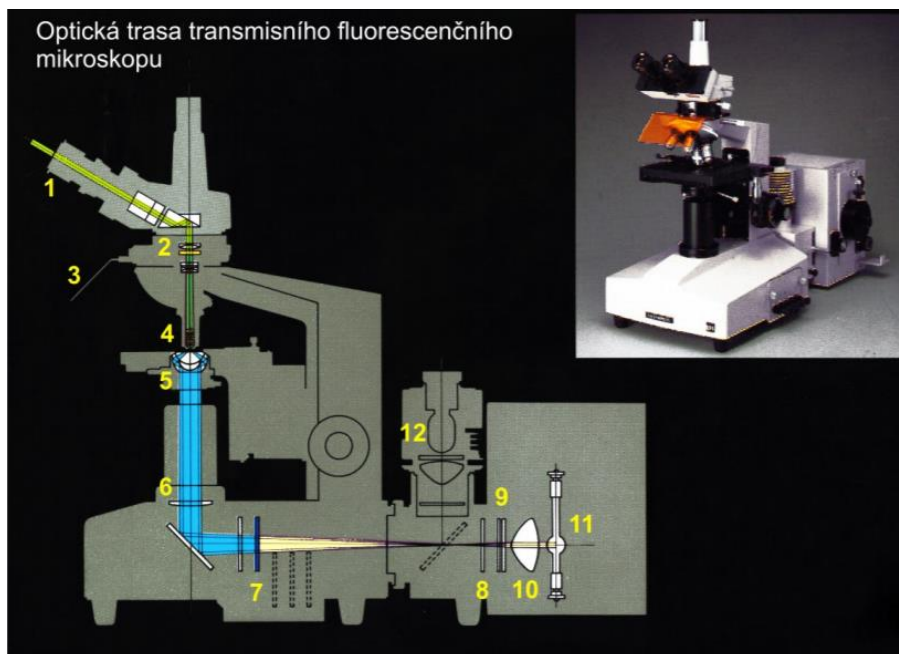
3.2.20 Fluorescenční mikroskopie – zviditelnění HU_HA, HU-NLS_HA, HU-NLS_GFP, HU-NLS_HIS

Fluorescenční metody představují ideální způsob pro zviditelnění cílových doménových struktur uvnitř buňky. Využívají se techniky přímé nebo nepřímé imunofluorescence. Přímá imunofluorescence se využívá ve vědě velice zřídka. Příprava protilátky, na kterou je navázán fluorochrom, jež by reagovala pouze se strukturou, kterou chceme nalézt, je velice komplikovaná. Z hlediska finanční a časové náročnosti se využívá varianta nepřímé imunofluorescence. Pozorujeme menší množství struktur ve vzorku a vazba je stejně specifická, jako v případě přímé imunofluorescence. V takovém případě je nejprve použita neznačená primární protilátka proti zkoumané struktuře, která se naváže na zkoumanou strukturu uvnitř buňky. Po inkubaci a odmytí je použita sekundární protilátka anti-IgG konjugovaná s fluorescenční molekulou (např. fluoresceinem), jejíž Fc fragment se váže na konstantní fragmenty imunoglobulinových molekul primární protilátky. Výsledkem je v obou případech fluorescence, kterou lze sledovat pod fluorescenčním mikroskopem [99].

Fluorescenční mikroskop je klasický mikroskop, obohacen o optiku typickou pro tento typ mikroskopie, napomáhající fluorescenčnímu pozorování objektů či jednotlivých struktur. Zdrojem excitačního světla je xenonová nebo rtuťová výbojka, v modernějších mikroskopech se už lze běžně setkat s lasery či LED diodami. Světlo prochází objektivem na preparát a vrací se zpět ve formě emisního světla do objektivu díky odrazu v dichroickém zrcadle. Dichroické zrcadlo propouští pouze světlo určité vlnové délky do okuláru. K dichroickému zrcadlu patří i další nezbytné součásti mikroskopu - excitační a emisní filtry. Ty selektují požadovaný rozsah světla potřebného pro excitaci fluorescence ze zdroje záření a zároveň jím prochází jen

sledovaná část emisního spektra, jehož intenzita je mnohem větší a přichází ze vzorku. Fluorescenční signál je analyzován detektorem, nejčastěji CCD kamerou [99].

V našem experimentu byl použit transmisní typ fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse TI-S/L 100 (viz Obr. 14). Zástinný kondenzor propustí světlo, aby dopadlo na preparát pouze z boku. Objektivem se selektuje jen světlo emitované, excitační záření prochází mimo objektiv. Zdroj je umístěn pod preparátem. Snímky jsme vyhodnocovaly pomocí programu NIS element.



Obr. 14 - Transmisní fluorescenční mikroskop [99].

1 - okulár; 2 - emisní filtr; 3 - UV ochranný plast; 4 - objektiv; 5 - zástinný kondenzor; 6 - UV ochranný filtr; 7 - excitační filtr; 8 - závěrka; 9 - tepelný filtr; 10 - kolektor; 11 - vysokotlaká rtuťová výbojka; 12 - wolframová žárovka.

Připravené zmražené „štoky“ bakterií jsme vysely na kanamycinové McLeod plotny, kontrolní kmen byl vyset na plotny bez antibiotika.

Do zkumavky jsme připravily suspenze jednotlivých kmenů v PBS o $OD_{600\text{ nm}} 1$. 1 ml této suspenze jsme centrifugovali 5 minut při 3300 g (Eppendorf MiniSpin plus). Peletu usazenou na dně zkumavky jsme resuspendovaly v 200 μl PBS. Ze suspenze jsme napipetovaly 20 μl na předem očištěné (ethanolem) podložní sklo a suspenzi jsme nechaly zaschnout (20-30 minut).

Abychom zajistily oblast se zaschlými bakteriemi, vymezily jsme tuto část hydrofobním fixem kvůli nechtěnému slítí protilátky nebo dalších roztoků a také kvůli jejich úspoře. Bakteriální

buňky jsme fixovaly 30 minut při pokojové teplotě fixačním roztokem 4% methanolu v 200 μ l PBS. Po promytí PBS puftrem jsme vzorky blokovaly 1 hodinu 3% BSA při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Blokaci jsme ukončily trojnásobným promytím PBS puftrem.

Nyní již postup směřuje k samotnému barvení fúzního proteinu s různými typy přidaných kotev. Od toho se odvíjí použití různých protilátek:

- Primární protilátka proti HA kotvě: Aplikovaly jsme 100 μ l Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-HA-Tag; k. č. 9110. Protilátka je nekonjugovaná, ředěná 1:500 3% ředícím roztokem BSA. Inkubace ve vlhké komoře 45 minut, aby nedošlo k vyschnutí ředícího roztoku a ke zvýšení koncentrace protilátek, bez přístupu světla.
- Primární protilátka proti GFP: Aplikovaly jsme 100 μ l Monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-GFP, k. č. 183734. Protilátka je nekonjugovaná, ředěná 1:500 3% ředícím roztokem BSA. Inkubace ve vlhké komoře 45 minut, aby nedošlo k vyschnutí ředícího roztoku a ke zvýšení koncentrace protilátek, bez přístupu světla.
- Primární protilátka proti HIS kotvě: Aplikovaly jsme 100 μ l Monoclonal Mouse IgG1 anti-HIS-Tag; k. č. 34660. Protilátka je nekonjugovaná, ředěná 1:500 3% ředícím roztokem BSA. Inkubace ve vlhké komoře 45 minut, aby nedošlo k vyschnutí ředícího roztoku a ke zvýšení koncentrace protilátek, bez přístupu světla.

Po inkubaci jsme skla promyly 3x PBS puftrem a přidaly sekundární protilátku s navázaným fluoroforem:

- Sekundární protilátka namířená proti králíčím IgG: Aplikovaly jsme 100 μ l anti-rabbit IgG Alexa FluorTM 488 GOAT (fluoreskuje zeleně; k. č. A11008; InvitrogenTM). Protilátka je ředěná 1:500 3% ředícím roztokem BSA. Inkubace ve vlhké komoře 45 minut, bez přístupu světla.
- Sekundární protilátka namířená proti myším IgG: Aplikovaly jsme 100 μ l anti-mouse IgG Alexa FluorTM 488 GOAT (fluoreskuje zeleně; k. č. A11029; InvitrogenTM). Protilátka je ředěná 1:500 3% ředícím roztokem BSA. Inkubace ve vlhké komoře 45 minut, bez přístupu světla.

Po inkubaci a promytí 3x PBS jsme pro kontrolu v připravených preparátech barvily taktéž bakteriální buňky. Bakterie jsme prokazovaly buď monoklonální myší protilátkou proti *F. tularensis* LPS nebo za použití králičího anti-tularemského séra. Vhodnou kombinaci jsme zvolily podle použité protilátky proti fúznímu proteinu tak, abychom nepoužily primární protilátky stejného původu:

- Na preparáty, u kterých jsme použily králičí primární protilátku, jsme aplikovaly 100 µl myší anti-*F. tularensis* LPS protilátky ředěné 1:500 v 3% BSA roztoku a inkubovaly 45 minut bez přístupu světla.
- Na preparáty, u kterých jsme použily myší primární protilátku, jsme aplikovaly 100 µl králičího anti-tularemského séra ředěného 1:1000 v 3% BSA a inkubovaly 45 minut bez přístupu světla.

Po inkubaci jsme skla promyly 3x PBS pufrem, abychom mohly přidat sekundární protilátky:

- Sekundární protilátka namířená proti myším IgG: Aplikovaly jsme 100 µl anti-mouse Alexa FluorTM 594 DAM (fluoreskuje červeně; k. č. R37115; InvitrogenTM). Protilátku jsme ředily 3% ředícím roztokem BSA 1:500 a inkubovaly 45 minut bez přístupu světla.
- Sekundární protilátka namířená proti králičím IgG: Aplikovaly jsme 100 µl anti-rabbit Alexa FluorTM 594 DAR (fluoreskuje červeně; k. č. R 37119; InvitrogenTM). Protilátku jsme naředily 3% ředícím roztokem BSA 1:500 a inkubovaly 45 minut bez přístupu světla.

V následujícím kroku jsme skla promyly 2x PBS pufrem a 1x destilovanou vodou. Skla jsme lehce usušily, na preparáty nanasly montovací roztok ProLongTM Gold Antifade Mountant (k. č. P10144; Thermo Fisher Scientific) a přiložily krycí skla. Hotové preparáty jsme nechaly do druhého dne zaschnout při pokojové teplotě bez přístupu světla a poté uchovávaly ve 4 °C.

3.2.21 Izolace a kultivace primárních myších kostně-dřeňových makrofágů

K izolaci makrofágů (BMMs; z angl. Bone Marrow Derived Macrophages) z kostní dřeně jsme využily laboratorní myši typu BALB/c (z 1 ks BALB/c myši jsme získaly $1-1,5 \times 10^7$ buněk). Myši jsme uspaly v diethyléteru a usmrtily stříhem do krčních tepen po jejich uchycení na pitevní desku. Zadní nohy a břicho jsme desinfikovaly 70% ethanolem. Kůži jsme nastříhly od břišní dutiny směrem k zadním končetinám. V oblasti pánve jsme zadní končetiny odřízly od těla a celé nožičky jsme po odstranění kůže a chlupů uchovaly v DMEM/ High glucose médiu (k. č. SH300 22.01; Sigma-Aldrich®).

Další kroky jsme prováděly za použití Bioair S@felow 1.2 pro zachování správného laboratorního postupu při práci s buněčnými kulturami. V první jamce 6-ti jamkového panelu jsme preparované končetiny desinfikovaly 70% ethanolem 1-3 minuty a poté ethanol odmyly promytím v následujících čtyřech jamkách panelu s DMEM médiem. Následně jsme pomocí netkané textilie odstranily svalovou tkáň a oddělily *tibie* a *os femoris*, přičemž jsme dbaly na to, aby nedošlo k poškození kloubů spojující tyto 2 kosti kvůli prevenci kontaminace buněk. Vypreparované čisté *femury* a *tibie* jsme přemístily do poslední jamky s DMEM médiem.

Těsně pod kloubem jsme odstříhly konce kostí a kosti jsme propláchly z obou stran cca 2 ml DMEM médiem pomocí jehly 25-28 G. Obsah (kostně-dřeňové buňky v DMEM médiu) jsme jímaly do 50 ml zkumavky. Větší kusy tkáně jsme nechaly 1 minutu usazovat, supernatant pipetovaly do nové 50 ml zkumavky a kostně-dřeňové buňky získaly centrifugací (5 minut, 400 g, RT, centrifuga Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific).

Po odlití supernatantu jsme buňky rozředily v 1 ml BMMs média s antibiotiky (penicilin 50 U/ml a streptomycin 50 µg/ml; k. č. P4333; Sigma-Aldrich®) a poté doplnily do 10 ml BMMs médiem. 50 µl buněčné suspenze a 50 µl trypanové modři jsme smíchaly a nanesly na Bürkerovu komůrku a pod mikroskopem Nikon Eclipse Ts2 jsme spočítaly počet živých kostně-dřeňových buněk v 25-ti čtvercích. Pomocí vzorce: počet buněk x ředění trypanovou modří x 10^4 /ml, jsme vypočetly počet buněk na ml suspenze. Do 90 mm Petriho misek jsme přenesly 6×10^6 buněk a doplnily BMMs médiem do 15 ml a buňky diferencovaly 7 dní v kostně-dřeňové makrofágy (37 °C v 5% CO₂ v Incubator IR Sensor; SANYO). Po 4 dnech jsme odebraly polovinu BMMs média (7,5 ml) a BMMs médium jsme nahradily DMEM médiem s 10% FBS (7,5 ml).

3.2.22 Infekce myších kostně-dřeňových makrofágů bakterií *F. tularensis* subsp. *holarctica*

Petriho misky s diferencovanými makrofágy jsme zkontrolovaly pod mikroskopem. Z Petriho misek jsme odsály médium a přichycené makrofágy promyly 10 ml předeřátého PBS pufru. Po odstranění předeřátého PBS pufru jsme k makrofágům pipetovaly 4 ml studeného PBS pufru a makrofágy s použitím mikroskopické škrabky uvolnily ode dna misky. Směs jsme přenesly do 50 ml zkumavky. Plotny jsme omyly asi 4 ml studeného PBS, které jsme přidaly ke směsi do zkumavky. Zkumavky jsme centrifugovaly při 300 g, 5 minut, RT, (centrifuga JOUAN CR 312). Peletu buněk jsme resuspendovaly v 10 ml DMEM média s 10% FBS a opět spočetly počet makrofágů v 1 ml.

Do 24 jamkového panelu jsme vložily odmaštěné sterilní krycí sklíčko a na něj nasadily buňky v množství 5×10^5 buněk/jamku a doplnily DMEM médiem s 10% FBS do 1 ml. Buňky jsme nechaly adherovat do druhého dne v inkubátoru při 37 °C, v 5% CO₂.

Druhý den jsme připravily bakteriální suspenze z předem naočkovaných McLeod ploten o OD_{600 nm} 1 (zhruba odpovídá 3×10^9 CFU/ml). Suspenzi jsme připravily setřením bakterií z plotny do 4 ml PBS (bakterie jsme rozetřely o stěnu zkumavky). Z připravené bakteriální suspenze jsme odebraly 1 ml do mikrozkušavky a centrifugovaly při 300 g, 7 minut při 4 °C (centrifuga Eppendorf MiniSpin plus). Bakterie usazené ve formě pelety jsme resuspendovaly v 1 ml kultivačního média DMEM + 10% FBS. Pro výpočet skutečného počtu CFU/ml jsme vysely bakteriální suspenzi v ředění 10⁻⁷ v duplikátu na McLeod plotny a inkubovaly je při 37 °C.

Z připravených 24 jamkových destiček (3 panely) jsme odsály médium a přidaly 300 µl nového média. Do každé jamky jsme napipetovaly bakteriální suspenzi o MOI (z angl. Multiplicity Of Infection) = 50. Při hodnotě 3×10^9 bakterií v 1 ml suspenze o OD_{600 nm} 1, bylo přidáno 8,3 µl bakteriální suspenze na 1 jamku (což reálně odpovídalo multiplicitě infekce 56 bakterií *F. tularensis* na 1 makrofága).

Panely jsme centrifugovaly 400 g, RT, 5 minut, (JOUAN CR 312) a poté inkubovaly 30 minut v inkubátoru (IR Sensor, SANYO; 37 °C, 5% CO₂). Makrofágy jsme promyly 3x v předeřátém PBS a extracelulárně lokalizované bakterie jsme odstranily inkubací v DMEM médiu s 10% FBS a gentamicinem (5 µg/ml). Po 30 minutách jsme makrofágy opět 3x promyly předeřátým PBS a inkubovaly v DMEM médiu s 10% FBS. V daných časových intervalech po infekci jsme odsávaly médium a buňky fixovaly fixačním roztokem 4% paraformaldehydu

30 minut při laboratorní teplotě (200 μ l). Sklíčka jsme 3x promyly PBS pufrem a uchovávaly v PBS pufrem v lednici.

Následuje krok, kdy je nutno opracovat membrány buněk tak, aby byly propustné: ke sklíčkům jsme přidaly 200 μ l 0,1% TRITON X-100 na 5 minut a poté jsme fixovaly 200 μ l 4% paraformaldehydu po dobu 5 minut. Po proběhnuté lýze jsme sklíčka promyly 3x PBS pufrem.

Preparáty na sklíčkách jsme blokovaly a barvily pomocí protilátek (bakterie: králičím anti-tularemským sérem a anti-rabbit Alexa FluorTM 594 DAR, fúzní protein: anti-HA tag-FITC) stejným postupem, jako při barvení bakterií (viz kapitola 3.2.20). Abychom zviditelnily jádra eukaryotních buněk, na skla jsme pipetovaly 200 μ l DAPI roztoku ředěného 3000x v destilované vodě. Na jaderné struktury jsme nechaly roztok vázat 5 minut a posléze jsme opět důkladně promyly PBS pufrem (3x). Sklíčka jsme po vyndání z panelů lehce osušily, na preparáty nanasly montovací roztok ProLongTM Gold Antifade Mountant (k. č. P10144; Thermo Fisher Scientific) a přiložily na podložní skla. Hotové preparáty jsme nechaly do druhého dne zaschnout při pokojové teplotě bez přístupu světla a poté uchovávaly při 4 °C.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je součástí projektu, který si klade za cíl ověřit, zda je protein HU bakterie *F. tularensis* secernován. HU protein patří mezi DNA vazebné proteiny a bylo prokázáno, že delece genu kódujícího HU protein vede k oslabení virulence bakterie. Lze se domnívat, že pokud by byl HU protein bakterií secernován, mohl by se následně vázat na hostitelskou DNA.

Nejprve jsme sekvenci HU proteinu prohledávaly pomocí programu cNLS Mapper (dostupný na webových stránkách http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi). Program slouží k vyhledávání sekvencí, které zajišťují transport proteinu do jádra (NLS z angl. Nucleoid Leader Sequence). Zjistily jsme, že HU protein takovou sekvenci obsahuje. Na základě tohoto výsledku jsme se rozhodly připravit zkrácený HU protein, který by obsahoval pouze NLS sekvenci fúzovanou s GFP, a sledovat jeho osud v bakteriální buňce a poté případně osud proteinu po infekci hostitelských buněk.

4.1 *In silico* analýza

Kompletní sekvenci genu kódujícího HU protein jsme našly v databázi NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_019551.1?report=fasta&from=876054&to=876326): ATGAACAAGAGTGAATTAGTAAGTGCT**ATAGCTAAAGAAGCAGATGTTACTAAAGAAGTTGCTAGCAACACTCTAGATGCTACTATTGCGGCAGTAACTAAAGCTTTAAAAAAT**GGTGATAGCGTAACTCTAGTAGGTTTTGGTACTTTTCAGGTAAAGAAAGAAGTCCTAGAGAGGGTAGAAACCCAAAGACTGGTGAACTATTAAGATCCCTGCTTCTAAAGTTCCTAGCTTTAAAGCTAGTAAGGGTCTTAAAGACGCTGTA
AAATAA.

Programem cNLS Mapper jsme vygenerovaly DNA sekvenci, která by měla být zodpovědná za transport HU proteinu do jádra hostitelských buněk. Tuto sekvenci jsme pojmenovaly HU-NLS (v sekvenci celého genu označena červeně): ATAGCTAAAGAAGCAGATGTTACTAAAGAAGTTGCTAGCAACACTCTAGATGCTACTATTGCGGCAGTAACTAAAGCTTTAAAAAAT.

4.2 Izolace chromozomální DNA

Ihned na začátku práce jsme si vyizolovaly chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 pomocí Wizard® Genomic DNA Purification Kitu. Tato DNA sloužila jako templát pro PCR reakci. Koncentraci izolované DNA jsme měřily spektrofotometricky na UV-VIS – viz Tab. č. 14.

Tab. č. 14 - Koncentrace izolované chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC 200.

vzorek (kit)	koncentrace (ng/μl)	Čistota A 260/280
1 (Wizard® Kit)	49,5	1,739

4.3 PCR s překrývajícími se konci

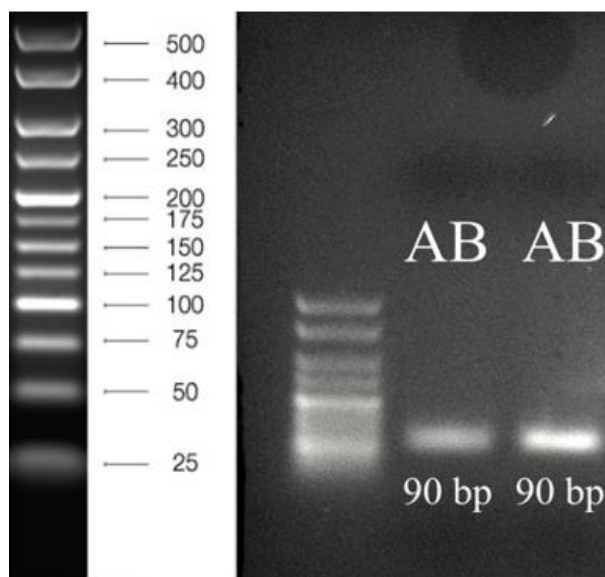
Nejprve jsme navrhly primery pro amplifikaci kódující sekvence HU_NLS a pro fúzi s GFP PCR s překrývajícími se konci (tzv. „overlap“ PCR reakcí) - viz Obr. 9.

Podle chromozomální DNA *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 jsme s pomocí primerů HU_NLS_(AseI)_Fw - tj. primeru A a HU_NLS_Rev - tj. primeru B, amplifikovaly HU_NLS sekvenci (AB produkt). Templátem pro syntézu CD fragmentu (GFP) byl plazmid pKK_289_Km_GFP (primery GFP_Fw - tj. primer C a GFP_(SacI)_Rev - tj. primer D). Primery HU_NLS_Rev - tj. primer B a GFP_Fw - tj. primer C, nesly vzájemně komplementární úseky. Fragmenty HU_NLS a GFP jsme přečistily z agarózového gelu a použily jako templát pro „overlap“ PCR s primery HU_NLS_(AseI)_Fw - tj. primerem A a GFP_(SacI)_Rev - tj. primerem D pro amplifikaci AD produktu.

Po amplifikaci jsme fragment AB separovaly na 2% agarózovém gelu (viz Obr. 15), fragment CD na 1% agarózovém gelu (viz Obr. 16) a po izolaci jsme je použily jako templát pro syntézu AD fragmentu. Velikosti jednotlivých fragmentů AB a CD jsou uvedeny v Tab. č. 15.

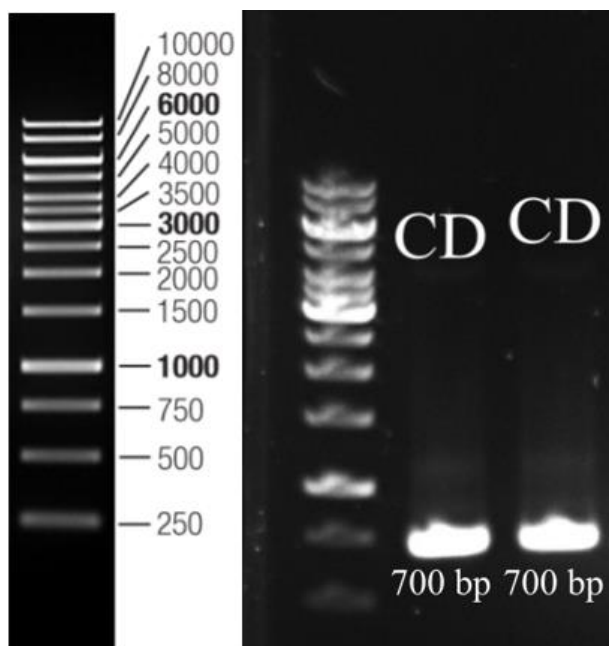
Tab. č. 15 - Velikosti jednotlivých fragmentů AB a CD.

fragment	přibližné velikosti fragmentů [bp]
AB	90
CD	700



Obr. 15 - Agarózová elektroforéza po amplifikaci úseku AB.

Pro úsek AB byl využit velikostní marker HyperLadder™ 25 bp, pro fragment CD jsme využili standard O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (viz Obr. 16).

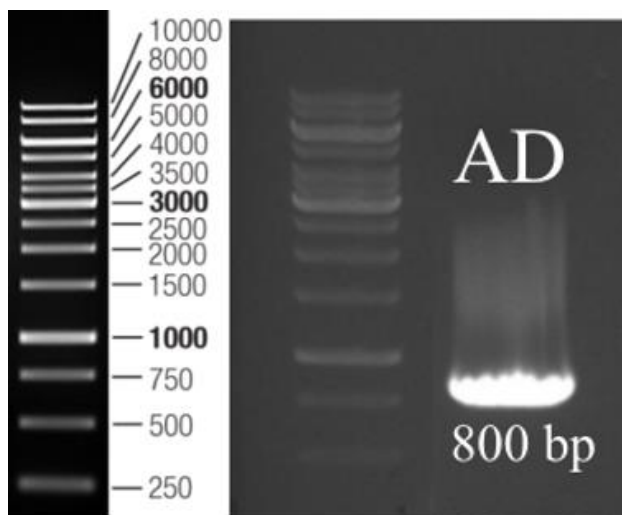


Obr. 16 - Agarózová elektroforéza po amplifikaci úseku CD.

K amplifikaci AD fragmentu jsme využily metodu „overlap“ PCR (viz Obr. 17). Jak již bylo zmíněno výše, jako templát pro reakci jsme použily amplifikované úseky AB a CD v ekvimolárním množství. Celková velikost úseku AD a změřená koncentrace jednotlivých fragmentů AB a CD je uvedena v Tab. č. 16.

Tab. č. 16 – Koncentrace fragmentů AB a CD a celková velikost úseku AD pro overlap PCR.

název fragmentu	koncentrace [ng/μl]	velikost [bp]
AB	9,5	AB + CD = 800 => AD
CD	21,5	

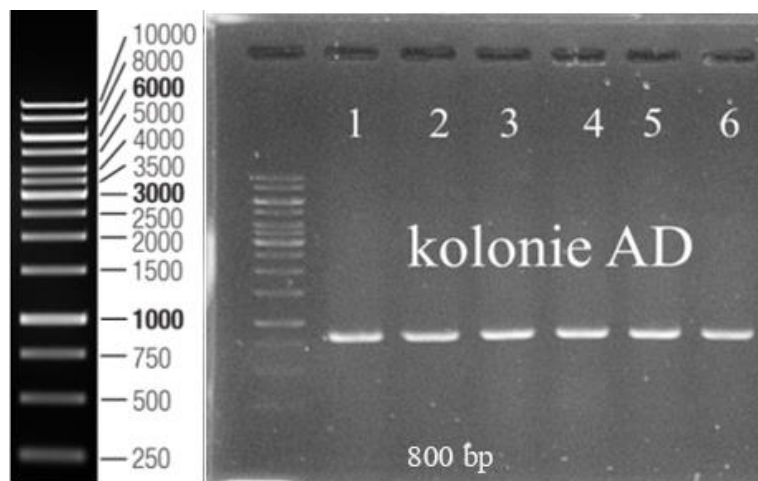


Obr. 17 - Amplifikace AD fragmentu pomocí overlap PCR.

4.4 TOPO klonování

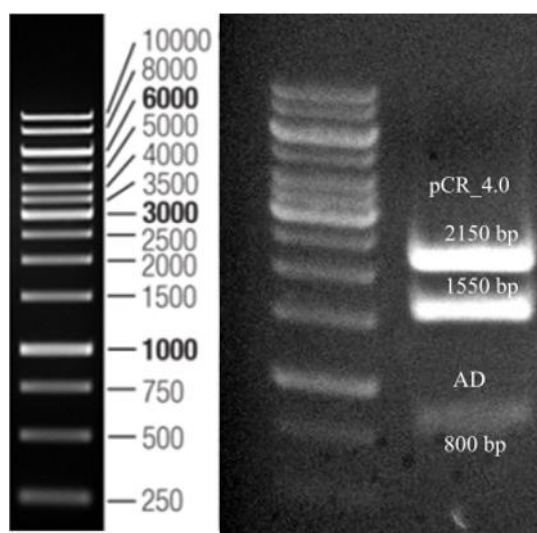
K amplifikaci úseků AB, CD, a také pro „overlap“ PCR AD fragmentu, jsme použily enzym *PfuUltra II* polymerázu. Tato polymeráza disponuje korektorskou aktivitou, což vede k eliminaci chyb během polymerázové reakce, a na rozdíl od *Taq* polymerázy syntetizuje fragmenty s tupými konci. K experimentu bylo zapotřebí, aby AD úsek měl na 3' konci -A přesahy a byl tak komplementární k 3'-T koncům pCR[®]_4.0_TOPO plazmidu (viz Obr. 12). K tomu, abychom docílily 3'-A konců u PCR produktu, jsme využily enzymu *Taq* polymerázy a takto upravený AD fragment vložily do pCR[®]_4.0_TOPO plazmidu během tzv. „TOPO“ klonování.

Nově vzniklým vektorem s AD fragmentem (AD_pCR[®]_4.0_TOPO) jsme transformovaly chemokompetentní buňky *E. coli* TOP10 a směs jsme vysely na LB plotny s kanamycinem. K ověření, zdali se fragment AD správně včlenil do zvoleného vektoru, jsme provedly PCR na koloniích za využití primerů A a D. Pro ověření bylo náhodně vybráno 6 kolonií. U kolonií, které jsou pozitivní a nesou nejpravděpodobněji inzert, se v 1% agarózovém gelu objevil silný proužek, odpovídající velikosti AD produktu (viz Obr. 18). Jako velikostní marker byl využit O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.



Obr. 18 - Ověření přítomnosti fragmentu AD v koloniích bakterie *E. coli* TOP10 transformovaných vektorem AD_pCR[®]_4.0_TOPO.

Jelikož všechny kolonie vyšly pozitivní, z kolonií č. 5 a č. 1 jsme vytvořily bakteriální zásobní kulturu a izolovaly plazmid pomocí QIAprep[®] Spin Miniprep Kitu. Izolovaný plazmid AD_pCR[®]_4.0_TOPO jsme podrobily kontrolnímu restriktivnímu štěpení enzymy *AseI* a *SacI* (viz Obr. 19). Jako standard jsme využily O'Gene Ruler 1kb DNA Ladder. Správnost sekvence fragmentů AD jsme ověřily i sekvenací.

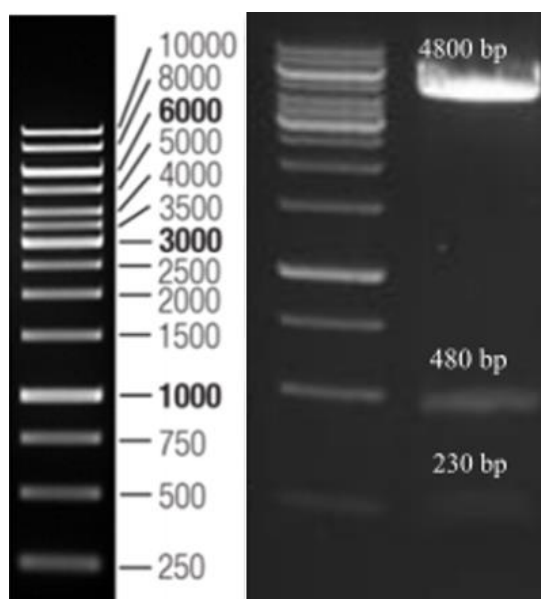


Obr. 19 – Kontrolní restriktivní štěpení enzymy *AseI* a *SacI*.

AseI rozpoznávací místo je přítomné třikrát i v původním pCR[®]_4.0_TOPO vektoru (pozice 48 bp, 107 bp a 2449 bp). Proto očekáváme po štěpení *AseI/SacI* 6 fragmentů DNA (2150 bp, 1550 bp, AD fragment o velikosti 800 bp a další tři fragmenty o velikosti cca 50 bp, 60 bp a 180 bp). Vzhledem k použitému 1% agarózovému gelu jsme očekávaly, že viditelné budou pouze tři nejdelší fragmenty.

4.5 Příprava vektoru AD_pKK_289_Km_GFP a transformace bakterií *E. coli* XL-1 Blue

AD fragment vyštěpený z plazmidu AD_pCR[®]_4.0_TOPO – klon č. 5 pomocí restriktáz *AseI* a *SacI* (viz Obr. 19) jsme následně klonovaly do vektoru pKK_289_Km_GFP. Vektor pKK_289_Km_GFP jsme před vložením inzertu AD musely upravit restriktčními enzymy *SacI* a *NdeI*, čímž jsme z vektoru vyštěpily fragment GFP (viz Obr. 20). Jako standard jsme využily O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. Enzymy *AseI* a *NdeI* tvoří kompatibilní kohezivní konce, tudíž je možné ligovat fragment opravovaný *AseI* restriktázou do vektoru štěpeného enzymem *NdeI*.



Obr. 20 - Elektroforéza vektorového plazmidu pKK_289_Km po restrikci enzymy *SacI* a *NdeI*.

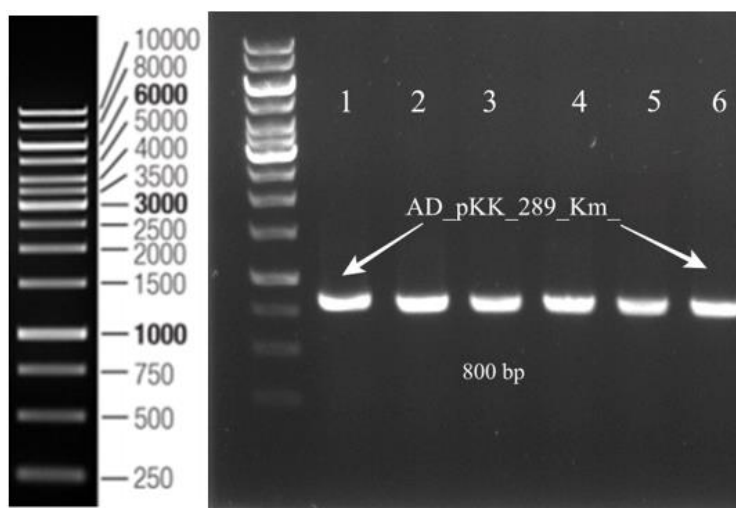
Přibližná velikost plazmidu je 5500 bp, po štěpení tohoto plazmidu restriktčními enzymy *SacI* a *NdeI* je pro nás důležitý fragment o velikosti 4800 bp (plazmid bez obsahu GFP). Hůře rozlišitelné proužky o velikostech 480 bp a 230 bp odpovídají fragmentům GFP. Uvnitř sekvence GFP je další rozpoznávací místo pro *NdeI*.

Vektor pKK_289_Km a fragment AD jsme po restriktčním štěpení izolovaly, změřily jsme jejich koncentraci a využily k ligaci pomocí Quick Ligase (New England Biolabs[®], Inc.). K výpočtu potřebných volných konců DNA fragmentů pro ligaci jsme využily kalkulátor ligace a přepočítly jsme si množství na μl (viz Tab. č. 17).

Tab. č. 17 – Komponenty pro ligační směs v poměru 3:1.

množství AD fragmentu na 10 μl směsi	12,5 ng \rightarrow odpovídá koncentraci 3,6 ng/ μ l \rightarrow do směsi 3 μ l
množství vektoru pKK na 10 μl směsi	25,73ng \rightarrow odpovídá koncentraci 25 ng/ μ l \rightarrow do směsi 1 μ l
2x koncentrovaný Quick Ligase Buffer [μl]	5
Quick Ligase [μl]	0,5

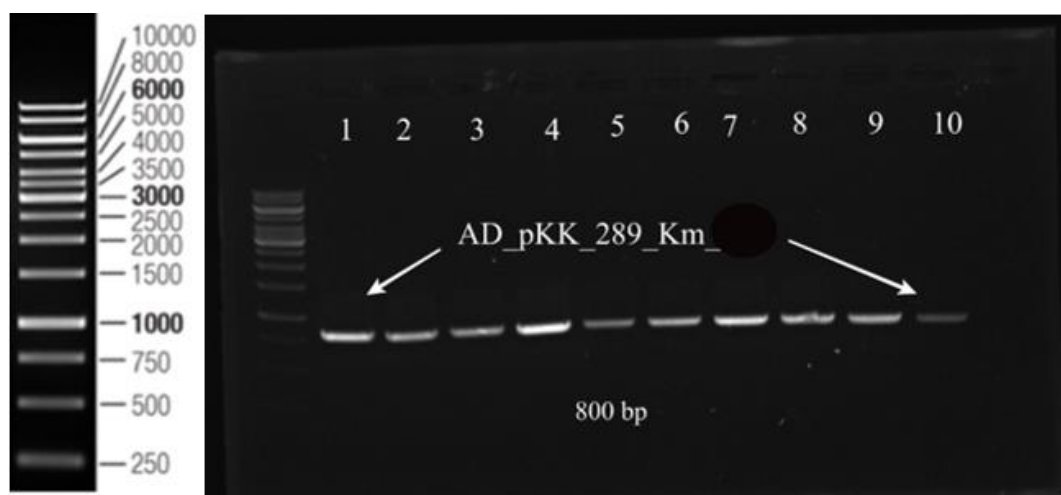
Ligací vznikl plazmid AD_pKK_289_Km, kterým jsme transformaly komerčně dostupné chemokompetentní bakterie *E. coli* XL-1 Blue a ty vysely na selektivní LB plotny s kanamycinem. Získané pozitivní kolonie jsme testovaly pomocí PCR na koloniích a výsledek jsme vizualizovaly na 1% agarózovém gelu k ověření přítomnosti fragmentu AD o velikosti 800 bp, který pozitivně transformované bakterie nesou (viz Obr. 21). Z těchto pozitivních kolonií jsme vyhotovily zásobní kulturu (z kolonie č. 1) a izolovaly jsme plazmid AD_pKK_289_Km, který byl použit pro elektroporaci *F. tularensis*.



Obr. 21 - PCR na koloniích *E. coli* XL-1 Blue, plazmid AD_pKK_289_Km. Standard O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

4.6 Elektroporace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

Plazmid AD_pKK_289_Km jsme pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu vyizolovaly, změřily spektrofotometricky jeho koncentraci (99 ng/μl) a 1 μl použily pro elektroporaci *F. tularensis* FSC200. Postupovaly jsme podle již výše popsaného postupu pro elektroporaci (viz kapitola 3.2.12). Po elektroporaci následovala PCR na koloniích pro ověření přítomnosti plazmidu v bakteriích *F. tularensis* FSC200. Vizualizaci jsme provedly opět pomocí 1% agaróзовé elektroforézy (viz Obr. 22). Klon č. 4 jsme použily k vytvoření zásobní zmražené kultury.



Obr. 22 - PCR na koloniích *F. tularensis* FSC200, plazmid AD_pKK_289_Km. Standard O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder.

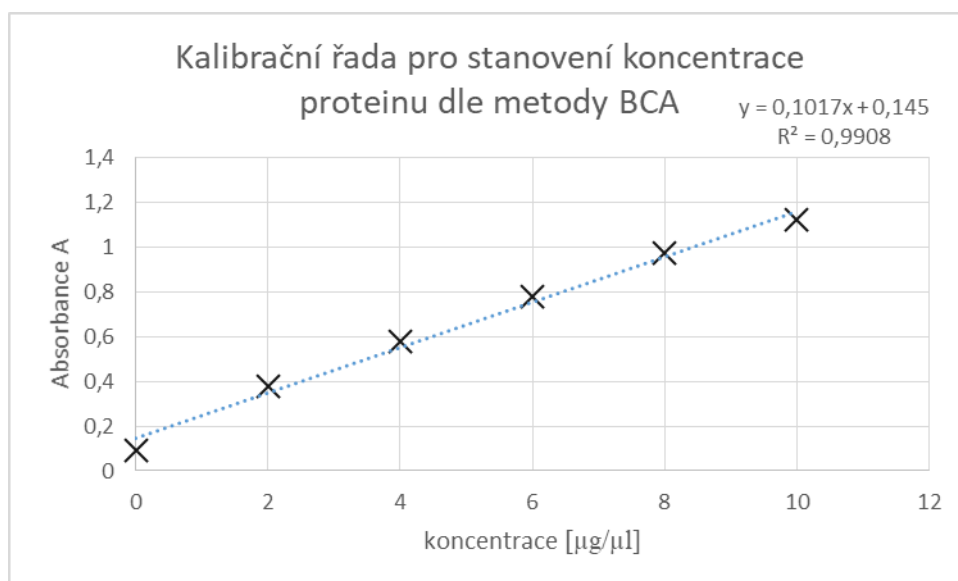
4.7 Kultivace a frakcionace *F. tularensis* nesoucí fúzní protein

Ze zmražené kultury *F. tularensis* FSC200 a připravené kultury *F. tularensis*, exprimující požadovaný protein (HU-NLS_GFP), jsme zaočkovaly do Chamberlainova média a bakterie kultivovaly do OD_{600 nm} 1. Kultury jsme centrifugovaly a pelety bakterií použily pro přípravu celobuněčného lyzátu. Supernatant (kultivační médium) jsme filtrovaly, abychom odstranily případné zůstávající bakterie, poté koncentrovaly a uchovaly pro pozdější použití. Bakterie jsme lyzovaly pomocí přístroje French Pressure Cell Press a z celobuněčného lyzátu ultracentrifugací oddělily cytoplasmatickou a membránovou proteinovou frakci. Dříve než se jednotlivé frakce podrobily SDS-PAGE a posléze imunodetekci, změřily jsme koncentraci proteinů pomocí metody BCA. Nejdříve jsme spektrofotometricky proměřily připravenou kalibrační řadu (viz Tab. č. 18) a posléze z rovnice regrese z grafu (viz Graf č. 1) vypočetly koncentraci proteinů

ve vzorcích. V tabulce níže (Tab. č. 19) je uvedena změřená absorbance a koncentrace u jednotlivých izolovaných proteinových frakcí FSC200 a HU_NLS_GFP.

Tab. č. 18 - Změřená absorbance u kalibrační řady, metoda BCA.

standard [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	absorbance A
0	0,094
2	0,378
4	0,576
6	0,779
8	0,974
10	1,119



Graf č. 1 Kalibrační řada, metoda BCA.

Tab. č. 19 - Naměřená absorbance a koncentrace u jednotlivých proteinových frakcí.

vzorek	absorbance	koncentrace [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1. FSC200_WCL*	0,279	1,318
2. FSC200_C**	0,176	0,304
3. FSC200_M***	0,521	3,698
4. FSC200_FM****	0,436	2,862
5. HU_NLS_WCL	0,193	0,472
6. HU_NLS_C	0,446	2,960
7. HU_NLS_M	0,467	3,167
8. HU_NLS_FM	0,336	1,878

*WCL – celobuněčný lyzát

** C – cytoplasmatická frakce

*** M – membránová frakce

**** FM – filtrát média

4.8 SDS-PAGE proteinů

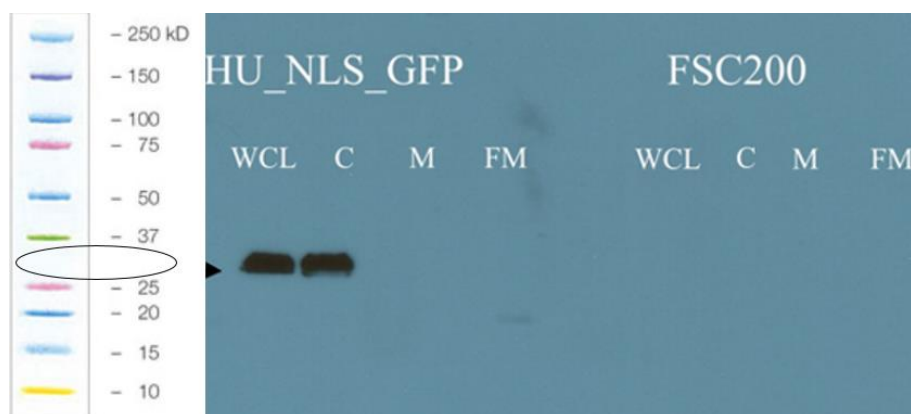
Z vypočtené koncentrace jsme si připravily směsi jednotlivých vzorků (přepočteno na množství 10 μg) o celkovém objemu 30 μl pro SDS-PAGE elektroforézu (viz Tab. č. 20) a nechaly 5 minut inkubovat při 95 °C. Vzorky jsme dělily pomocí 15% akrylamidového gelu a po separaci proteiny přenesly na PVDF membránu pomocí Western-blottingu.

Tab. č. 20 - Vypočtené množství jednotlivých vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu.

Vzorek č.	vzorkový pufr [μl]	množství vzorku [μl]	destilovaná voda [μl]
1	10	7,6	12,4
2	10	20	-
3	10	2,70	17,3
4	10	3,49	16,51
5	10	21,19	-
6	10	3,38	16,62
7	10	3,16	16,84
8	10	5,32	14,68

4.9 Protilátková analýza HU_NLS_GFP

K vizualizaci exprese NLS sekvence HU proteinu (HU_NLS) fúzované s GFP (z angl. Green Fluorescent Protein) jsme využily primární protilátku proti GFP (monoclonal Rabbit Immunoglobulins anti-GFP) v kombinaci s polyklonální prasečí anti-králičí IgG protilátkou, konjugovanou s HRP (z angl. HorseRadish Peroxidase). GFP se sestává z 238 AMK a jeho velikost se pohybuje okolo necelých 27 kDa. Vytvořený fúzní konstrukt (HU_NLS_GFP, cca 30 kDa) se podařilo pomocí protilátkové detekce prokázat pouze v celobuněčném lyzátu a cytoplasmatické proteinové frakci *F. tularensis* FSC200/HU_NLS_GFP (viz Obr. 23).

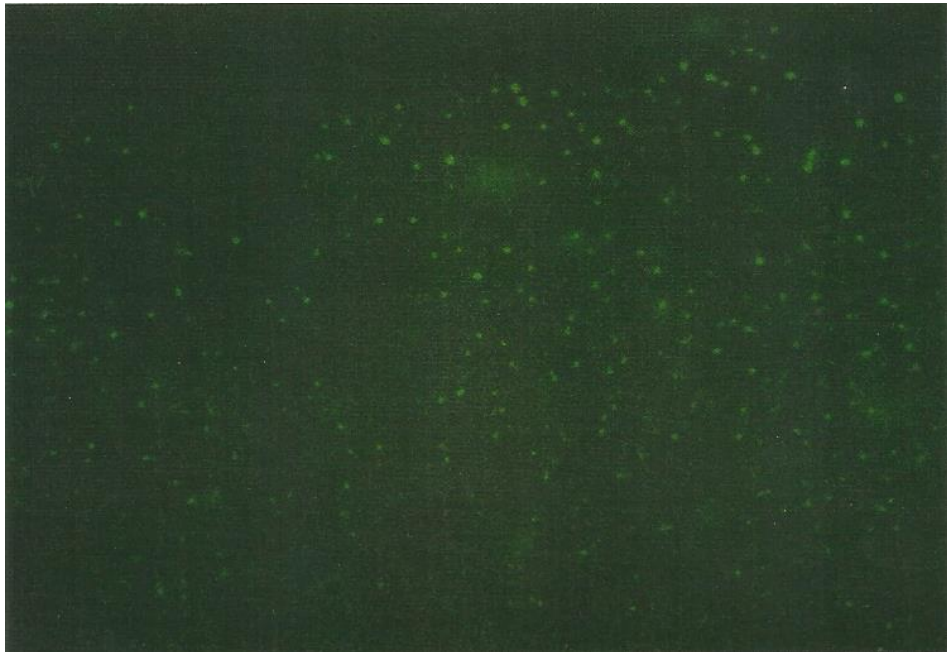


Obr. 23 – Western-blotting HU_NLS_GFP (velikost cca 30 kDa).

WCL – celobuněčný lyzáat; C – cytoplasmatická frakce; M – médium; FM – filtrát média.

4.9.1 Průkaz HU_NLS_GFP pomocí fluorescenční mikroskopie

K vizualizaci HU_NLS_GFP jsme využily primární protilátku proti GFP - monoklonální králičí protilátku anti-GFP v kombinaci se sekundární protilátkou proti králičím IgG – anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 GOAT (zelená fluorescence) – viz Obr. 24.



Obr. 24 - Zeleně fluoreskující HU_NLS_GFP.

Předpokládáme, že tento reportérový gen GFP, který jsme chtěly využít pro vizualizaci HU_NLS, díky své velikosti mohl změnit konformaci cílového proteinu natolik, že nebyl schopen změnit svoji lokalizaci.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodly vytvořit jiný konstrukt, ve kterém jsme HU_NLS fúzovaly na C-konci s HA kotvou. Vzhledem k velikosti kotvy jsme předpokládaly, že nebude ovlivňovat konformaci HU_NLS.

4.10 Příprava *F. tularensis* exprimující HU_NLS_HA

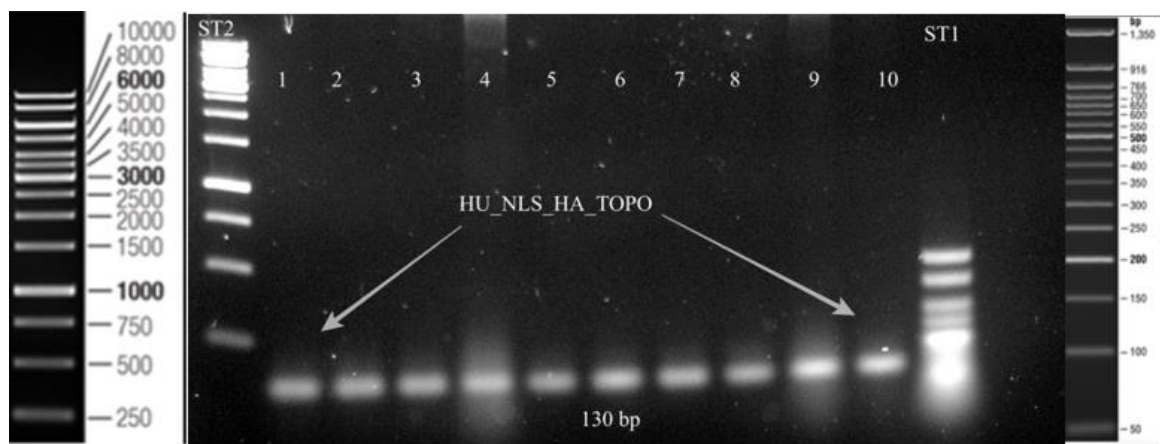
Pro přípravu nového fúzního konstruktů jsme nejprve navrhly reverzní primer, který kódoval i sekvenci HA kotvy (HU_NLS_HA_(SacI)_Rev - uveden v seznamu primerů). Jako forward primer jsme mohly využít primer HU_NLS_(AseI)_Fw, který jsme navrhly pro fúzi HU_NLS s GFP. Jako templát pro PCR byla použita chromozomální DNA *F. tularensis* FSC200

a syntéza DNA fragmentu probíhala pomocí *PfuUltra* II DNA polymerázy analogicky jako v případě syntézy produktu AB (viz Tab. č. 4 a Tab. č. 5). PCR produkt jsme přechistily, dosyntetizovaly 3'-A přesahy a vložily do pCR®_4.0_TOPO plazmidu během tzv. „TOPO“ klonování.

Kroky, ve kterých se základní postup liší, je popsán níže.

4.10.1 PCR na koloniích *E. coli* TOP10

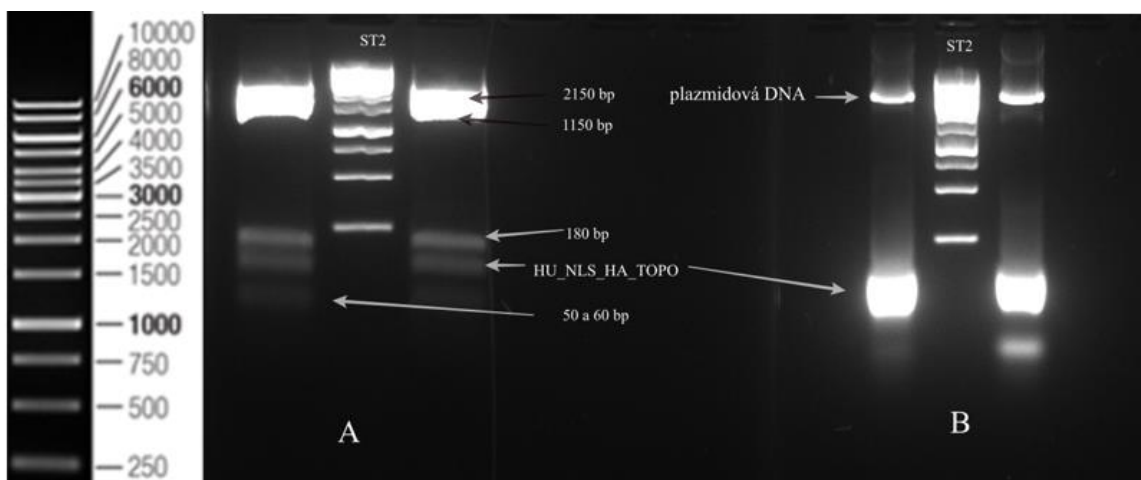
Získané transformanty jsme otestovaly pomocí PCR na koloniích (HU_NLS_(*Ase*I)_Fw a HU_NLS_HA). Jako standard č. 1 jsme použily směs 0,5 µl 50 bp DNA Ladder s 1 µl 6x Loading Dye Purple, no SDS a 4,5 µl destilované vody, standard č. 2 O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder. Místo obvyklé interkalační barvy jsme tentokrát použily citlivější SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain 10 000X Concentrate in DMSO (k. č. S11494, Invitrogen), protože výsledný produkt má pouze 130 bp a měly jsme obavu, že by s použitím SYBR Safe DNA Gel Stain nebyl dostatečně viditelný (viz Obr. 25).



Obr. 25 - PCR na koloniích *E. coli* TOP 10/HU_NLS_HA_TOPO.

Všech deset kolonií vyšlo pozitivních, což dokazuje, že ve všech testovaných koloniích *E. coli* TOP10 došlo ke správnému vložení inzertu. Z kolonie č. 1 jsme vytvořily zásobní kulturu a izolovaly plazmid HU_NLS_HA_TOPO pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu (koncentrace 81 ng/µl). Podle změřené koncentrace jsme namíchaly restriční směs a plazmid HU_NLS_HA_TOPO jsme podrobily restričnímu štěpení pomocí enzymů *Ase*I a *Sac*I a rovněž provedly kontrolní PCR reakci na plazmidové DNA s primery HU_NLS_(*Ase*I)_Fw a HU_NLS_HA_(*Sac*I)_Rev (viz Obr. 26). Jako velikostní marker jsme použily O'Gene Ruler

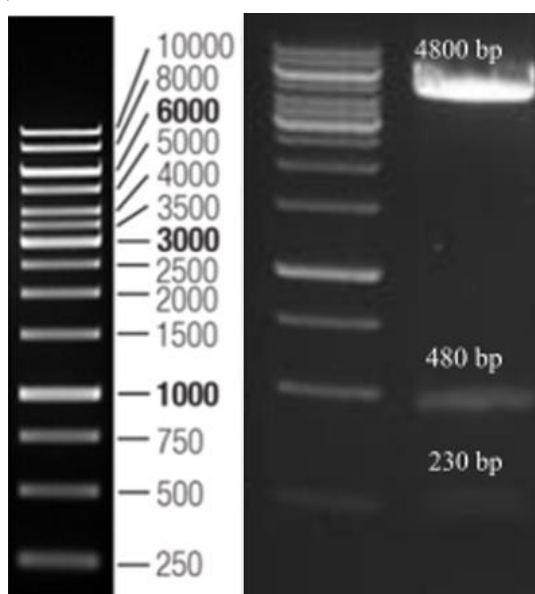
1 kb DNA Ladder na 2% agarózovém gelu. Správnost DNA sekvence kódující fúzní protein jsme ověřily sekvenací.



Obr. 26 – Restrikční štěpení plazmidu HU-NLS-HA-TOPO enzymy *AseI* a *SacI* (A) s kontrolní PCR reakcí (B).

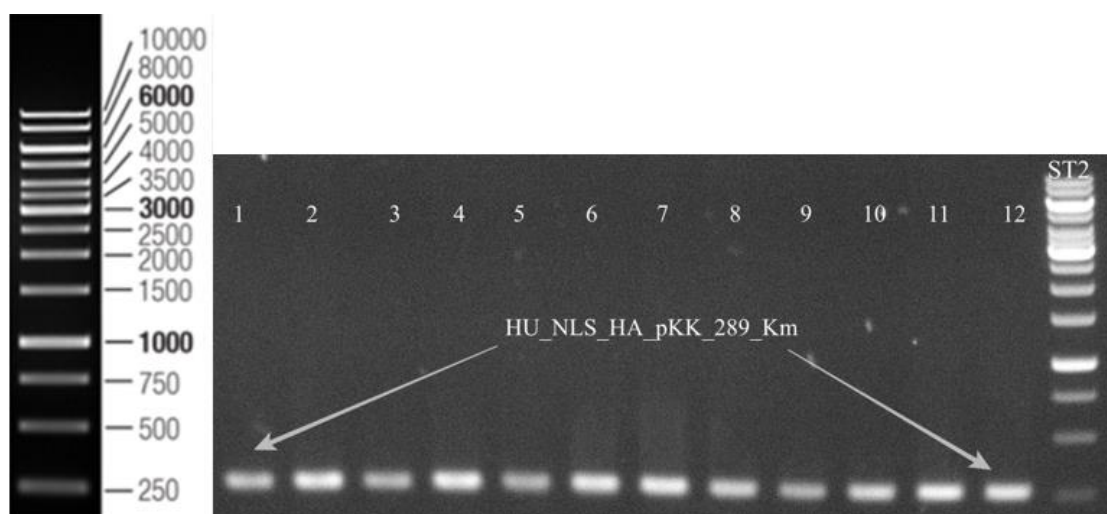
4.10.2 Příprava vektoru HU-NLS-HA-pKK_289_Km a transformace bakterií *E. coli* XL-1 Blue

HU-NLS-HA fragment, jenž jsme pomocí restriktáz *AseI* a *SacI* vyštěpily z plazmidu HU-NLS-HA-TOPO, jsme klonovaly do vektoru pKK_289_Km. Než jsme mohly vložit náš inzert do vektoru, samotný vektor pKK_289_Km_GFP jsme upravily restriktázami *SacI* a *NdeI*. Touto úpravou jsme vyštěpily fragment GFP a následně provedly preparativní elektroforézu (viz Obr. 27).



Obr. 27 – Elektroforéza vektorového plazmidu pKK_289_Km po restrikci enzymy *SacI* a *NdeI*.

Naštěpený plazmid pKK_289_Km jsme vyizolovaly, změřily jeho koncentraci (113 ng/μl) a ligovaly ho s inzertem pomocí Quick Ligase. Ligační směsí jsme posléze transformovaly *E. coli* XL-1 Blue a po tranformaci bakterie s inzertem vysely na LB plotny s kanamycinem. Na 1% gelu jsme si ověřily pozitivní kolonie, které se testovaly pomocí PCR na koloniích (viz Obr. 28). Jako primery pro PCR reakci jsme použily HU_NLS_(AseI)_Fw a pKK_R3. Primer pKK_R3 je komplementární k sekvenci pKK_289_Km vektoru, nachází se cca 100 bp za klonovaným fragmentem HU_NLS_HA (celková velikost cca 230 bp). Jako velikostní marker jsme použily standard č. 2.

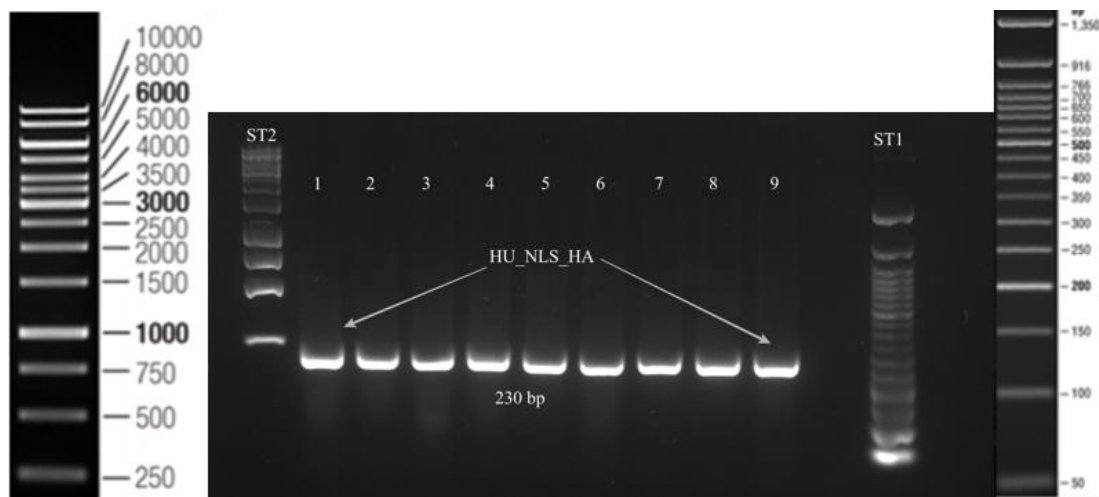


Obr. 28 – PCR na koloniích *E. coli* XL-1 Blue/HU_NLS_HA_pKK_289_Km.

Z pozitivní kolonie č. 2 (zde pozitivních všech 12 kolonií) jsme izolovaly plazmid HU_NLS_HA_pKK_289_Km (QIAprep® Spin Miniprep Kit, koncentrace 122 ng/μl). Ten jsme využily pro následnou elektroporaci do *F. tularensis* FSC200.

4.10.3 Elektroporace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

Podle již výše popsaného návodu jsme provedly elektroporaci *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 s následnou PCR na koloniích (použité primery HU_NLS_(AseI)_Fw a pKK_3R), která nám sloužila k ověření přítomnosti plazmidu v bakteriích *F. tularensis*. Jako důkaz nám posloužila 2% agarózová elektroforéza se standardy č. 1 a 2 – viz Obr. 29. Z klonu č. 5 jsme připravily zmraženou kulturu.



Obr. 29 - PCR na koloniích *F. tularensis* FSC200/HU-NLS_HA.

4.10.4 SDS-PAGE a protilátková analýza HU-NLS_HA

Po kultivaci *F. tularensis* nesoucí fúzní protein HU-NLS_HA a přípravě jednotlivých proteinových frakcí (analogicky viz kapitola 4.7) jsme pro separaci proteinů připravily nízkomolekulární proteinový gel (očekávaná velikost sledovaného fúzního proteinu je cca 4 kDa) podle Tab. č. 12 a Tab. č. 13 v kapitole 3.2.17.

K průkazu fúzního proteinu HU-NLS_HA jsme použily monoklonální králičí protilátku namířenou proti HA kotvě konjugovanou s HRP.

Bohužel tento fúzní protein se nám nepodařilo nalézt v lyzátu *F. tularensis*. Vzhledem k tomu, že protein mohl být ve frakcích zastoupen pouze v malém množství, rozhodly jsme se fúzní protein HU-NLS_HA nabohatit pomocí purifikace s využitím agarózových kuliček s imobilizovanou protilátkou namířenou proti HA kotvě (PIERCE™ HA epitope TAG antibody agarose conjugate 2 – 2. 2. 14, k. č. 26182; Thermo Scientific). Nicméně ani tímto přístupem se nám protein nepodařilo prokázat.

V poslední době několik kolegů z Katedry molekulární patologie a biologie řešilo problém s nestabilitou či degradací „shuttle“ vektoru pKK_289_Km pokud nesl fúzní protein s HA kotvou. Proto jsme se rozhodly, že zkusíme připravit ještě jeden konstrukt, tentokrát s histidinovou kotvou (HU-NLS_HIS). Důvodem, proč jsme fúzní protein HU-NLS_HA neprokázaly je i možnost špatného optimalizování podmínek pro separaci proteinů v nízkomolekulárním gelu - respektive to, že protein z gelu vyputoval před čelem.

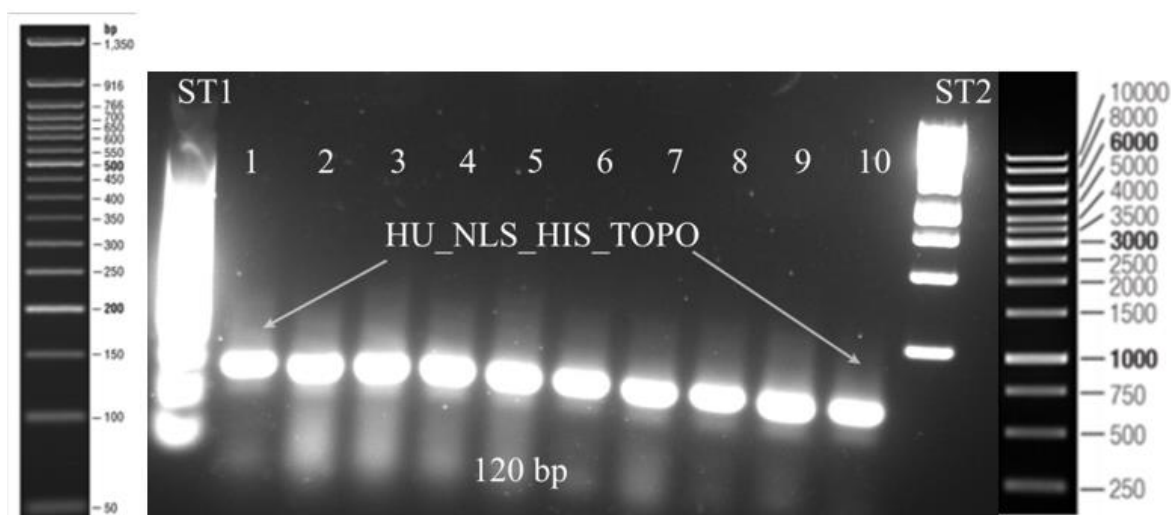
4.11 Příprava *F. tularensis* exprimující HU-NLS_HIS

Pro přípravu nového fúzního konstruktů jsme nejprve navrhly reverzní primer, který kódoval i sekvenci HIS kotvy (HU-NLS_HIS_(*SacI*)_Rev - uveden v seznamu primerů). Jako forward primer jsme mohly opět využít primer HU-NLS_(*AseI*)_Fw, který jsme navrhly pro fúzi HU-NLS s GFP. Jako templát pro PCR byla použita chromozomální DNA *F. tularensis* FSC200 a syntéza DNA fragmentu probíhala pomocí *PfuUltra* II DNA polymerázy analogicky jako v případě syntézy produktu AB (viz Tab. č. 4 a Tab. č. 5). PCR produkt jsme přečistily, dosyntetizovaly 3'-A přesahy a vložily do pCR®_4.0_TOPO plazmidu během tzv. „TOPO“ klonování.

Kroky, ve kterých se základní postup liší, je popsán níže.

4.11.1 PCR na koloniích *E. coli* TOP10

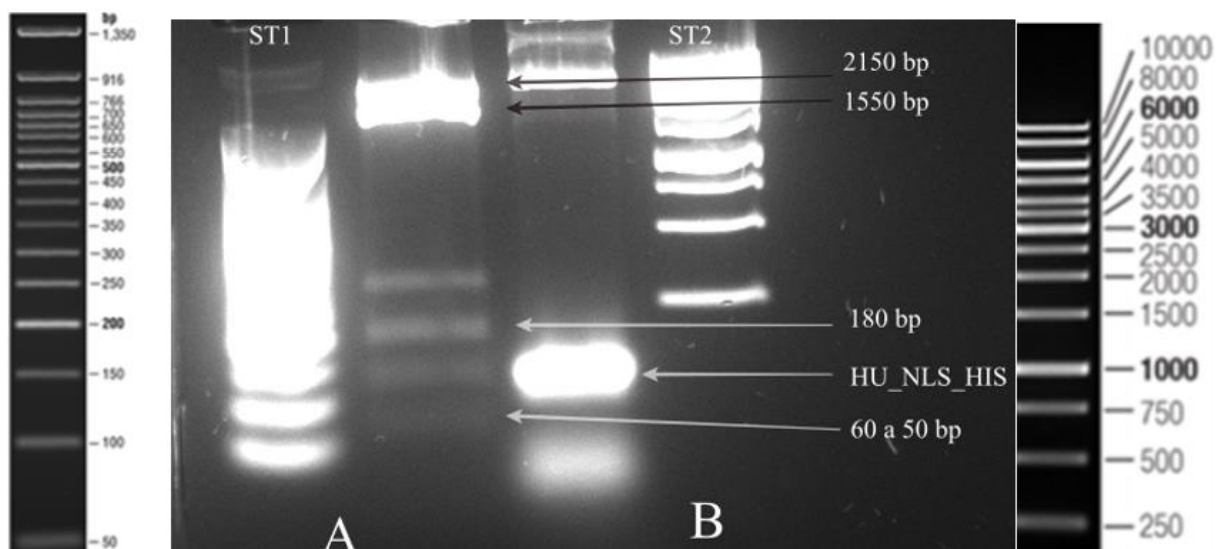
K reakci PCR jsme použily primery HU-NLS_*AseI*_Fw a HU-NLS_HIS_(*SacI*)_Rev. V elektroforetických gelech jsme pro testování užívaly opět 2 standardy, které byly již zmíněny (50 bp DNA Ladder a O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder). Jako interkalační barvu jsme taktéž použily SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain 10 000X Concentrate in DMSO. Vizualizace PCR reakce proběhla na 2% agarózovém gelu - viz Obr. 30.



Obr. 30 – PCR na koloniích *E. coli*/ HU-NLS_HIS_TOPO.

Všech deset kolonií vyšlo pozitivních, což dokazuje, že ve všech testovaných koloniích *E. coli* TOP10 došlo ke správné elektroporaci inzertu. Z kolonie č. 4 jsme vytvořily zásobní kulturu a izolovaly plazmid HU-NLS_HIS_TOPO pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu

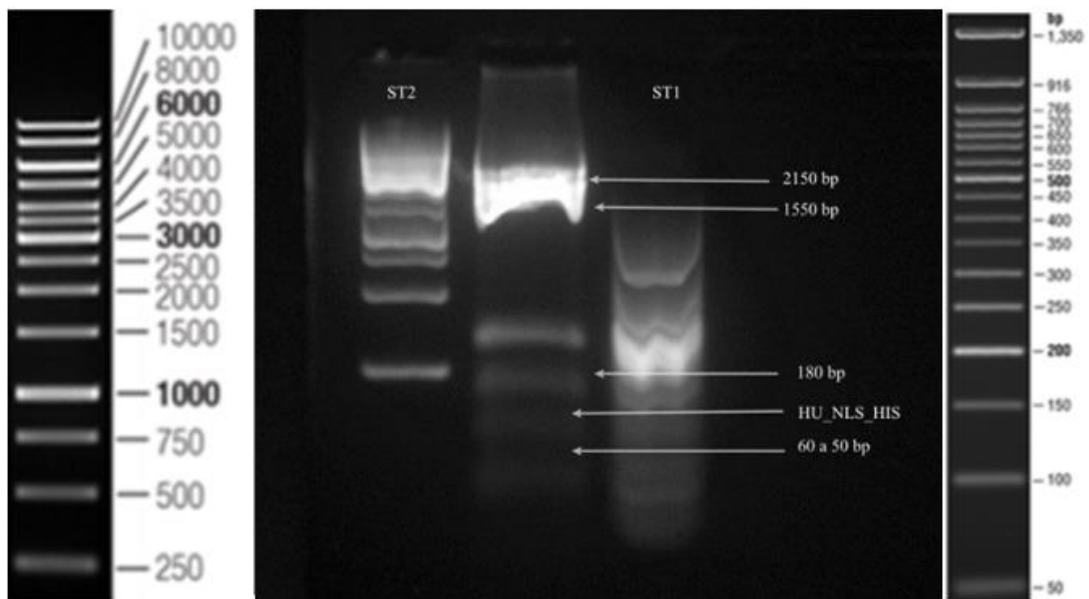
(koncentrace 91 ng/μl). Podle změřené koncentrace jsme namíchaly restriční směs a plazmid HU-NLS_HIS_TOPO jsme podrobily restričnímu štěpení pomocí enzymů *AseI* a *SacI* - viz Obr. 31. a výsledek vizualizovaly elektroforeticky na 2% agarózovém gelu. Správnost DNA sekvence kódující fúzní protein HU-NLS_HIS jsme ověřily sekvenací.



Obr. 31 - Kontrolní restrikce plazmidu HU-NLS_HIS_TOPO (A) a PCR (B).

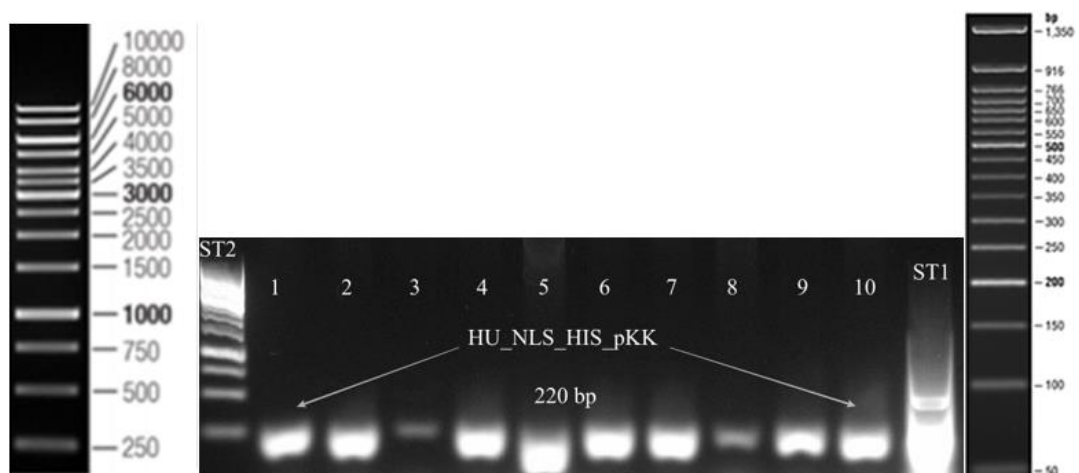
4.11.2 Příprava vektoru HU-NLS_HA_pKK_289_Km a transformace bakterií *E. coli* XL-1 Blue

Fragment HU-NLS_HIS, jsme pomocí restriktáz *AseI* a *SacI* vyštěpily z plazmidu HU-NLS_HIS_TOPO a následně klonovaly do vektoru pKK_289_Km. Správný průběh restrikce jsme si ověřily na 2% agarózovém gelu se dvěma standardy č. 1 a 2 - viz Obr. 32.



Obr. 32 – Kontrolní elektroforéza po restrikci plazmidu HU-NLS_HIS_TOPO.

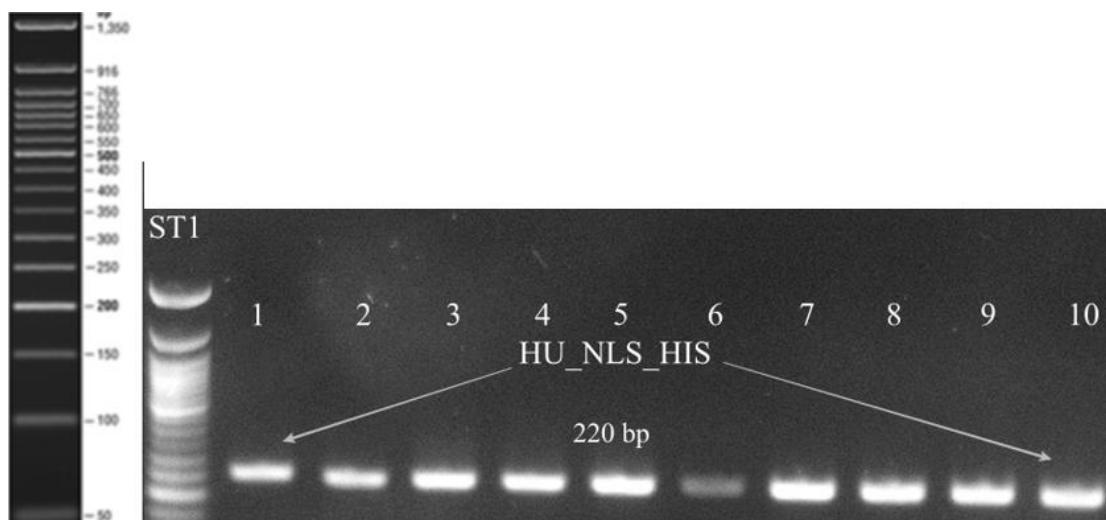
Vektor pKK_289_Km jsme izolovaly, změřily jeho koncentraci (123 ng/μl), pomocí restriktáz *NdeI* a *SacI* vyštěpily sekvenci kódující GFP a použily pro ligaci s HU-NLS_HIS pomocí Quick Ligase. Ligací vznikl plazmid HU-NLS_HIS_pKK_289_Km. Tímto připraveným plazmidem jsme transformovaly *E. coli* XL-1 Blue a po transformaci bakterie s inzertem vysely na LB plotny s kanamycinem. Na 1% gelu jsme si ověřily pozitivní kolonie, které jsme testovaly pomocí PCR na koloniích (s primery HU-NLS_(*AseI*)_Fw a pKK_R3 – očekávaná velikost produktu cca 220 bp) - viz Obr. 33. Z pozitivní kolonie č. 2 jsme vytvořily zásobní zmraženou kulturu.



Obr. 33 – PCR na koloniích *E. coli* XL-1 Blue/HU-NLS_HIS_pKK_289_Km.

4.11.3 Elektroporace *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200

Následně jsme zmraženou kulturu č. 2 zaočkowały do LB média a po kultivaci izolowały plazmid HU-NLS_HIS_pKK_289_Km (QIAprep® Spin Miniprep Kitu, koncentrace 113 ng/μl). Izolovaný plazmid jsme použily pro elektroporaci *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 a poté jsme pomocí PCR na koloniích (primery HU-NLS_(AseI)_Fw a pKKR3) testowały získané transformanty. PCR produkty jsme detekowały na 2% agarózovém gelu (viz Obr. 34). Z klonu č. 1 a 5 jsme připravily zmraženou zásobní kulturu.



Obr. 34 - PCR na koloniích *F. tularensis* FSC200/HU-NLS_HIS.

4.11.4 SDS-PAGE a protilátková analýza HU-NLS_HIS

Po kultivaci *F. tularensis* nesoucí fúzní protein HU-NLS_HIS a přípravě jednotlivých proteinových frakcí (analogicky viz kap. 4.7) jsme opět připravily nízkomolekulární proteinový gel, protože fúzní protein má pouze asi 4 kDa. Očekávaly jsme, že histidinová kotva nikterak neovlivní konformaci cílového proteinu. Nicméně ani v tomto případě se nám nepodařilo fúzní protein v jednotlivých frakcích prokázat.

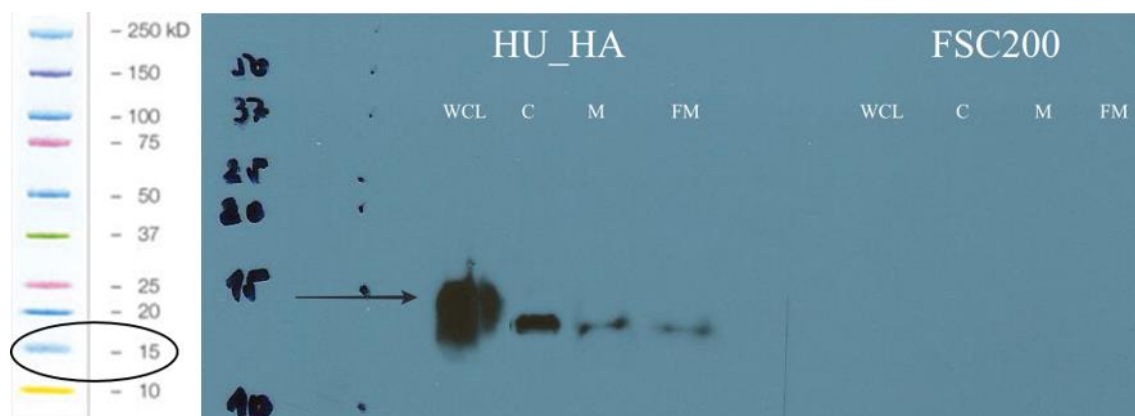
Opět jsme se pokusily fúzní protein z celobuněčného lyzátu purifikovat pomocí metalochelatačního typu afinitní chromatografie (TALON METAL Affinity Resin (k. č. 635503; Takara), ovšem neúspěšně. Důvodem, proč nemůžeme protein HU-NLS_HIS detekovat, stejně tak HU-NLS_HA detekovat ani izolovat, by mohla být příliš malá velikost fúzního proteinu (cca 4 kDa), která vede k degradaci proteinu proteázami.

Naší snahou bylo prokázat, že HU protein by mohl být přítomný jak v cytoplasmatické proteinové frakci, tak ve frakci membránové a rovněž, že je secernovaný do kultivačního média.

Z tohoto důvodu jsme přistoupily na variantu použití kmenu *F. tularensis* exprimující kompletní HU protein značený HA kotvou (HU_HA) [3].

Pomocí protilátkové analýzy (Monoclonal Rabbit Immuboglobulins, anti-HA-tag/HRP, Abcam) se nám podařilo prokázat přítomnost kompletního HU proteinu značeného HA kotvou ve všech připravených proteinových frakcích (velikost okolo 15 kDa) *F. tularensis* FSC200/HU_HA a také ve filtrátu média (viz Obr. 35). Jako negativní kontrolu jsme použily mateřský kmen *F. tularensis* FSC200. Tímto se nám nakonec tedy podařilo prokázat, že protein je bakterií secernován.

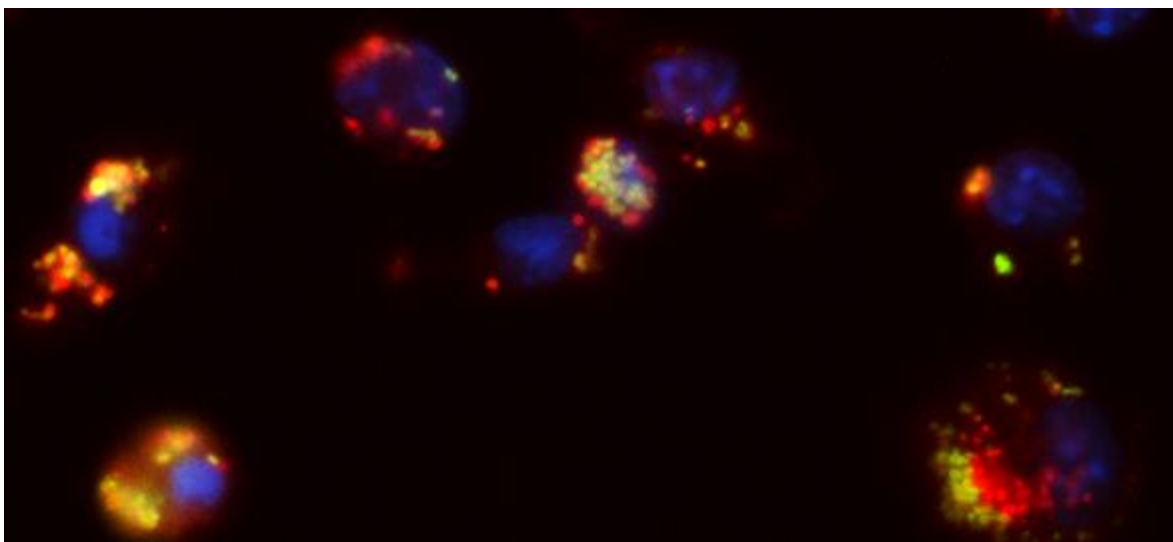
Z našich dosažených výsledků předpokládáme, že sekvence vygenerovaná programem cNLS Mapper není dostatečná pro stabilitu proteinu či jeho směřování ven z bakterie, případně až do jádra hostitelských buněk.



Obr. 35 – Protilátková analýza HU_HA, standard Precision Plus Protein™.Kaleidoscope™.

WCL – celobuněčný lyzát; C – cytoplasmatická frakce; M – médium; FM – filtrát média.

K tomu je nejspíš zapotřebí celá sekvence proteinu HU. Z tohoto důvodu jsme pro vizualizaci proteinu v hostitelských buňkách po infekci *F. tularensis* použily kmen exprimující kompletní HU protein značený HA kotvou (HU_HA). Po infekci makrofágů jsme mohly vidět zeleně fluoreskující značený protein HU_HA (je detekován protilátkou namířenou proti HA kotvě konjugovanou s FITC) uvnitř, případně vně červeně fluoreskující bakterie (jsou prokazovány králíčím anti-tularemským sérem v kombinaci se sekundární protilátkou namířenou proti králíčím IgG - anti rabbit AlexaFluor™ 594 DAR) v blízkosti jader makrofágů zviditelněných pomocí DAPI (modře fluoreskující) - viz Obr. 36.



Obr. 36 - Fluoreskující HU_HA protein uvnitř makrofágů.

5 ZÁVĚR

V této práci jsme vytvořily tři konstrukty nesoucí sekvenci fúzního proteinu HU_NLS (HU_NLS_GFP, HU_NLS_HA a HU_NLS_HIS) a vytvořily tři mutantní kmeny, odvozené od mateřského kmene *F. tularensis* subsp. *holarctica* FSC200 - *F. tularensis*/HU_NLS_GFP, *F. tularensis*/HU_NLS_HA a *F. tularensis*/HU_NLS_HIS. Tyto kmeny společně s již dříve připraveným kmenem *F. tularensis* FSC200/HU_HA, byly použity pro studium lokalizace HU proteinu v rámci bakteriální a hostitelské buňky.

Pomocí metod molekulárně-biologických a imunologických jsme se pokusily prokázat HU protein v izolovaných proteinových frakcích *F. tularensis*. Ve snaze dosáhnout kvalitních výsledků, jsme zkrácený protein postupně fúzovaly s různými typy kotev.

Nejdříve jsme vytvořily konstrukt HU_NLS_GFP, jehož lokalizaci jsme prokázaly pouze v cytoplasmatické frakci a v celobuněčném lyzátu. Přesto jsme byly přesvědčeny, že HU protein patří mezi secernované proteiny, a uvažovaly o možném negativním vlivu GFP reportérové molekuly (27 kDa) na konformaci výsledného fúzního proteinu (30 kDa), zabraňujícímu přesunu proteinu směrem k membráně a ven z bakteriální buňky. Z tohoto důvodu jsme hledaly alternativu mezi kotvami s malou molekulovou hmotností (HA kotva, histidinová kotva).

Nicméně ani tyto modifikace se neukázaly být vhodné. Výsledné fúzní proteiny (HU_NLS_HA a HU_NLS_HIS) jsme nebyly schopny nalézt ani v celobuněčném lyzátu *F. tularensis*, natož v membránové frakci proteinů nebo ve filtrátu kultivačního média. Vše nasvědčuje tomu, že tyto fúzní proteiny podléhaly proteázové degradaci, jelikož se nám nepodařilo proteiny obohatit ani afinitní purifikací. Vyslovily jsme hypotézu, že sekvence generovaná programem cNLS Mapper je nedostatečná pro stabilitu proteinu a k určení lokalizace použily kmen exprimující kompletní HU protein značený HA kotvou, který byl v laboratoři připraven dříve.

V tomto případě se nám podařilo prokázat přítomnost HU proteinu ve všech proteinových frakcích *F. tularensis* i ve filtrátu média, a tím tak potvrdit jeho sekreci. Výzkum jsme doplnily o metody fluorescenční mikroskopie s průkazem HU_HA proteinu uvnitř infikovaných makrofágů.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FLANNAGAN, Ronald, Gabriela COSÍO a Sergio GRINSTEIN. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Focus on microbial host cell subversion* [online]. 2009, **7**(7), 355-366 [cit. 2019-10-27]. DOI: 10.1038/nrmicro2128. Dostupné z: <http://www.bio.umass.edu/micro/klingbeil/320/Reading/FlannaganRev2009.pdf>
- [2] STRASKOVA, Adela a Jiri STULIK. Intracellular Pathogenesis of *Francisella Tularensis*. *Military Medical Science Letters*. 2012, **81**(1), 27-39. DOI: 10.31482/mmsl.2012.004. ISSN 0372-7025.
- [3] STOJKOVA, Pavla, Petra SPIDLOVA, Juraj LENCO, Helena REHULKOVA, Lucie KRATKA a Jiri STULIK. HU protein is involved in intracellular growth and full virulence of *Francisella tularensis*. *Virulence*. 2018, **9**(1), 754-770. DOI: 10.1080/21505594.2018.1441588. ISSN 2150-5594.
- [4] MCLENDON, Molly, Michael APICELLA a Lee-Ann ALLEN. *Francisella tularensis*: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of Potential Agent of Biowarfare. *Annu Rev Microbiol*. 2006, **60**(1), 167-185.
- [5] COY, Mc, G. W. a C. C. Studies of plague: a plague-like disease and tuberculosis among rodents in California. *J. Infect Dis*. 1912, (1), 170-180.
- [6] GURCAN, Saban. Epidemiology of Tularemia. *Department of Medical Microbiology: Trakya University Faculty of Medicine, Turkey*. 2014, **31**(1), 3-9. DOI: 10.5152/balkanmedj.2014.13117.
- [7] OYSTON, Petra. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 2008, **57**(1), 921-930 [cit. 2019-10-28]. DOI: 10.1099/jmm.0.2008/000653-0. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/57/8/921.pdf?expires=1572276539&id=id&accname=guest&checksum=515FDEF33A0ED1477D67D7F9AC65EF92>

- [8] PETERSEN, J.M., P. MEAD a M.E. SCHRIEFER. *Francisella tularensis*: an anthropod-borne pathogen. *Vet.Res.* 2009b, **40**(7), 663-667. DOI: 10.2217/fmb.10.17.
- [9] CHONG, A., T.D. WEHRLY a V. NAIR. The Early Phagosomal Stage of *Francisella tularensis* Determines Optimal Phagosomal Escape and *Francisella* Pathogenicity Island Protein Expression. *Infection and Immunity.* 2008, **76**(12), 5488–5499. DOI: 10.1128/IAI.00682-08.
- [10] MURRAY, P.R. a K.S. ROSENTHAL. *Medical Microbiology.* 6th edition. Philadelphia: C.V. Mosby Co., 2009. ISBN 9780323054706.
- [11] LARSON, M.A., U. NALBANTOGLU a K. SAYOOD. Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family *Francisellaceae.* *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016, **66**(3), 1200-1205. DOI: 10.1099/ijsem.0.000855.
- [12] FORSMAN, M., G. SANDSTROM a A. SJOSTEDT. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol.* 1994, **44**(1), 38-46. DOI: 10.1099/00207713-44-1-38.
- [13] LARSSON, P. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat.Genet.* 2005, **37**(2), 153-159. DOI: 10.1038/ng1499.
- [14] LARSSON, P., D. ELFSMARK a K. SWENSSON. Molecular Evolutionary Consequences of Niche Restriction in *Francisella tularensis*, a Facultative Intracellular Pathogen. *PloS Pathogens.* 2009, **5**(6), 1-15. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000472.
- [15] JOHANSSON, A., J. FARLOW a P. LARSSON. Worldwide Genetic Relationships among *Francisella tularensis* Isolates Determined by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY.* 2004, **186**(17), 5808–5818. DOI: 10.1128/JB.186.17.5808–5818.2004.

- [16] PENN, RL. *Francisella tularensis* (Tularemia). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2005, **6**(1), 2674–2685.
- [17] *Francisella tularensis*. *Online laboratory continuing education for clinical laboratories and med techs* [online]. Florida: American Society for Clinical Laboratory Science, 2001-2019 [cit. 2019-11-11]. Dostupné z: https://www.labce.com/spg478226_francisella_tularensis.aspx
- [18] ROSYPAL, S. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981. ISBN -.
- [19] KLABAN, V. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
- [20] HOOD, A. Virulence factors of *Francisella tularensis*. *J Hyg.* 1977, **79**(1), 47-60.
- [21] CHAKRABORTY, S., M. MONFETT a T.M. MAIER. Type IV Pili in *Francisella tularensis*: Roles of pilF and pilT in Fiber Assembly, Host Cell Adherence, and Virulence. *INFECTION AND IMMUNITY: American Society for Microbiology*. 2008, **76**(7), 2852–2861. DOI: 10.1128/IAI.01726-07.
- [22] GIL, H., J.L. BENACH a D.G. THANASSI. Presence of Pili on the Surface of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity: American Society for Microbiology*. 2004, **72**(5), 3042–3047. DOI: 10.1128/IAI.72.5.3042–3047.2004.
- [23] DENNIS, D.T., T.V. INGLESBY a D.A. HENDERSON. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001, **285**(21), 2763–2773. DOI: 10.1001/jama.285.21.2763.
- [24] GOLOVLIOV, I., A. SJOSTEDT, A. MOKRIEVICH a V. PAVLOV. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2003, **222**(1), 273-280.
- [25] LENČO, J. *Analýza expresse intracelulárního patogena Francisella tularensis kultivovaného za stresových podmínek a v průběhu interakce s hostitelskou buňkou*. Hradec Králové, 2007. Disertační práce. LFHK.

- [26] NANO, F.E., N. ZHANG, S.C. COWLEY a K.E. KLOSE. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. *J. Bacteriol.* 2004, **186**(1), 6430-6436.
- [27] BROTCHE, A., D.S. WEISS a Ch.C. KIM. Identification of MglA-Regulated Genes Reveals Novel Virulence Factors in *Francisella tularensis*. *INFECTION AND IMMUNITY*. 2006, **74**(12), 6642–6655. DOI: 10.1128/IAI.01250-06.
- [28] LAI, X.H. a A. SJOSTEDT. Delineation of the molecular mechanisms of *Francisella tularensis*-induced apoptosis in murine macrophages. *Infect. Immun.* 2003, **71**(1), 4642–4646.
- [29] Identification of a *Francisella tularensis* LVS outermembrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2006, **263**(1), 102-108. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00413.x.
- [30] MOHAPATRA, N.P., A. BALAGOPAL a S. SONI. AcpA Is a *Francisella* Acid Phosphatase That Affects Intramacrophage Survival and Virulence. *INFECTION AND IMMUNITY*. 2007, **75**(1), 390–396. DOI: 10.1128/IAI.01226-06.
- [31] BRÖMS, J.E., A. SJÖSTEDT a M. LAVANDER. The role of the *Francisella tularensis* pathogenicity island in type VI secretion, intracellular survival, and modulation of host cell signaling. *Frontiers in Microbiology*. 2010, **136**(1), 2-17. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00136.
- [32] IMBERT, M. a R. BLONDEAU. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Curr Microbiol.* 1998, **37**(1), 64-66.
- [33] POSEY, J.E. a F.C. GHERARDINI. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*. 2000, **288**(1), 1651-1653.
- [34] LITWIN, C.M. a S.B. CALDERWOOD. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev.* 1993, **6**(1), 137-149.
- [35] RAMAKRISHNAN, G. Iron and Virulence in *Francisella tularensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017, **7**(1), 1-7. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00107.

- [36] FRANK, D.W. a T.C. ZAHRT. Genetics and Genetic Manipulation in *Francisella tularensis*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007, **1105**(1), 67–97. DOI: 10.1196/annals.1409.008.
- [37] ZOGAJ, X. a K.E. KLOSE. Genetic manipulation of *Francisella tularensis*. *Frontiers in Microbiology*. 2011, **142**(1), 1-8. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00142.
- [38] Nannochloropsis Electroporation Transformation Protocol. *Wetlab Wiki* [online]. San Diego: The Wet Lab, 2016 [cit. 2019-12-01]. Dostupné z: <https://sites.google.com/a/bluenomad.org/nannochloropsis-engineering-project/home>
- [39] ANUCHIN, A.M., A.V. GONCHARENKO, O.I. DEMIDENOK a A.S. KAPRELYANTS. Histone - Like Proteins of Bacteria (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. Pleiades Publishing, Inc., 2011, **47**(6), 580–585. DOI: 10.1134/S0003683811060020. ISSN 0003-6838.
- [40] BAHLOUL, A., F. BOUBRIK a J. ROUVIERE-YANIV. Roles of *Escherichia coli* histone-like protein HU in DNA replication:HU-beta suppresses the thermosensitivity of dnaA46ts. *Biochimie*. 2001, **83**(1), 219–229. DOI: 10.1016/S0300-9084(01)0 1246-9.
- [41] BALANDINA, A., D. KAMASHEV a J. ROUVIERE-YANIV. The Bacterial Histone-like Protein HU Specifically Recognizes Similar Structures in All Nucleic Acids. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2002, **277**(31), 27622–27628.
- [42] GRUBER, S. Multilayer chromosome organization through DNA bending, bridging and extrusion. *Current Opinion in Microbiology*. 2014, **-(-)**. DOI: 22. 10.1016/j.mib.2014.09.018.
- [43] DIAS, A.A., D. RAZE a C.S. LIMA. Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. *Mem. Inst, Oswaldo Cruz*. 2012, **107**(-), 174-182.

- [44] THAKRAN, S., C.L. LAVINE, M.A. MILLER a J.E. BINA. Identification of *Francisella tularensis* lipoproteins that stimulate the Toll-like receptor (TLR) 2/TLR1 heterodimer. *J Biol Chem.* 2007, **283**(1), 3751–3760.
- [45] UNDERHILL, , David M. a Adrian OZINSKY. PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action. *Annual Review of Immunology.* 2002, **20**(1), 825-852.
- [46] ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0815340729.
- [47] IMBULUZQUETA, E., C. GAMAZO, J. ARIZA a M.J. BLANCO-PRIETO. Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2010, **15**(1), 397-417 [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <https://www.bioscience.org/2010/v15/af/3627/fulltext.php?bframe=figures.htm>
- [48] CHONG, A. a J. CELLI. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Frontiers in Microbiology.* 2010, **138**(1), 1-12. DOI: 10.3389/fmicb.2010.00138.
- [49] CLEMENS, D.L., B.Y. LEE a M.A. HORWITZ. *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. *Infect Immun.* 2005, **73**(1), 5892–5902.
- [50] HORZEMPA, J., D.M. O'DEE, D.B. STOLZ a J.M. FRANKS. Invasion of Erythrocytes by *Francisella tularensis*. *Journal of Infectious Diseases.* 2011, **204**(1), 51-59.
- [51] RÄDISCH, R. *Intracelulární život patogenní bakterie Francisella tularensis v hostiteli.* Praha, 2014. Bakalářská. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.
- [52] CHECROUN, C., T.D. WEHRLY a E.R. FISCHER. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *PNAS.* 2006, **103**(39), 14578–14583. DOI: 10.1073.

- [53] EDWARDS, J.A., D. ROCKX-BROUWER, V. NAIR a J. CELLI. Restricted cytosolic growth of *Francisella tularensis* subsp. tularensis by IFN- γ activation of macrophages. *Microbiology*. 2010, **156**(1), 327–339. DOI: 10.1099.
- [54] TAU, G. a P. ROTHMAN. Biologic functions of the IFN- γ receptors. *NIH Public Access Author Manuscript, Allergy*. 1999, **54**(12), 1233–1251.
- [55] HENRY, T., A. BROTCHE a D.S. WEISS. Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *Journal of Experimental Medicine*. 2007, **204**(5), 987-994.
- [56] SANTIC, A., G. PAVOKOVIC a S. JONES. Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by *Francisella tularensis*. *Microbes Infect*. 2010, **12**(2), 1-15. DOI: 10.1016/j.micinf.2009.11.003.
- [57] BERGSBAKEN, T., S. FINK a B. COOKSON. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*. 2009, **7**(2), 99-109. DOI: 10.1038/nrmicro2070.
- [58] LAMKANFI, M. a V.M. DIXIT. Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host*. 2010, **8**(1), 44-54.
- [59] HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. Praha: Triton, 2013. ISBN 978-807-3877-132.
- [60] JONES, J., P. BROZ a D.M. MONACK. Innate immune recognition of *Francisella tularensis*: activation of type-I interferons and the inflammasome. *Frontiers in Microbiology*. 2011, **2**(16), 1-10. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00016.
- [61] STEELE, S., J. BRUNTON a B. ZIEHR. *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathogens*. 2013, **9**(8), -.
- [62] COWLEY, S.C. a K.L. ELKINS. Immunity to *Francisella*. *Frontiers in Microbiology*. 2011, **2**(26), 1-21. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00026.

- [63] MCCAFFREY, R.L., J.T. SCHWARTZ a S.R. LINDEMANN. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 2010, **88**(-), 791-805.
- [64] ROBERTS, L.M., D.A. POWELL a J.A. FRELINGER. Adaptive Immunity to *Francisella tularensis* and Considerations for Vaccine Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018, **8**(115), 1-11. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00115.
- [65] LAMPS, L.W., J.M. HAVENS a A. SJOSTEDT. Histologic and molecular diagnosis of tularemia: a potential bioterrorism agent endemic to North America. *Modern Pathology.* 2004, **17**(-), 489–495.
- [66] ELLIS, J., P.C.F. OYSTON a M. GREEN. Tularemia. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS.* 2002, **15**(4), 631–646. DOI: 10.1128/CMR.15.4.631–646.2002.
- [67] BROWN, S., F. MCKINNEY a G. KLEIN. Evaluation of a safranin-O-stained antigen microagglutination test for *Francisella tularensis* antibodies. *Journal of Clinical Microbiology.* 1980, **11**(2), 146-148.
- [68] BEVANGER, L., J. MAELAND a A. KVAN. Comparative analysis of antibodies to *Francisella tularensis* antigens during the acute phase of tularemia and eight years later. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 1994, **1**(2), 238-240.
- [69] FULOP, M., D. LESLIE a R. TITBALL. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1996, **54**(4), 364-366.
- [70] UHLÍK, O., M. STREJČEK a M. HROUDOVÁ. IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ S BIOREMEDIATIONÍM POTENCIÁLEM – OD KULTIVACE K METAGENOMICE. *Chemické listy.* 2013, -(107), 614-622.
- [71] BELL, J. Tularemia—a review. *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section A.* 1977, -(), 161.

- [72] BACHILLER LUQUE, P., J. PEREZ CASTRILLON a M. MARTIN LUQUERO. Preliminary report of an epidemic tularemia outbreak in Valladolid. *Rev. Clin. Esp.* 1998, **198**(-), 789-793.
- [73] MÖRNER, T. The ecology of tularemia. *Revue scientifique et technique: International office of epizootics.* 1992, **11**(4), 1123-1130.
- [74] OHARA, Y., T. SATO a M. HOMMA. Arthropod-borne tularemia in Japan: clinical analysis of 1374 cases observed between 1924 and 1996. *J. Med. Entomol.* 1998, **35**(-), 471-473.
- [75] HELVACI, S., S. GEDIKOGLU a H. AKALIN. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur. J. Epidemiol.* 2000, **16**(-), 271-276.
- [76] GURYCOVA, D. Analysis of the incidence and routes of transmission of tularemia in Slovakia. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* 1997, **46**(-), 67-72.
- [77] CHRISTENSON, B. An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 1984, **16**(-), 285-290.
- [78] EVANS, M., D. GREGORY a W. SCHAFFNER. Tularemia: a 30 year experience with 88 cases. *Medicine (Baltimore).* 1985, **64**(-), 251-269.
- [79] MACELA, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií.* 1. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-0664-4.
- [80] BOISSET, S., Y. CASPAR a V. SUTERA. New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014, **4**(40), -. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00040.
- [81] MAURIN, M. New anti-infective strategies for treatment of tularemia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2014, **4**(115), 1-2. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00115.
- [82] KIRIMANJESWARA, G., S. OLMOS a C. BAKSHI. Humoral and cell-mediated immunity to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunol. Rev.* 2008, **225**(-), 244-255. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00689.x.

- [83] FOSHAY, L., W. HESSELBROCK a H. WITTENBERG. Vaccine prophylaxis against tularemia in man. *Am J Public Health*. 1942, **32**(-), 1131–1145.
- [84] RUSNAK, J., M. KORTEPETER a R. HAWLEY. Risk of occupationally acquired illness from biological threat agents in unvaccinated laboratory workers. *Biosec. Bioterror. Biodef. Strat. Prac. Sci.* 2004, **2**(-), 1-13.
- [85] GRIFFIN, K., P. OYSTON a R. TITBALL. *F. tularensis* vaccines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007, **49**(-), 315–323. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00219.x.
- [86] PECHOUS, R., J. CELLI a R. PENOSKE. Construction and characterization of an attenuated purine auxotroph in a *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Infect. Immun.* 2006, **74**(-), 4452–4461.
- [87] TWINE, S., M. BYSTROM a W. CHEN. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect. Immun.* 2005, **73**(-), 8345–8352.
- [88] LIU, M. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 2011, **239**(1), 62-84.
- [89] ROTEM, S., O. COHEN a E. BAR-HAIM. Protective immunity against lethal *F. tularensis* holarctica LVS provided by vaccination with selected novel CD8+ T cell epitopes. *PLoS One*. 2014, **9**(1), -.
- [90] OYSTON, P.C.F., A. SJOSTEDT a R. TITBALL. TULARAEMIA: BIOTERRORISM DEFENCE RENEWS INTEREST IN *FRANCISELLA TULARENSIS*. *Nature Reviews*. 2004, **-(2)**, 968-979.
- [91] BÖNQUIST, L., H. LINDGREN a I. GOLOVLIOV. MglA and Igl proteins contribute to the modulation of *Francisella tularensis* live vaccine strain-containing phagosomes in murine macrophages. *Infection and Immunity*. 2008, **76**(8), 3502-3510.
- [92] Restrikční štěpení. In: *LabGuide - Průvodce laboratoří* [<https://labguide.cz/online>]. Česká republika: info@labguide.cz, 2014-2019 [cit. 2020-01-29]. Dostupné z: <https://labguide.cz/reagencie/enzymy/restrickni-stepeni/>

- [93] Elektroforetická separace nukleových kyselin. *LabGuide - Průvodce laboratoří* [<https://labguide.cz/online>]. Česká republika: info@labguide.cz, 2014-2019 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>
- [94] *TOPO TA cloning kit for sequencing: five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products for sequencing*. [online]. 1st edition. UK: -, 2012 [cit. 2020-02-02]. ISBN -. Dostupné z: <http://post.queensu.ca/~chinsang/lab-protocols/handbooks-and-manuals/pcr-4-topo-kit.pdf>
- [95] STOJKOVÁ, Pavla. *Studium potenciálních faktorů virulence bakterie F. tularensis*. Hradec Králové, 2015. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- [96] Klonování. In: *LabGuide - Průvodce laboratoří* [<https://labguide.cz/online>]. Česká republika: info@labguide.cz, 2014-2019 [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/klonovani/>
- [97] Laboratorní cvičení č. 8: Stanovení množství proteinů v buněčném lyzátu. Olomouc, -. Dostupné také z: <http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/Stanoven%C3%AD%20mno%C5%BEstv%C3%AD%20protein%C5%AF%20v%20bun%C4%9B%C4%8Dn%C3%A9m%20lyz%C3%A1tu.pdf>
- [98] ZEMEK, Ondřej. *Purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie*. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- [99] LAKOWICZ, J. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd edition. Baltimore, USA: Springer, Boston, MA, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1.
- [100] STOJKOVÁ, Pavla, Petra ŠPIDLOVÁ a Jiří STULÍK. Nucleoid-Associated Protein HU: A Lilliputian in Gene Regulation of Bacterial Virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019, **9**(159), 1-7. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00159.
- [101] Fusion PCR via Novel Overlap Sequences. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2012, **852**(-), 97-110. DOI: 10.1007/978-1-61779-564-0_8.

