

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno 2016

Anežka Niesnerová



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární
biologie



GENETICKÁ MANIPULACE U PATOGENNÍCH SPIROCHET

Bakalářská práce

Anežka Niesnerová

Bibliografický záznam

Autor: Anežka Niesnerová
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Genetická manipulace u patogenních spirochet

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Lékařská genetik a molekulární diagnostika

Vedoucí práce: prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

Akademický rok: 2015/2016

Počet stran: 35

Klíčová slova: spirochety; genetická manipulace; *Treponema pallidum*

Bibliographic Entry

Author: Anežka Niesnerová
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Experimental Biology

Title of Thesis: Genetic manipulation of pathogenic spirochetes

Degree Programme: Biology

Field of Study: Medical Genetics and Molecular Diagnostics

Supervisor: prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

Academic Year: 2015/2016

Number of Pages: 35

Keywords: spirochetes; genetic manipulation; *Treponema pallidum*

Abstrakt

Patogenní spirochety jsou bakterie citlivé k faktorům vnějšího prostředí bez možnosti kultivace. Zároveň toho není příliš známo o jejich přirozeném přenosu genů. Tyto faktory znesnadňují práci s nimi a především jejich mutagenezi. Přesto byly v posledních letech vytvořeny metody, které práci s těmito bakteriemi umožňují. Zpočátku byly tyto metody založené na komplementaci narušených genů v *Escherichia coli*, poté se již začala mutageneze provádět v samotných spirochetách. Pomocí plazmidů byly geny spirochet inaktivovány nebo byly do jejich genomu vkládány geny nové či upravené. Podařilo se docílit náhodné i cílené mutageneze a u některých také transdukce bakteriofágem. Pouze některé spirochety mají vlastní plazmidy nebo bakteriofágy, proto byly často používány plazmidy nebo fágy se širokým rozmezím hostitelů. Doposud nebyla geneticky modifikována *Treponema pallidum*. Pro ni by však mohly být použitelné metody aplikované u ostatních spirochet, které jsou zmíněny v závěru práce.

Abstract

Pathogenic spirochetes are bacteria sensitive to environmental factors without possibility of cultivation. Simultaneously there is not much known about their natural gene transfer. These factors complicate working with them and especially their mutagenesis. In the last few years there were created methods which make work with these bacteria possible. At the beginning these methods were based on complementation of disrupted genes in *Escherichia coli*, later mutagenesis was made in very spirochetes. Genes of spirochetes were inactivated with help of plasmids or new or changed genes were transferred into their genome. Random and targeted mutagenesis were achieved and for some also bacteriophage transduction. Only some spirochetes have their own plasmids or bacteriophages, therefore broad-host range plasmids or phages were frequently used. *Treponema pallidum* wasn't cultivated so far. Methods applied for the other spirochetes, mentioned in the end of work, could be used for mutagenesis of it.



Masarykova univerzita



Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Anežka Niesnerová**
Studijní program: **Biologie**
Studijní obor: **Lékařská genetik a molekulární diagnostika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

Genetická manipulace u patogenních spirochet

Genetic manipulation of pathogenic spirochetes

Oficiální zadání:

T. pallidum subsp. *pallidum*, původce syfilis, nelze kultivovat v podmínkách *in vitro*, což zásadně omezuje výzkum tohoto obligátního lidského patogenu metodami genetického inženýrství. Využití genetické manipulace k objasnění patogeneze jednotlivých onemocnění je však zcela běžné u ostatních patogenních spirochet. Tato práce by měla shrnout základní poznatky o genetické manipulaci u patogenních spirochet a aplikovat tyto poznatky na původce syfilis.

Literatura: Cabello F. C., Sartakova M. L., Dobrikova El. Y, 2001; Genetic manipulation of spirochetes – light at the end of the tunnel. *Trends Microbiol.* 9: 245–248

Girons I. S., Brenot A., Picardeau M., 2001; Genetics of spirochetes – light at the end of the tunnel: Response. *Trends Microbiol.* 9: 248

Rosey E. L., Kennedy M. J., Petrella D. K., Ulrich R. G., Yanceya R. J., 1995; Inactivation of *Serpulina* *hyodysenteriae* *flaA1* and *flaB1* Periplasmic Flagellar Genes by Electroporation-Mediated Allelic Exchange. *J. Bacteriol.* 177: 5959–5970

Picardeau, M., Brenot A., Girons I. S., 2001; First evidence for gene replacement in *Leptospira* sp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol. Microbiol.* 40: 189–199

Izard, J., Samsonoff W. A., Limberger R. J., 2001; Cytoplasmic filament-deficient mutant of *Treponema denticola* has pleiotropic defects. *J. Bacteriol.* 183: 1078–1084

Jazyk závěrečné práce: český

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. David Šmajš, Ph.D.

Podpis vedoucího práce:

Konzultant:

Datum zadání bakalářské práce: 10. listopadu 2015 V Brně dne 10. listopadu 2015

prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání bakalářské práce převzal dne: 10. listopadu 2015

Podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, prof. MUDr. Davidu Šmajsovi, Ph.D., za odborné vedení a veškeré rady, připomínky a podporu při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 1. 5. 2016

Anežka Niesnerová
.....

Anežka Niesnerová

Obsah:

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 9 |
| 2. Spirochety | 10 |
| 2.1 Patogenní spirochety..... | 11 |
| 2.1.1 <i>Brachyspira</i> | 11 |
| 2.1.2 <i>Leptospira</i> | 12 |
| 2.1.3 <i>Borrelia</i> | 12 |
| 2.1.4 <i>Treponema</i> | 13 |
| 3. Genetická manipulace u spirochet | 14 |
| 3.1 Genetická manipulace u brachyspir..... | 14 |
| 3.2 Genetická manipulace u leptospir..... | 16 |
| 3.2.1 Komplementace genů..... | 16 |
| 3.2.2 Vektory | 16 |
| 3.2.3 Cílená mutageneze | 17 |
| 3.2.4 Náhodná mutageneze | 18 |
| 3.3 Genetická manipulace u borélií | 18 |
| 3.3.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> | 18 |
| 3.3.1.1 Komplementace genů | 18 |
| 3.3.1.2 Náhodná mutageneze | 19 |
| 3.3.1.3 Inducibilní systém mutageneze | 19 |
| 3.3.1.4 Selektivní markery | 20 |
| 3.3.1.5 Reportérové geny | 21 |
| 3.3.2 <i>Borrelia hermsii</i> | 21 |
| 3.4 Genetická manipulace u treponem | 21 |
| 3.4.1 Plazmid se širokým spektrem hostitelů..... | 22 |
| 3.4.2 Kryptický plazmid | 24 |
| 3.4.3 Transpozonová mutageneze | 24 |
| 3.4.4 Selektivní markery | 25 |
| 4. <i>Treponema pallidum</i> | 26 |
| 4.1 Komplementace | 26 |
| 4.2 Vvytvoření vektoru..... | 26 |
| 5. Závěr | 28 |
| 6. Literatura | 29 |

1. ÚVOD

Patogenní spirochety jsou bakterie, které se svou stavbou a vlastnostmi odlišují od ostatních bakterií. Zároveň to jsou původci jak lidských, tak zvířecích onemocnění, jako je leptospiroza, Lymfská borelióza nebo syfilis. Genetická manipulace, která se běžně používá ke studiu bakterií, mimo jiné i jejich patogeneze, se u tohoto kmene začala rozvíjet teprve nedávno. Hlavními překážkami v manipulaci se spirochetami jsou jejich náročné kultivační podmínky a nedostatek přirozených mechanismů pro přenos genů.

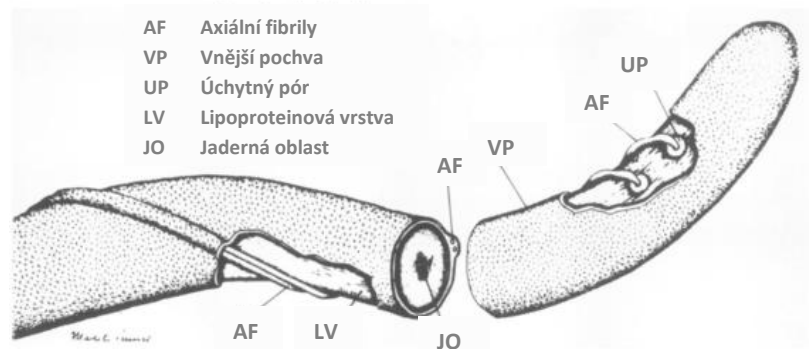
Poslední dobou se začaly rozvíjet metody pro mutagenezi u patogenních druhů *Brachyspira hyodysenteriae*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia hermsii* a skupiny ústních treponem, zejména pak *Treponema denticola*. Doposud nebyla geneticky modifikována spirocheta *Treponema pallidum*, kterou není možné kultivovat a ani o přirozeném přenosu genů toho u ní není příliš známo.

V této práci shrnuji poznatky o genetické manipulaci u patogenních spirochet, pro které již byly vyvinuty metody mutageneze. V těchto metodách byly využity plazmidové vektory i bakteriofágy a bylo docíleno náhodné i cílené mutageneze. V závěru pak vycházím z těchto poznatků a zmiňuji možné metody, které by mohly být aplikovány u *T. pallidum*.

2. SPIROCHETY

Spirochety jsou bakterie řádu Spirochaetales. Vyvinuly se z jediného společného předchůdce, jedná se tedy o monofyletický kmen (Paster *et al.*, 1991). Jejich příbuznost je patrná již podle fenotypových znaků.

Takovým znakem je například stavba jejich buněk, která je obdobná gramnegativním bakteriím. Buňky mají spirální tvar a jsou vysoce pohyblivé (Paster a Canale-Parola, 1980). Tuto pohyblivost umožňují bičíky, které se nacházejí mezi cytoplazmatickou membránou a vnější pochvou, která je analogií k vnější membráně gramnegativních bakterií. Bičíky jsou ukotveny na buňce subterminálně a obtáčejí ji. Za normálních podmínek nevystupují do vnějšího prostoru a jejich množství je individuální od dvou až po stovky.



Obr. 1: Stavba typické spirochety. Buňku pokrývá vnější pochva. Mezi vnější pochvou a vrstvami protoplazmatického cylindru jsou axiální fibrily, které jsou zanořeny do cylindru úchytným pórem. (Holt, 1978; upraveno)

Příbuznost spirochet je patrná také podle sekvencí genů 16S rRNA (Paster *et al.*, 1991). V těchto genech se u spirochet nacházejí konkrétní signaturní sekvence, které se u ostatních bakterií nalézají pouze ve výjimečných případech. Přehled těchto bází je uveden v tabulce (Tab. 1). Jde především o uracil na pozici 47, který zde byl nalezen pouze u spirochet. U většiny ostatních eubakterií a archebakterií je zde cytosin. Ostatní ze jmenovaných bází se ve výjimečných případech nalézají i u jiných bakterií. U některých spirochet (například u treponem nebo leptospir) se také nachází 20 až 30 bází, které prodlužují 5' konce 16S rRNA. Tyto báze tak tvoří variabilní oblast často helixového tvaru, ale jejich funkce není známa.

| Pozice báze nebo páru | Stavba u spirochet | Stavba u jiných bakterií | Výjimky |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---|
| 28.555 | A.U | G.C | A.U (fialové proteobakterie, planktomycety) G.U (mykoplazmata, flavobakterie) |
| 45.396 | C.U (popř. G.C nebo U.A) | G.C nebo U.A | U.G; C.G |
| 47 | U | C | G (planktomycety, chlamydie) |
| 50 | U | A | U (fialové proteobakterie, planktomycety, <i>Thermotoga</i>) G (chlamydie) |
| 52.359 | A.U (popř. G.C) | G.C nebo U.A | G.U (deinokoky) |
| 53.358 | G.C (popř. A.U) | A.U | G.U (planktomycety, chlamydie) G.C (<i>Chloroflexus</i>) |
| 361 | A | G | A (planktomycety, chlamydie) |
| 1415.1485 | C.G | G.Y | Y.R (planktomycety, mykoplazmata) C.G (<i>Isocystis pallida</i> , <i>Thermotoga</i>) |

Tab. 1: Signатурní sekvence spirochet a porovnání s ostatními bakteriemi. (Paster *et al.*, 1991; upraveno)

Všechny spirochety jsou také rezistentní na rifampicin, čehož lze využít k jejich izolaci ze vzorku (Leschine a Canale-Parola, 1980), a všechny (kromě leptospir) obsahují ornithin v peptidoglykanu buněčné stěny (Joseph *et al.*, 1973).

2.1 PATOGENNÍ SPIROCHETY

Do řádu Spirochaetales patří 8 rodů, z nichž čtyři jsou patogenní. Jsou to rody *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira* a *Brachyspira*. Onemocnění, která způsobují (u lidí i zvířat), jsou vlivem rozdílů ve struktuře genetického materiálu rozmanitá. Jde například o syfilis, Lymfskou boreliózu, návratné horečky nebo leptospirózu.

2.1.1 *Brachyspira*

Brachyspira byla dříve zařazována do rozdílných skupin a podle toho měla rozdílné názvy, mezi nimi *Treponema* nebo *Serpulina*. Jde o anaerobní bakterii, která je ale schopná malé množství kyslíku využívat díky NADH oxidáze (Stanton *et al.*, 1999). Kultivace je možná v tekutém nebo na pevném mediu s přidáním krve nebo séra.

B. hyodysenteriae způsobuje onemocnění prasat, u kterých kolonizuje povrch tlustého střeva (Kennedy *et al.*, 1988). Pro patogenezi této choroby je důležitá vysoká pohyblivost buněk jejího původce. *Brachyspiry* jsou chemotaxí přitahovány k mucinóznímu povrchu

tlustého střeva, který svými pohyby penetrují. Tímto se dostávají až do blízkosti epitelu a Lieberkühnových krypt, ale nenarušují je. Infekce se projevuje průjmy a dalšími problémy s trávením. Z trávicího traktu se pak mohou snadno šířit dál.

2.1.2 *Leptospira*

Leptospiry se obvykle nachází ve vodním prostředí, kde s nimi mohou přijít do kontaktu zvířata či lidé, kteří se tak nakazí (Levett, 2001). Pro stavbu jejich buněk jsou typické pravidelné závitky a háčkovitě zahnuté konce. Jejich kultivace je možná ve speciálním tekutém mediu obohaceném například králičím sérem. Jsou obligátně aerobní a jako zdroj energie využívají mastné kyseliny.

Klasické dělení leptospir je na nepatogenní *Leptospira biflexa* a patogenní *L. interrogans*. Moderními metodami pak byly rozděleny na 17 genomospecies.

Patogenní leptospiry (může jít o různé sérotypy) způsobují leptospirózu. Toto onemocnění má velice rozmanité příznaky a rozlišuje se jeho ikterická a anikterická forma. Ikterická forma je vzácnější, ale má horší průběh. Na jejím vzniku se podílí sérotyp *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Anikterická forma je častější a projevuje se jako neurčité horečnaté onemocnění způsobené *Leptospira grippotyphosa*.

2.1.3 *Borrelia*

Struktura borélií odpovídá ostatním spirochetám, vyžadují mikroaerofilní prostředí a jsou přenášeny členovci (Barbour a Hayes, 1986). Jsou zodpovědné například za Lymskou boreliózu nebo návratné horečky.

B. burgdorferi sensu lato zahrnuje borélie, které způsobují Lymskou boreliózu (Tilly *et al.*, 2008). Pomocí genetických metod byla rozdělena na více genomospecies (dnes je jich známo jedenáct). V Evropě jsou nejčastější genomospecies *B. burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*.

Jako první byly popsány samotné příznaky onemocnění, bylo to postižení kůže a podkoží a *erythema migrans*. Později byly zjištěny také neurologické příznaky. Spirochety jsou šířeny klíšťaty. Po kousnutí klíštětem se borélie množí v kůži v místě vniku infekce a následně se diseminují po organismu.

Návratné horečky způsobuje několik druhů borélií. *Borrelia recurrentis* (přenášena vši šatní) vyvolává *typhus recurens* a *B. hermsii* společně s dalšími (přenášeny klíštětem *Ornithodoros*) způsobují endemické návratné horečky (Sounthern a Sanford, 1969).

Průběh obou typů je stejný. Borélie se během několika dní pomnoží a vyvolávají horečky. Ty se během dalších dní zmírní, ale po dalším pomnožení bakterií se vrátí. Pokaždé se množí borélie s rozdílnými zmutovanými antigeny, proto na ně imunitní systém nereaguje okamžitě.

2.1.4 *Treponema*

Významní zástupci rodu *Treponema* jsou především *T. pallidum subsp. pallidum* (původce syfilis), *T. pallidum subsp. endemicum* (původce endemické syfilis), *T. pallidum subsp. pertenue* (původce framboesie) a *Treponema carateum* (původce onemocnění pinta). Z těchto zástupců je pouze *T. pallidum subsp. pallidum* pohlavně přenosná.

Treponemy jsou anaerobní nebo mikroaerofilní, ale patogenní druhy nemůžeme kultivovat na mediích ani tkáňových kulturách.

T. pallidum subsp. pallidum způsobuje nemoc syfilis (Norris *et al.*, 2001). Ve většině případů se přenáší pohlavním stykem, případně z matky na dítě přes placentu. Ve výjimečných případech je nakažení možné také kontaktem s krví, tělesnými tekutinami nebo kožními projevy. Typickým pro tuto nemoc je tvrdý vřed (*ulcus durum*), který se objevuje v okolí místa vstupu infekce. Z toho místa se infekce šíří po celém těle a tvoří na kůži hrbolky. Za několik let po infekci se mohou objevit také gummata (gumovité vředy), neurologické nebo kardiovaskulární projevy.

T. denticola není primárně patogenní, žije v periodonciu a je součástí ústní mikroflóry (Dahle *et al.*, 1993). Společně s dalšími mikroorganismy v ústech se ale pravděpodobně podílí na vzniku zánětu dásní.

3. GENETICKÁ MANIPULACE U SPIROCHET

3.1 GENETICKÁ MANIPULACE U BRACHYSPIR

B. hyodysenteriae se stala vhodnou spirochetou pro genetický výzkum, protože jsou dobře známy její kultivační a výživové nároky (Stanton *et al.*, 2001). Jednotlivé výzkumy byly zaměřeny na geny, které mají souvislost s patogenezí onemocnění. Jedná se o geny *tly*, *flaA*, *flaB* a *nox*.

Gen *tly* kóduje hemolyzin, kterým bakterie narušuje membránu červených krvinek (ter Huurne *et al.*, 1992). Geny třídy *flaA* se účastní tvorby obalu bičíku, třídy *flaB* tvorby jádra bičíku (Rosey *et al.*, 1995). Geny *flaA* i *flaB* tak umožňují pohyby buňky, které jsou významné pro patogenezi onemocnění. Gen *nox* je zodpovědný za tvorbu NADH oxidázy, díky které se anaerobní *Brachyspira* vypořádává s kyslíkem ve svém okolí (Stanton *et al.*, 1999).

V roce 1992 byla provedena první inaktivace genu u této spirochety (ter Huurne *et al.*, 1992). Elektroporací byl do bakterie přenesen plazmid nesoucí rezistenci ke kanamycinu, která byla použita jako selektivní marker. Tímto plazmidem byl narušen gen *tly*. Výsledkem byl vznik mutantů se sníženou virulencí.

V letech 1995 a 1996 byl zkoumán vliv pohyblivosti brachyspiry na patogenezi. V roce 1995 byly inaktivovány geny *flaA1* a *flaB1* (Rosey *et al.*, 1995). O rok později bylo zkoumáno, jaký vliv na buňky bude mít inaktivace obou genů (*flaA1* a *flaB1*) zároveň (Rosey *et al.*, 1996). Gen *flaB1* byl narušen genovou kazetou pro rezistenci ke kanamycinu (*kan*), čímž vznikl mutovaný gen *flaB1::kan*. Do kmene *B. hyodysenteria* s tímto genem byl zaveden plazmid obsahující genovou kazetu pro chloramfenikol acetyltransferázu (*cat*), která narušuje gen *flaA1*. Elektronovou mikroskopií se ukázalo, že přestože buňky postrádaly proteiny FlaA1 i FlaB1, zachovaly si schopnost sestavení bičíku. U mutantních bakterií ale byla výrazně snižená pohyblivost i schopnost kolonizovat střeva.

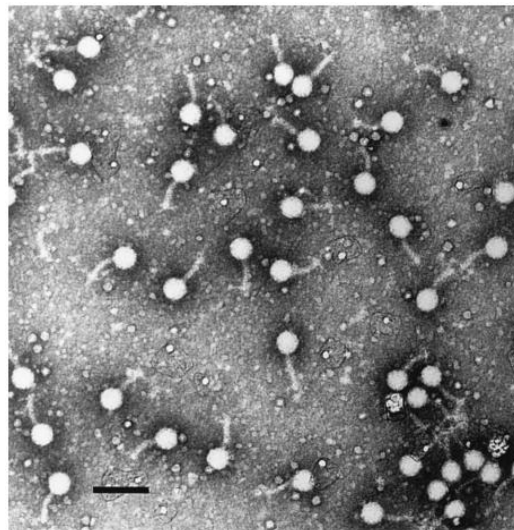
Stanton *et al.* (1999) se zaměřili na inaktivaci genu *nox* a zjištění jeho vlivu na virulenci a citlivost bakterií ke kyslíku. Elektroporací získali dva kmeny (Nox-Cm a Nox-Km) s mutovaným genem *nox*. Podle pozorování byly oba kmeny stokrát až desettisíckrát citlivější k působení kyslíku než wild-type buňky. U obou se také prokázala snížená virulence, což se vysvětluje „polárním efektem“ vyvolaným mutovaným genem. To

znamená, že dojde k ukončení transkripce a nejsou exprimovány geny nacházející se dále za genem *nox*.

V roce 1997 se podařilo k modifikaci brachyspiry využít také transdukcí bakteriofágem (Humphrey *et al.*, 1997). Tento bakteriofág (virus *Serpulina hyodysenteriae*, VSH) může hrát důležitou roli v přirozeném genovém přenosu brachyspir. Získat se jej ale podařilo pouze působením mitomycinu.

Částice VSH-1, které byly získány z kmene *B. hyodysenteriae flaA1::cat*, byly přidány k rostoucím buňkám *B. hyodysenteriae nox::kan*. Po osmi hodinách inkubace byly získány buňky rezistentní k chloramfenikolu i kanamycinu, které se vyskytovaly s frekvencí $1,5 \times 10^{-6}$ jednotek tvořících kolonie (CFU) na fágovou částici. V dalších experimentech byla provedena reverzní transdukce (VSH-1 z kmene *nox::kan* byly přidány ke kmeni *flaA1::cat*) se stejnou frekvencí výskytu transduktantů.

U popsáných výzkumů se využívalo genů kódujících rezistence ke kanamycinu, které inaktivují geny *tlyA*, *flaA1*, *flaB1* a *nox*, a chloramfenikolu, které inaktivují *flaA1* a *nox* (Rosey *et al.*, 1996). Stanton *et al.* (2001) zjistili, že jako selektivní marker může být také použita rezistence ke coumermycinu. Coumermycin působí na GyrB podjednotku DNA gyrázy, bodová mutace v genu *gyrB* vede ke změně v proteinu GyrB a tím vzniká rezistence ke coumermycinu. Pro tento účel je nejlepší možností použití transdukce pomocí VSH-1.



Obr. 2: Elektronová mikrofotografie virionů VSH-1. Purifikované VSH-1 částice byly získány z kultur *B. hyodysenteriae* B204 po působení mitomycinu (Humphrey *et al.* 1997).

3.2 GENETICKÁ MANIPULACE U LEPTOSPIR

Výzkum leptospir se zabývá jak saprofytickými druhy (*L. biflexa*), tak patogenními (*L. interrogans*). U obou skupin se dosáhlo úspěchů v oblasti genetické manipulace, kterou se podařilo objasnit role různých genů a proteinů v přežívání a patogenezí.

3.2.1 Komplementace genů

Předtím než byly známy vektory, které by bylo možno použít, využívalo se pro genetické manipulace u leptospir komplementace genů *Escherichia coli*. V této metodě se naklonují fragmenty DNA leptospiry a vloží se do připraveného defektního genomu *E. coli* (Yelton a Cohen, 1986). Pokud se vložené geny dokážou začlenit do genomu, nahradí porušené geny a zastanou jejich funkci. Tímto způsobem byly zkoumány například geny *recA* (Stamm *et al.*, 1991), *rfb* (Mitchison *et al.*, 1997) nebo *trpE* (Yelton a Cohen, 1986; Baril *et al.*, 1992).

3.2.2 Vektory

Druhým způsobem manipulace s genomem leptospir je použití vektorů. Jako vektor byl mimo jiné použit bakteriofág LE1, který byl izolován z *L. biflexa* (Saint Girons *et al.*, 2000). V bakterii není schopen vyvolat lytický cyklus, ale chová se jako plazmid. Jinou možností je genomický ostrov, který byl objeven při srovnání genomů *L. interrogans* serovaru Lai a serovaru Copenhageni (Bourhy *et al.*, 2007). Jedná se o inzerci tvořenou 54 kb, která je specifická pro serovar Lai, zatímco v serovaru Copenhageni se nenachází. Tato inserce může být vystřižena z chromozomu a utvoří se z ní plazmid, který je schopen replikace v *L. biflexa* a *E. coli*.

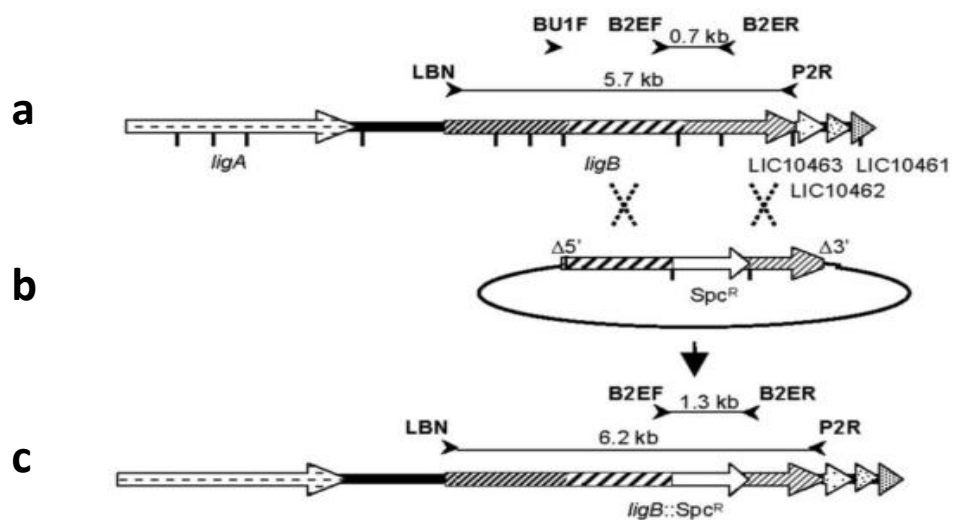
Vektory poté mohou být zavedeny do leptospir elektroporací. To bylo dokázáno v roce 2000, kdy vytvořili vektor z bakteriofága LE1 (Saint Girons *et al.*, 2000). Obsahoval počátek replikace z *E. coli* a kazetu *kan*. V roce 2005 použili elektroporaci k doručení plazmidu s transpozonem *HimarI* a rezistencí ke kanamycinu do *L. interrogans* (Bourhy *et al.*, 2005). Získali přibližně 100 kanamycin-rezistentních kolonií na µg DNA. Tím bylo dokázáno, že tento způsob zásahu do genomu je možný i u patogenních leptospir.

Při přenosu plazmidu RP4 z *E. coli* do kmenů *L. biflexa* i *L. interrogans* se ale jako výhodnější ukázal přenos konjugací (Picardeau, 2008). A větší účinnosti homologní

rekombinace u *L. biflexa* bylo dosaženo úpravou plazmidového vektoru UV zářením a alkalizací (Picardeau *et al.*, 2001).

3.2.3 Cílená mutageneze

V roce 2008 byla poprvé použita místně cílená homologní rekombinace u *L. interrogans* (Croda *et al.*, 2008). Do genomu leptospiry se začlenil plazmid obsahující 5'- a 3'- zkrácené fragmenty genu *ligB*. Tento gen je zodpovědný za tvorbu proteinu Lig, u kterého se předpokládá podíl na virulenci leptospir, ale ukázalo se, že i při porušení tohoto genu bakterie neztratily svou virulenci ani schopnost přilnutí k epitelu. Pro zkoumání vlivu na patogenезi byl použit stejný systém i pro gen *mce* u *L. interrogans* (Zhang *et al.*, 2012).



Obr. 3: Narušení genu *ligB* v *L. interrogans*. (a) Genomická DNA wild-type kmene. (b) Plazmidová DNA. (c) Genomická DNA mutovaného kmene. (Croda *et al.*, 2008; upraveno)

Širší využití měla cílená mutageneze u *L. biflexa*. Podařilo se použít translační fúzi genu *kdpE* s promotorem a oblastí počátku translace (Matsunaga a Coutinho, 2012). Celá fúze byla následně přenesena do plazmidu, který byl poté denaturován a elektroporací vnesen do bakterie. A v roce 2014 byla také úspěšně provedena metoda selektivního vývoje ligandů, kterou byly zkoumány vlastnosti proteinu HemR (Morero *et al.*, 2014). Žádný z těchto postupů se ale zatím nepodařilo zopakovat i s *L. interrogans*.

Cílenou mutagenezi lze využít také jako reportérový marker (Aviat *et al.*, 2010). Do buňky *L. interrogans* je vnesen plazmid, který obsahuje gen pro zelený fluorescenční protein (GFP). Pokud se plazmid úspěšně začlení do genomu bakterie, dojde k fluorescenci leptospir. Fluorescence ale není dostatečně silná, aby byla viditelná i ve tkáních.

3.2.4 Náhodná mutageneze

Kromě cílené mutageneze je možná i náhodná mutageneze pomocí transpozonu *Himar1*, který patří do rodiny *mariner* (Bourhy *et al.*, 2005). Tyto transpozony jsou využívány v mutagenezi hostitelů rozdílných druhů, protože nevyžadují specifického hostitele. Transpozon se vloží do plazmidu, který je do cílové buňky přenesen elektroporací.

Tímto způsobem byla u *L. interrogans* zkoumána řada genů ovlivňujících pohyblivost, virulenci, schopnost růstu a tvorbu proteinů vnější membrány (Murray *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2010). Dále také plazmidem, který obsahoval transpozon *Himar1* a rezistenci ke kanamycinu, byla narušena syntéza periplazmatické katalázy (KatE) a tím zkoumáno přežívání leptospir za oxidativního stresu *in vivo* (Eshghi *et al.*, 2012).

3.3 GENETICKÁ MANIPULACE U BORÉLIÍ

3.3.1 *Borrelia burgdorferi*

Poprvé se genetická manipulace u borélií podařila v roce 1994, kdy do genomu bakterie byla elektroporací doručena DNA obsahující gen pro rezistenci ke coumerycinu (Samuels *et al.*, 1994). DNA kódující tuto rezistenci byla získána z přirozeně rezistentních kolonií *B. burgdorferi* a následně byla elektroporací zanesena do wild-type buněk. Po místně cílené mutagenezi vznikly kolonie rezistentní na coumerycin.

Dnes je běžná metoda cílené inaktivace alelickou výměnou, kromě toho jsou také vytvořeny stabilní vektory pro komplementaci a heterologní genovou výměnu. Možná je též transpozonová mutageneze.

Transformace borélií se setkává s nízkou účinností. Tento problém se podařilo obejít použitím vysokých dávek DNA, která byla k transformaci použita (Bono *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2001; Eggers *et al.*, 2002).

3.3.1.1 Komplementace genů

Ke komplementaci v roce 2001 použili vektor odvozený z plazmidu cp9, který byl schopný autonomní replikace v *B. burgdorferi* (Stewart *et al.*, 2001). Později byly vytvořeny další vektory na základě endogenních plazmidů například plazmidu cp32 (Eggers *et al.*, 2002) nebo cp26, který se ukázal jako esenciální pro růst bakterie (Byram *et al.*, 2004). Ve všech

těchto případech byla jako selektivní marker použita rezistence ke kanamycinu pod kontrolou promotoru *flaB* nebo *flgB* z *B. burgdorferi*.

Kromě endogenních plazmidů byl použit také plazmid se širokým spektrem hostitelů pGK12, který obsahoval geny *ermC* a *cat* (Sartakova *et al.*, 2000). Pod kontrolou promotoru *flaB* se pomocí tohoto plazmidu podařilo také exprimovat gen pro GFP.

3.3.1.2 Náhodná mutageneze

V roce 2004 byl k náhodné mutagenezi použit plazmid, který v sobě obsahoval transpozon (Stewart *et al.*, 2004). Transpozony z rodiny *mariner* se dokáží včleňovat do genomu širokého rozmezí buněk, jak prokaryotických tak eukaryotických, což umožňuje jejich využití i pro *B. burgdorferi*. Transpozon *Himar1 mariner* byl vložen do plazmidu pMarGent společně s kazetou *aacCI* kódující rezistenci ke gentamicinu, obojí pod kontrolou promotoru pro *flgB*. A tento plazmid byl použit k náhodné mutagenezi *B. burgdorferi*.

Tato metoda využívající plazmid pMarGent byla využita i při studiu virulence *B. burgdorferi* (Botkin *et al.*, 2006). Transpozon byl zaveden do infekčních kmenů, na základě rezistence k gentamicinu byly vybrány transformované kolonie a u těch se následně sledovala schopnost infikovat myši.

3.3.1.3 Inducibilní systém mutageneze

K mutagenezi *B. burgdorferi* byl využit i *lac* operon (Groshong *et al.*, 2012). Otevřený čtecí rámec (ORF) genu *rrp2* byl vložen do vektoru, který v sobě obsahoval *lacI* represor a izopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) inducibilní T5 promotor. Tento systém umožňuje identifikaci genů, které jsou regulovány genem *rrp2*. V přítomnosti IPTG je gen *rrp2* exprimován. Po vymytí IPTG je možné sledovat změny v expresi genů, když se *rrp2* neexprimuje.

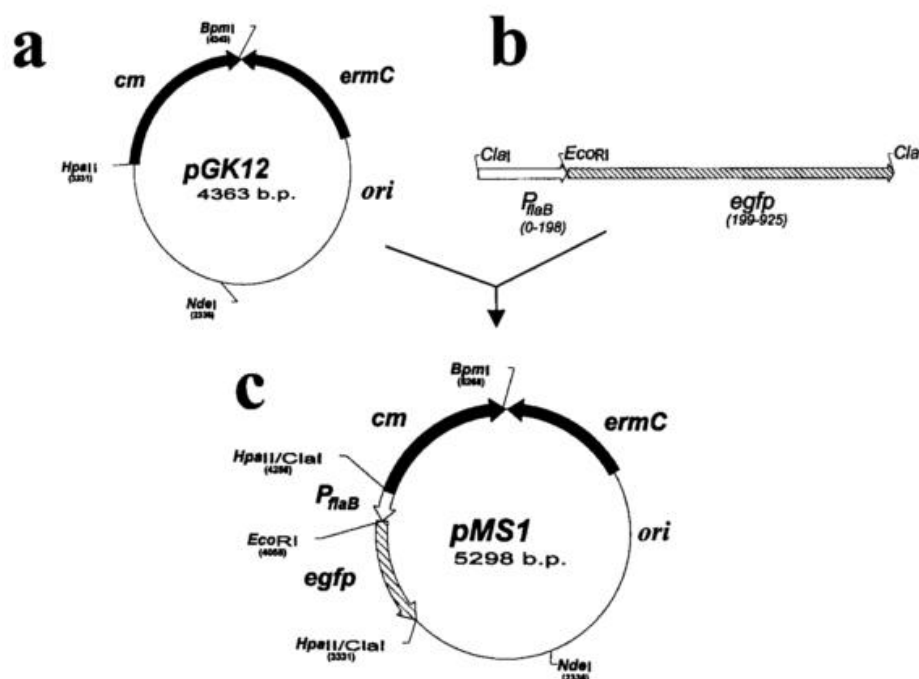
Stejná metoda byla použita i při studiu genu *dhhP*, který byl pod kontrolou IPTG inducibilního promotoru vložen do wild-type kmene *B. burgdorferi* (Ye *et al.*, 2014). Gen *dhhP* byl následně inaktivován. Podařilo se zjistit, že tento gen je esenciální pro růst bakterií. Mutanti s inaktivovaným genem *dhhP* mají poškozený hlavní faktor virulence OspC a je narušena jejich schopnost infikovat savce.

3.3.1.4 Selektivní markery

Jako selektivní markery byla využita řada genů pro rezistence k antibiotikům. Jako první to byla již zmiňovaná rezistence ke coumermycinu, která se u *B. burgdorferi* vyskytuje spontánně (Samuels *et al.*, 1994).

Kromě rezistencí, které se u borélií vyskytují přirozeně, byly vytvořeny také hybridní geny, které vznikly spojením promotorů borélií s cizími ORF. Jako příkladně kombinace promotorů *B. burgdorferi* pro geny *flaB* a *flgB* s kazetou *kan* (Bono *et al.*, 2000). Tímto plazmidem následně narušili některé z genů *B. burgdorferi* (například *oppAV*) pomocí homologní rekombinace. Stejným způsobem vznikla také rezistence ke gentamicinu (Elias *et al.*, 2003). V tomto případě do plazmidu s rezistencí ke kanamycinu a promotorem z *B. burgdorferi* přidali kazetu *aacC1* rovněž spojenou s promotorem *flgB* nebo *flaB* *B. burgdorferi*.

Pomocí kazety *aadD* spojené s promotorem *flgB* získali kolonie rezistentní na streptomycin a spektinomycin (Frank *et al.*, 2003). V roce 2000 byla také použita rezistence k erytromycinu (*ermC*) získaná z buněk *Staphylococcus aureus* za použití promotoru *flaB*, které vložili do plazmidu pGK12 (Sartakova *et al.*, 2000).



Obr. 4: Konstrukce plazmidu pMS1. (a) Plazmid pGK12 obsahující gen *ermC*. (b) Produkt amplifikace PCR obsahující promotor *P_{flaB}* a gen *egfp*. (c) Rekombinantní plazmid pMS1. (Sartakova *et al.*, 2000; upraveno)

3.3.1.5 Reportérové geny

Gen *cat* získaný z Tn9 *E. coli* byl použit jako reportérový gen za využití promotoru *ospA*, *ospC* nebo *flaB* z *B. burgdorferi* (Sohaskey *et al.*, 1997).

Nový reportérový gen byl vytvořen v roce 2007 (Blevins *et al.*, 2007). Za pomoci *lac* operonu se tehdy podařilo u *B. burgdorferi* aktivovat gen *luc*, který kóduje luciferázu.

Nejvíce využívaný je ale gen *gfp*, který kóduje GFP, v buňkách je následně možné detekovat fluorescenční signály. Gen *gfp* byl exprimován pod kontrolou *flaB* v plazmidu pGK12 (Sartakova *et al.*, 2000). Ve vektoru odvozeném od cp32 se podařila také exprese zeleného, žlutého a tyrkysového fluorescenčního proteinu (Eggers *et al.*, 2002).

3.3.2 *Borrelia hermsii*

V roce 2011 se podařilo získat buňky *B. hermsii*, které produkovaly GFP (Fine *et al.*, 2011). Byl to teprve druhý případ mutagenese u této spirochety. Bakterie byla transformována plazmidem pFAEV3, který obsahoval jako selektivní marker kazetu *kan* a gen *gfp*. Tento plazmid byl elektroporací vnesen do buněk *B. hermsii*, kde se následně ukázal jako stabilní. Po místně cílené mutagenesi byly buňky rezistentní na kanamycin a produkovaly GFP a to i po několika pasážích a během infekce v myších.

Od vektoru pFAEV3 byl později odvozen další vektor přidáním genu *B. hermsii fhbA*, který byl tímto způsobem zkoumán (Fine *et al.*, 2014).

V roce 2013 byl gen *fliH* spojen s promotorem *flaB* a vložen do vektoru, který již obsahoval kazetu *pflaB-kan* (Guyard *et al.*, 2013). Díky této metodě se podařilo zjistit vliv genu *fliH* na pohyb buněk. Protein FliH reguluje syntézu proteinu FlaA. Při narušení genu *fliH* byl počet bičků na buňkách nižší, buňky se hůře pohybovaly a ztratily schopnost infikovat myši.

3.4 GENETICKÁ MANIPULACE U TREPONEM

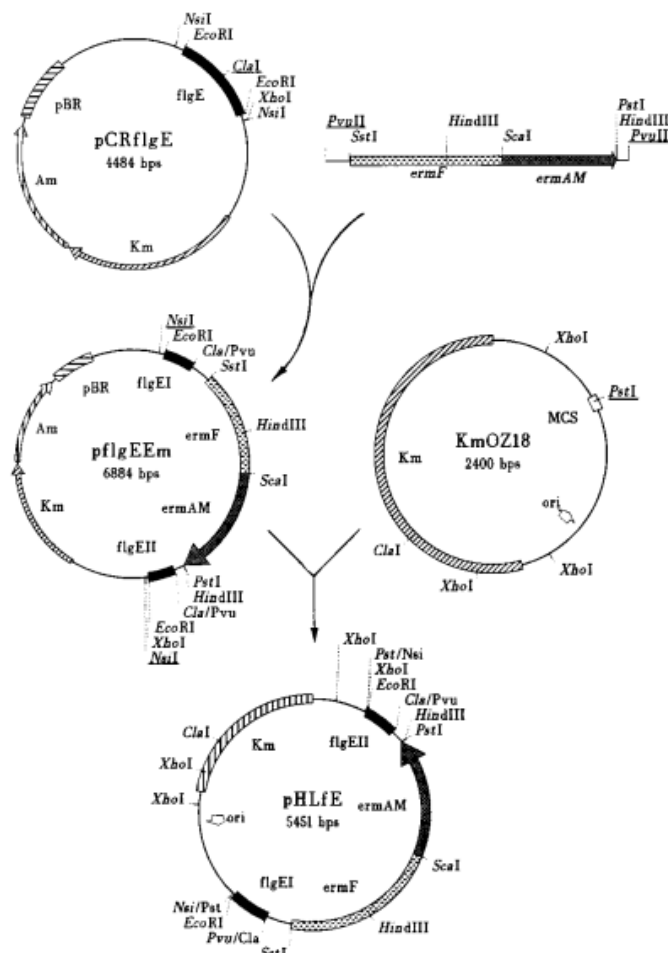
Výzkum genetické manipulace u treponem má největší úspěchy s *T. denticola*, která patří mezi kultivovatelné treponemy. Proto je tato kapitola zaměřena právě na ni.

K manipulaci s genetickým materiálem u treponem byly jako vektory použity plazmidy se širokým rozmezím hostitelů a endogenní kryptické plazmidy. Tyto vektory byly

do hostitelských buněk dopraveny elektroporací. Byl získán nízký počet transformantů (méně než 100 na μg DNA), což je způsobeno přítomností restričních enzymů (Chi *et al.*, 1999).

3.4.1 Plazmid se širokým spektrem hostitelů

Jako první se podařilo inaktivovat geny *T. denticola* elektroporací v roce 1996 (Li *et al.*, 1996). Byl využit linearizovaný plazmid se širokým rozmezím hostitelů pKT210 obsahující gen *flgE* inaktivovaný vloženou kazetou s rezistencí k erytromycinu (Em^r), která obsahovala geny *ermF* a *ermAM*, které sloužily jako selektiví markery. V buňkách proběhla homologní rekombinace a rezistentní kolonie byly získány s četností 0,9 kolonie na μg plazmidu. Gen *flgE* kóduje proteiny bičíkového háčku, proto mutace vyústila v poškození bičíku a kompletní ztrátu pohyblivosti.



Obr. 5: Konstrukce plazmidu pHLfE obsahujícího gen *flgE* inaktivovaný Em^r kazetou. Plazmid pCRflgE obsahující gen *flgE* byl štěpen ve fragmentu *flgE* pomocí *Cla*I. Do tohoto místa byla vložena kazeta *ermF-ermAM*. Vzniklý plazmid byl poté štěpen *Nsi*I a fragment obsahující *flgE-Em^r* byl izolován a vložen do plazmidu pKmOZ18, aby vznikl plazmid pHLfE. (Li *et al.*, 1996)

Stejná metoda byla využita i při zkoumání dalších genů *T. denticola*. V roce 1997 byla *T. denticola* transformována plazmidem s genem *dmcA* a Em^r kazetou (Kataoka *et al.*, 1997). Gen *dmcA* je součástí metyl-akceptujících chemotaktických proteinů (MCP), které se účastní chemotaxe bakterií, ovlivňují tak jejich pohyblivost a schopnost pronikat do tkání periodontia. Ukázalo se, že vytvoření mutantů mělo normální stavbu bičíku, ale mělo narušenou pohyblivost.

Další výzkum se zaměřil na geny kódující povrchové antigeny Msp a CTLP (Fenno *et al.*, 1998). Proteiny Msp zodpovídají za tvorbu pórů v membránách buněk a CTLP je nutný pro migraci treponemy přes bazální membránu. Jejich součástí jsou také proteiny PrcA a PrtP (Lee *et al.*, 2002). Protein PrtP je dentilisin, který má proteázovou aktivitu a patří do skupiny povrchových antigenů CTLP. Protein PrcA má důležitou roli v expresi antigenů Msp. Geny pro oba tyto proteiny byly zkoumány v roce 2002, kdy byly narušeny kazetou *ermF-ermAM*. Navíc při elektroporaci byly buňky vystaveny UV záření, aby byla zvýšena účinnost transformace.

V roce 1999 byl zkoumán gen *tap1*, který je prvním genem v operonu *fla* (Limberger *et al.*, 1999). Protein FlaA, který je kódován tímto operonem, je součástí buněčného bičíku. Opět byla použita elektroporace plazmidu s genem *tap1* narušeným *ermF-ermAM* kazetou. Po alelické výměně se u bakterií objevil očekávaný fenotyp se sníženou pohyblivostí buněk.

Stejný postup byl zopakován s genem *dmcB* (Li *et al.*, 1999) nebo geny *oppA* a *oppF*, které kódují s membránou asociovaný protein (Fenno *et al.*, 2000). Ukázalo se, že protein OppA interaguje s hostitelskými tkáněmi a podílí se na vyvolání imunitní odpovědi navázáním hostitelských proteinů.

V roce 2001 nahradili wild-type gen *cfpA* inaktivovaným genem *cfpA* (Izard *et al.*, 2001). Tento gen kóduje hlavní protein, kterým jsou tvořena filamenta. Gen inaktivovali pomocí plazmidu s genem *cfpA* narušeným kazetou *ermF-ermAM*. Vzniklé buňky přežívaly a ani neměly změněnou strukturu, ale místo toho, aby se vyskytovaly jednotlivě, utvářely řetězce, které se hůře pohybovaly.

Ke zjištění funkce TDE0471 použili inaktivaci alelickou výměnou (Kurniyati *et al.*, 2013). Do plazmidu vložili rezistenci k erytromycinu a po transformaci byl rezistencí narušen normální TDE0471. Tímto se potvrdilo podezření, že se tento protein je neuraminidáza. Neuraminidáza je enzym, který katalyzuje odstranění sialových kyselin z glykokonjugátů, které některé bakterie začleňují do svých vlastních povrchových molekul, aby unikaly imunitnímu systému hostitele. Rozlišuje se exo- neuraminidáza, která štěpí α 2,3-, α 2,6-

a α 2,8- glykosidické vazby koncových sialových kyselin, a endo- neuraminidáza, která hydrolyzuje α 2,8-, sialosylové vazby v oligo- a poly- sialových kyselinách.

Nevýhodou plazmidu pKT210 je jeho nestabilita v buňkách *T. denticola* (Li *et al.*, 1999).

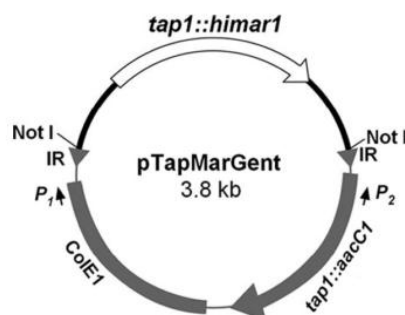
3.4.2 Kryptický plazmid

Na základě kryptického plazmidu pTS1 z *T. denticola* byl vytvořen vektor pKMOZ19, který byl poté použit jako vektor mezi *E. coli* a *T. denticola* (Chi *et al.*, 1999). Jako selektivní marker opět sloužila rezistence k erytromycinu. Elektroporací se podařilo získat 0,5 – 1 transformovaných kolonií na μ g DNA a byla prokázána nezávislá replikace a stabilita vektoru v *T. denticola*.

Díky vzájemné podobnosti *T. denticola* a *T. pallidum* mohla *T. denticola* sloužit také jako hostitel pro expresi heterologních genů *T. pallidum*. Do plazmidu pKMOZ19 byl vložen gen *flaA* z *T. pallidum* a elektroporací přenesen do *T. denticola*. Pomocí Western blotu byla zjištěna úspěšná produkce proteinu FlaA v *T. denticola* a to i po několika pasážích. Tímto se podařilo prokázat, že je možná exprese proteinů *T. pallidum* v *T. denticola*.

3.4.3 Transpozonová mutageneze

V roce 2008 se podařilo docílit také transpozonové mutageneze (Yang *et al.*, 2008). Byl použit transpozon *Himar 1* z rodiny *mariner*, který byl už dříve použit u *B. burgdorferi* a leptospir. Jako selektivní marker byla použita rezistence ke gentamicinu a bylo docíleno náhodné mutageneze, ale s poměrně nízkou účinností.



Obr. 6: Konstrukce vektoru pTapMarGent pro *T. denticola*. Tento vektor byl sestaven úpravami vektoru pMarGent, který se používal u *B. burgdorferi*. Promotor *flgB* z *B. burgdorferi* byl nahrazen promotorem *tap1* z *T. denticola*. (Yang *et al.*, 2008)

3.4.4 *Selektivní markery*

Do roku 2002 se ve výzkumu mutageneze *T. denticola* používala jako selektivní marker rezistence k erytromycinu. Později se ale začaly objevovat také rezistence k dalším antibiotikům, u kterých se ukázalo, že jsou vhodné pro toto použití.

Příkladem může být rezistence ke coumermycinu (Chi *et al.*, 2002). Z kmene *T. denticola* rezistentního na coumermycin byla získána DNA a ta společně s genem *flgE* z nerezentního kmene vložena do plazmidu pKMR4PE. Plazmid byl elektroporací vnesen do *T. denticola* a sledoval se vznik rezistentních kolonií. Tyto kolonie byly defektní ve sledovaném genu *flgE*, což vedlo k nepohyblivosti bakterií. Ukázalo se tedy, že i této rezistence lze využít jako selektivního markeru.

Problémem rezistence ke coumermycinu je to, že se často vyskytují i spontánně rezistentní kmeny a není tedy jasné, jestli sledované kolonie získaly svou rezistenci transformací nebo přirozenou mutací.

Zkoumala se také rezistence k chloramfenikolu, která byla získána z kmenů *S. aureus* (Slivenski-Gebhardt *et al.*, 2004). Kazeta s rezistencí byla vložena do plazmidu pKM4PEMCS společně s genem *fliG* z *T. pallidum*. Tímto plazmidem byl komplementován narušený gen *fliG* u *T. denticola*.

V roce 2008 byla použita rezistence ke gentamicinu (*aacCI*) při náhodné mutagenezi pomocí transpozonu *Himar I* (Yang *et al.*, 2008). Pro tento způsob mutageneze se rezistence *aacCI* ukázala jako vhodný marker. Kazeta *aacCI* byla rovněž použita k cílené mutagenezi *T. denticola* (Bian *et al.*, 2012). Mutageneze byla zaměřena na gen *prcA*, který kóduje lipoprotein, jenž je součástí membrány proteázového komplexu. Vytvořeným plazmidem obsahujícím *aPrCA::aacCm* byla transformována *T. denticola*. Ukázalo se, že celý gen *prcA* byl nahrazen kazetou *aacCm* a je tedy možné tuto kazetu použít k cílené mutagenezi *T. denticola*.

A v roce 2015 byla vytvořena řada plazmidů s kazetami pro rozdílné rezistence, aby byly vybrány vhodné selektivní markery pro mutagenezi treponem (Li, 2015). Ve všech případech byly kazety spojeny s promotorem pro *ermF* a cílené geny byly inaktivovány prostřednictvím alelické výměny. Plazmidy byly transformovány do *E. coli* a výsledky se hodnotily podle srovnání s rezistencí k erytromycinu. Jako vhodná se ukázala kazeta *kan*, která byla následně vnesena do *T. denticola*, aby inaktivovala gen pro β -1,4-galaktosyltransferázu. Po této úspěšné inaktivaci se pokračovalo s inaktivacemi dalších genů a bylo zjištěno, že tuto kazetu lze použít i bez promotoru.

4. *TREPONEMA PALLIDUM*

T. pallidum je patogenní spirocheta, která obsahuje jeden kružnicový chromozom. Norgard a Miller (1981) také našli v buňkách *T. pallidum* plazmidovou DNA. Protože se nepodařilo plazmid izolovat z hostitelských tkání a mezi DNA králíků, ve kterých byla treponema kultivována, a plazmidem nebyla zjištěna homologie, mělo se jednat o plazmid pocházející přímo z *T. pallidum*. Tento objev se už ale později nepodařilo potvrdit.

4.1 KOMPLEMENTACE

Protože tato spirocheta je kultivovatelná pouze v králících, jsou metody genetické manipulace takřka nemožné. Doposud se podařilo zkoumat geny *T. pallidum* pomocí komplementace v *E. coli* nebo *T. denticola*.

V případě *E. coli* byl například pomocí transpozonu *TnphoA* sledován gen *tpr50* (Hardham a Stamm, 1994). Protein TpN50 je homologní k proteinům vnější membrány jiných druhů bakterií, například *OmpA* u *E. coli*. Toho využili a narušený gen *ompA* komplementovali pomocí *tpr50*.

U *T. denticola* je výhoda její podobnost s *T. pallidum*, takže v buňkách *T. denticola* mohly být exprimovány geny *T. pallidum* (Chi *et al.*, 1999; Slivenski-Gebhardt *et al.*, 2004).

Problémem těchto metod je, že nevíme, u kterých genů *T. pallidum* lze komplementaci provést, zda u všech nebo pouze u určité skupiny. Kromě toho, sledujeme pouze expresi genů v jiných buňkách, ale nepozorujeme vliv genů přímo v *T. pallidum* a jejich případný vliv na patogenezí.

4.2 VYTVOŘENÍ VEKTORU

Největší překážkou v genetické manipulaci s *T. pallidum* je nemožnost kultivace v kultivačním mediu nebo na tkáňových kulturách. Pokud by byla překonána tato překážka, další postup by byl usnadněn.

Jako vektor pro manipulaci by mohl být použit exogenní plazmid nebo linearizovaná DNA. Přestože neexistují transpozony specifické pro *T. pallidum*, mohl by být použit transposon se širokým rozmezím hostitelů *Himar I*, který už byl využit při manipulaci

s *T. denticola*, *B. burgdorferi* nebo leptospirami (Botkin *et al.*, 2006; Bourhy *et al.*, 2005, Stewart *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008).

Do tohoto vektoru mohou být vloženy selektivní nebo reportérové markery. K léčbě *T. pallidum* se běžně používá penicilin, ke kterému si treponemy nevytvořily rezistenci (Stamm, 2010). Vznik rezistence byl ale pozorován u makrolidů, které se rovněž používají k léčbě. Tato rezistence vzniká na základě mutace v 23S rRNA genu. Rezistence k antibiotikům, která se využívají k léčbě, nejsou vhodné jako selektivní markery. Byly pozorovány také rezistence na další antibiotika, například na klindamycin nebo rifampicin.

Stejně jako u *T. denticola* by mohla být jako selektivní marker použita rezistence k erytromycinu (Li *et al.*, 1996), coumermycinu (Chi *et al.*, 2002) nebo gentamicinu (Yang *et al.*, 2008), u kterých by pravděpodobně nehrozilo riziko rozšíření rezistence, která by bránila v léčbě. Kazety obsahující tyto rezistence by mohly být spojeny s promotory, které byly získány přímo z *T. pallidum*, aby se zvýšila úspěšnost jejich exprese.

Jako reportérový gen se často používá *gfp* (Sartakova *et al.*, 2000), který by se pravděpodobně mohl použít i v případě *T. pallidum*. V cílových buňkách by poté mohlo dojít k produkci GFP a byla by pozorovatelná fluorescence.

Následně by vytvořené vektory byly transformovány do buněk *T. pallidum* elektroporací, stejně jako ve všech ostatních případech genetické manipulace se spirochetami. V buňkách by mohlo následně dojít k místně cílené mutagenезi nebo náhodné mutagenезi za použití transpozonu.

5. ZÁVĚR

Patogenní spirochety patří do čeledi bakterií, které jsou obtížně kultivovatelné a mají svou specifickou stavbu buněk a složení genetického materiálu. Pro řadu z těchto spirochet již byly vyvinuty metody genetické manipulace, a to i přes obtíže týkající se právě náročného zacházení s těmito bakteriemi a nedostatkem známých způsobů přirozeného genového přenosu.

V této práci jsou shrnuty metody, které byly doposud vytvořeny pro genetickou manipulaci u patogenních spirochet *B. hyodysenteriae*, *L. interrogans*, *B. burgdorferi*, *B. hermsii* a *T. denticola*. I přes nedostatečné znalosti o přirozeném genovém přenosu se podařilo docílit úspěšné transformace spirochet. Často se vyskytovala nízká účinnost transformace, která byla v některých případech vysvětlena přítomností restričních enzymů. Vytvořené metody jsou i přesto úspěchem pro další výzkum v této oblasti.

T. pallidum doposud nebyla geneticky modifikována především proto, že se nepodařilo ji úspěšně kultivovat. Po úspěšné kultivaci by mohly být pro genetickou manipulaci použity metody, které byly již dříve aplikovány na ostatní spirochety (především na *T. denticola*, která je *T. pallidum* podobná), proto je závěr práce věnován právě metodám, které by mohly být u *T. pallidum* použity.

Genetická manipulace je důležitý nástroj pro studování bakterií, často jsou tímto způsobem zkoumány geny, u kterých se očekává spojitost s patogenezí. Pro *T. pallidum* tento nástroj ale chybí. Po úspěšném vytvoření vektoru a transformaci *T. pallidum* by mohlo být prohloubeno poznání této spirochety.

6. LITERATURA

- Aviat F., Slamti L., Carqueira G. M., Lourdault K., Picardeau M.,** 2010; Expanding the Genetic Toolbox for *Leptospira* Species by Generation of Fluorescent Bacteria. *Appl Environ Microb* 76: 8135-8142
- Barbour A. G., Hayes S. F.,** 1986; Biology of *Borrelia* Species. *Microbiol Rev* 50: 381-400
- Baril C., Richaud C., Fournié E., Baranton G., Saint Girons I.,** 1992; Cloning of *dapD*, *aroD* and *asd* of *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, and nucleotide sequence of the *asd* gene. *J Gen Microbiol* 138: 47-53
- Bian J., Fenno J. C., Li C.,** 2012; Development of a Modified Gentamicin Resistance Cassette for Genetic Manipulation of the Oral Spirochete *Treponema denticola*. *Appl Environ Microb* 78: 2059-2062
- Blevins J. S., Revel A. T., Amith A. H., Bachlani G. N., Norgard M. V.,** 2007; Adaptation of a Luciferase Gene Reporter and *lac* Expression System to *Borrelia burgdorferi*. *Appl Environ Microb* 73: 1501-1513
- Bono J. L., Elias A. F., Kupko J. J., Stevenson B., Tilly K., Rosa P.,** 2000; Efficient Targeted Mutagenesis in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 182: 2445-2452
- Botkin D. J., Abbott A. N., Stewart P. E., Rosa P. A., Kawabata H., Watanabe H., Norris S. J.,** 2006; Identification of Potential Virulence Determinants by *HimarI* Transposition of Infectious *Borrelia burgdorferi* B31. *Infect Immun* 74: 6690-6699
- Bourhy P., Louvel H., Saint Girons I., Picardeau M.,** 2005; Random insertional mutagenesis of *Leptospira interrogans*, the agent of leptospirosis, using a *mariner* transposon. *J Bacteriol* 187: 3255-3258
- Bourhy P., Salaün L., Lajus A., Médingue C., Boursaux-Eude C., Picardeau M.,** 2007; A Genomic Island of the Pathogen *Leptospira interrogans* Serovar Lai Can Excise from Its Chromosome. *Infect Immun* 75: 677-683
- Byram R., Stewart P. E., Rosa P.,** 2004; The Essential Nature of the Ubiquitous 26-Kilobase Circular Replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 186: 3561-3569
- Croda J., Pereira Figueira C., Wunder E. A. Jr., Santos C. S., Reis M. G., Ko A. I., Picardeau M.,** 2008; Targeted Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species: Disruption of the *LigB* Gene Does Not Affect Virulence in Animal Models of Leptospirosis. *Infect Immun* 76: 5826-5833

- Dahle U. R., Tronstad L., Olsen I.**, 1993; Spirochaetes in oral infections. *Endod Dent Traumaol* 9: 87-94
- Eshghi A., Lourdault K., Murray G. L., Bartpho T., Sermswan R. W., Picardeau M., Adler B., Snarr B., Zuerner R. L., Cameron C. E.**, 2012; *Leptospira interrogans* Catalase Is Required for Resistance to H₂O₂ and for Virulence. *Infect Immun* 80: 3892-3899
- Eggers C. H., Caimano M. J., Clawson M. L., Miller W. G., Samuels D. S., Radolf J. D.**, 2002; Identification of loci critical for replication and compatibility of a *Borrelia burgdorferi* cp32 plasmid and use of a cp32-based shuttle vector for the expression of fluorescent reporters in the Lyme disease spirochaete. *Mol Microbiol* 43: 281-295
- Elias A. F., Bono J. L., Kupko J. J., Stewart P. E., Krum J. G., Rosa P. A.**, 2003; New Antibiotic Resistance Cassettes Suitable for Genetic Studies in *Borrelia burgdorferi*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 6: 29-40
- Fenno J. C., Wong G. W. K., Hannam P. M., McBride B. C.**, 1998; Mutagenesis of outer membrane virulence determinants of the oral spirochete *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett* 163: 209-215
- Fenno J. C., Tamura M., Hannam P. M., Wong G. W. K., Chan R. A., McBride B. C.**, 2000; Identification of a *Treponema denticola* OppA Homologue That Binds Host Proteins Present in the Subgingival Environment. *Infect Immun* 68: 1884-1892
- Fine L. M., Earnhart C. G., Marconi R. T.**, 2011; Genetic Transformation of the Relapsing Fever Spirochete *Borrelia hermsii* : Stable Integration and Expression of Green Fluorescent Protein from Linear Plasmid 200. *J Bacteriol* 193: 3241-3245
- Fine L. M., Miller D. P., Mallory K. L., Tegels B. K., Earnhart C. G., Marconi R. T.**, 2014; The *Borrelia hermsii* Factor H Binding Protein FhbA Is Not Required for Infectivity in Mice or for Resistance to Human Complement *In Vitro*. *Infect Immun* 82: 3324-3332
- Frank K. L., Bundle S. F., Kresge M. E., Eggers C. H., Samuels D. S.**, 2003; *aadA* Confers Streptomycin Resistance in *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 185: 6723-6727
- Groshong A. M., Gibbons N. E., Yang X. F., Blevins J. S.**, 2012; Rrp2, a Prokaryotic Enhancer-Like Binding Protein, Is Essential for Viability of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* 194: 3336-3342
- Guyard C., Raffel S. J., Schrupf M. E., Dahlstrom E., Sturdevant D., Ricklefs S. M., Martens C., Hayes S. F., Fischer E. R., Hansen B. T., Porcella S. F., Schwan T. G.**, 2013; Periplasmic Flagellar Export Apparatus Protein, FliH, Is

- Involved in Post-Transcriptional Regulation of FlaB, Motility and Virulence of the Relapsing Fever Spirochete *Borrelia hermsii*. PLoS ONE 8: 1-12
- Hardham J. M., Stamm L. V.**, 1994; Identification and Characterization of the *Treponema pallidum* *tpn50* Gene, an *ompA* Homolog. Infect Immun 62: 1015-1025
- Holt S. C.**, 1978; Anatomy and Chemistry of Spirochetes. Microbiol Rev 42: 114-160
- Humphrey S. B., Stanton T. B., Jensen N. S., Zuerner R. L.**, 1997; Purification and Characterization of VSH-1, a Generalized Transducing Bacteriophage of *Serpulina* *hyodysenteriae*. J Bacteriol 179: 323-329
- ter Huurne A. A. H. M., van Houten M., Muir S., Kusters J. G., van der Zeijst B. A. M., Gastra W.**, 1992; Inactivation of a *Serpula (Treponema) hyodysenteriae* hemolysin gene by homologous recombination: Importance of this hemolysin in pathogenesis of *S. hyodysenteriae* in mice. FEMS Microbiol Lett 92: 109-113
- Chi B., Chauhan S., Kuramitsu H.**, 1999; Development of a System for Expressing Heterologous Genes in the Oral Spirochete *Treponema denticola* and Its Use in Expression of the *Treponema pallidum* *flaA* Gene. Infect Immun 67: 3653-3656
- Chi B., Limberger R. J., Kuramitsu H. K.**, 2002; Complementation of a *Treponema denticola* *flgE* Mutant with a Novel Coumermycin A1-Resistant *T. denticola* Shuttle Vector System. Infect Immun 70: 2233-2237
- Izard J., Samsonoff W. A., Limberger R. J.**, 2001; Cytoplasmic Filament-Deficient Mutant of *Treponema denticola* Has Pleiotropic Defects. J Bacteriol 183: 1078-1084
- Joseph R., Holt S. C., Canale-Parola E.**, 1973; Peptidoglycan of Free-Living Anaerobic Spirochetes. J Bacteriol 115: 426-435
- Kataoka M., Li H., Arakawa S., Kuramitsu H.**, 1997; Characterization of a Methyl-Accepting Chemotaxis Protein Gene, *dmcA*, from the Oral Spirochete *Treponema denticola*. Infect Immun 65: 4011-4016
- Kennedy M. J., Rosnick D. K., Ulrich R. G., Yancey R. J.**, 1988; Association of *Treponema hyodysenteriae* with Porcine Intestinal Mucosa. J Gen Microbiol 134: 1565-1576
- Kurniyati K., Zhang W., Zhang K., Li C.**, 2013; A surface-exposed neuraminidase affects complement resistance and virulence of the oral spirochaete *Treponema denticola*. Mol Microbiol 89: 842-856
- Lee S. Y., Bian X. L., Wong G. W. K., Hannam P. M., McBride B. C., Fenno J. C.**, 2002; Cleavage of *Treponema denticola* PrcA Polypeptide To Yield Protease Complex-

- Associated Proteins Prca1 and Prca2 Is Dependent on PrtP. *J Bacteriol* 184: 3864-3870
- Leschine S. B., Canale-Parola E.**, 1980; Rifampin as a Selective Agent for Isolation of Oral Spirochetes. *J Clin Microbiol* 12: 792-795
- Levett P. N.**, 2001; Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev* 14: 296-326
- Li H., Ruby J., Charon N., Kuramitsu H.**, 1996; Gene Inactivation in the Oral Spirochete *Treponema denticola*: Construction of an *flgE* Mutant. *J Bacteriol* 178: 3664-3667
- Li H., Arakawa S., Deng Q. D., Kuramitsu H.**, 1999; Characterization of a Novel Methyl-Accepting Chemotaxis Gene, *dmcB*, from the Oral Spirochete *Treponema denticola*. *Infect Immun* 67: 694-699
- Li H., Ruby J., Wu H.**, 2015; Kanamycin Resistance Cassette for Genetic Manipulation of *Treponema denticola*. *Appl Environ Microb* 81: 4329-4338
- Limberger R. J., Slivenski L. L., Izard J., Samsonoff W. A.**, 1999; Insertional Inactivation of *Treponema denticola tap1* Results in a Nonmotile Mutant with Elongated Flagellar Hooks. *J Bacteriol* 181: 3743-3750
- Matsunaga J., Coutinho M. L.**, 2012; Positive Regulation of *Leptospira interrogans kdp* Expression by KdpE as Demonstrated with a Novel β -Galactosidase Reporter in *Leptospira biflexa*. *Appl Environ Microb* 78: 5699-5707
- Mitchison M., Bulach D. M., Vinh T., Rajakumar K., Faine S., Adler B.**, 1997; Identification and Characterization of the dTDP-Rhamnose Biosynthesis and Transfer Genes of the Lipopolysaccharide-Related *rfb* Locus in *Leptospira interrogans* Serovar Copenhageni. *J Bacteriol* 179: 1262-1267
- Morero N. R., Botti H., Nitta K. R., Carrión F., Obal G., Picardeau M., Buschiazzo A.**, 2014; HemR is an OmpR/PhoB-like response regulator from *Leptospira*, which simultaneously effects transcriptional activation and repression of key haem metabolism genes. *Mol Microbiol* 94: 340-352
- Murray G. L., Morel V., Cerqueira G. M., Croda J., Srikram A., Henry R., Ko A. I., Dellagostin O. A., Bulach D. M., Sermswan R. W., Adler B., Picardeau M.**, 2009; Genome-Wide Transposon Mutagenesis in Pathogenic *Leptospira* Species. *Infect Immun* 77: 810-816
- Murray G. L., Srikram A., Henry R., Hartskeeri R. A., Sermswan R. W., Adler B.**, 2010; Mutations affecting *Leptospira interrogans* lipopolysaccharide attenuate virulence. *Mol Microbiol* 78: 701-709

- Norgard M. V., Miller J. N.**, 1981; Plasmid DNA in *Treponema pallidum* (Nichols): potential for antibiotic resistance by syphilis bacteria. *Science* 213: 553-555
- Norris S. J., Cox D. L., Weinstock G. M.**, 2001; Biology of *Treponema pallidum*: Correlation of Functional Activities With Genome Sequence Data. *J Mol Microbiol Biotech* 3: 37-62
- Paster B. J., Canale-Parola E.**, 1980; Involvement of Periplasmic Fibrils in Motility of Spirochetes. *J Bacteriol* 141: 359-364
- Paster B. J., Dewhirst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hespell R. B., Stanton T. B., Zablén L., Mandelco N., Woese C. R.**, 1991; Phylogenetic Analysis of the Spirochetes. *J Bacteriol* 173: 6101-6109
- Picardeau M., Brenot A., Saint Girons I.**, 2001; First evidence for gene replacement in leptospira spp. Inactivation of *L. biflexa* *flaB* results in non-motile mutants deficient in endoflagella. *Mol Microbiol* 40: 189-199□
- Picardeau M.**, 2008; Conjugative transfer between *Escherichia coli* and *Leptospira* spp. as a new genetic tool. *Appl Environ Microb* 74: 319-322
- Rosey E. L., Kennedy M. J., Petrella D. K., Ulrich R. G., Yancey R. J. JR.**, 1995; Inactivation of *Serpulina hyodysenteriae* *flaA1* and *flaB1* Periplasmic Flagellar Genes by Electroporation-Mediated Allelic Exchange. *J Bacteriol* 177: 5959-5970
- Rosey E. L., Kennedy M. J., Yancey R. J. JR.**, 1996; Dual *flaA1 flaB1* Mutant of *Serpulina hyodysenteriae* Expressing Periplasmic Flagella Is Severely Attenuated in a Murine Model of Swine Dysentery. *Infect Immun.* 64: 4154-4162
- Saint Girons I., Bourhy P., Ottone C., Picardeau M., Yelton D., Hendrix R. W., Glaser P., Charon N.**, 2000; The LE1 Bacteriophage Replicates as a Plasmid within *Leptospira biflexa*: Construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* Shuttle Vector. *J Bacteriol* 182: 5700-5705
- Samuels D. S., Mach K. E., Garon C. F.**, 1994; Genetic Transformation of the Lyme Disease Agent *Borrelia burgdorferi* with Coumarin-Resistant *gyrB*. *J Bacteriol* 176: 6045-6049
- Sartakova M., Dobrikova E., Cabello F. C.**, 2000; Development of an extrachromosomal cloning vector system for use in *Borrelia burgdorferi*. *PNAS* 97: 4850-4855
- Slivenski-Gebhardt L. L., IZard J., Samsonoff W. A., Limberger R. J.**, 2004; Development of a Novel Chloramphenicol Resistance Expression Plasmid Used for Genetic Complementation of a *fliG* Deletion Mutant in *Treponema denticola*. *Infect Immun* 72: 5493-5497

- Sohaskey C. D., Arnold C., Barbour A. G., 1997;** Analysis of Promoters in *Borrelia burgdorferi* by Use of a Transiently Expressed Reporter Gene. *J Bacteriol* 179: 6837-6842
- Southern P. M., Sanford J. P., 1969;** Relapsing Fever. *Medicine* 48: 129-149
- Stamm L. V., Parrish E. A., Gherardini F. C., 1991;** Cloning of the *recA* gene from a free-living leptospire and disruption of RecA-like protein among spirochetes. *Appl Environ Microb* 57: 183-189
- Stamm L. V., 2010;** Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Ch* 54: 583-589
- Stanton T. B., Rosey E. L., Kennedy M. J., Jensen N. S., Bosworth B. T., 1999;** Isolation, Oxygen Sensitivity, and Virulence of NADH Oxidase Mutants of the Anaerobic Spirochete *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae*, Etiologic Agent of Swine Dysentery. *Appl Environ Microb* 65: 5028-5034
- Stanton T. B., Matson E. G., Humphrey S. B., 2001;** *Brachyspira* (*Serpulina*) *hyodysenteriae gyrB* Mutants and Interstrain Transfer of Coumermycin A₁ Resistance. *Appl Environ Microb* 67: 2037-2043
- Stewart P. E., Thalken R., Bono J. L., Rosa P., 2001;** Isolation of a circular plasmid region sufficient for autonomous replication and transformation of infections *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 39: 714-721
- Stewart P. E., Hoff J., Fischer E., Krum J. G., Rosa P. A., 2004;** Genome-Wide Transposon Mutagenesis of *Borrelia burgdorferi* for Identification of Phenotypic Mutants. *Appl Environ Microb* 70: 5973-5979
- Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E., 2008;** Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin N Am* 22: 217-234
- Yang Y., Stewart P. E., Shi X., Li C., 2008;** Development of a Transposon Mutagenesis System in the Oral Spirochete *Treponema denticola*. *Appl Environ Microb* 74: 6461-6464
- Ye M., Zhang J. J., Fang X., Lawlis G. B., Troxell B., Zhou Y., Gomelsky M., Lou Y., Yang X. F., 2014;** DhhP, a Cyclic di-AMP Phosphodiesterase of *Borrelia burgdorferi*, Is Essential for Cell Growth and Virulence. *Infect Immun* 82: 1840-1849
- Yelton D. B., Cohen R. A., 1986;** Analysis of Cloned DNA from *Leptospira biflexa* Serovar patoc Which Complements a Deletion of the *Escherichia coli trpE* Gene. *J Bacteriol* 165: 41-46

Zhang L., Zhang C., OjciusD. M., Sun D., Zhao J., Lin X., Li Li., Li La., Yan J., 2012;
The mammalian cell entry (Mce) protein of pathogenic *Leptospira* species is responsible for RGD motif-dependent infection of cells and animals. *Mol Microbiol* 83: 1006-1023