

# Razmnožavanje igll, iglg, pdpC mutanti Francisella tularensis subsp. holarctica unutar Acanthamoeba castellanii

---

**Nefat, Vedrana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:871022>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vedrana Nefat

RAZMNOŽAVANJE *iglI*, *iglG* i *pdpC* MUTANTI  
*FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *HOLARCTICA*  
UNUTAR *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

Završni rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI

MEDICINSKI FAKULTET RIJEKA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

SANITARNOG INŽENJERSTVA

Vedrana Nefat

RAZMNOŽAVANJE *iglI*, *iglG* i *pdpC* MUTANTI  
*FRANCISELLA TULARENSIS* SUBSP. *HOLARCTICA*  
UNUTAR *ACANTHAMOEBA CASTELLANII*

Završni rad

Rijeka, 2020.

**Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić**

**Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/ na \_\_\_\_\_,  
pred povjerenstvom u sastavu:**

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 33 stranice, 36 literaturnih navoda.

## **ZAHVALA**

**Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić na temi, iskazanom povjerenju i svim stručnim savjetima i sugestijama tijekom izrade ovog završnog rada, te na profesionalnom i ljubaznom odnosu.**

**Također, osobito bi se zahvalila doc. dr. sc. Mateji Ožanič i dr.sc. Valentini Marečić na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela ovog rada, te svom osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.**

**Za kraj, veliko hvala mojim roditeljima i sestri što su mi pružili najveću potporu, podršku, ohrabivali me i bili uz mene u svakom trenutku.**

**Hvala Vam!**

## SAŽETAK

Edward Francis najznačajniji je znanstvenik u području istraživanja tularemije. *Francisella tularensis* pripada porodici *Francisellaceae*, te je gram negativna, nepokretna, aerobna i asporogena bakterija. *F. tularensis* je jedna od najinfektivnijih bakterija, te udisajem samo 10-15 bakterija dovoljno je da se izazove smrtonosna bolest tularemija. *F. tularensis* smatra se potencijalnim biološkim oružjem, te se sva istraživanja moraju provoditi u BSL-3 laboratorijima, stupanj biološke zaštite 3 (engl. *Biosafety Level 3*). Poznate su tri podvrste *F. tularensis* koje uzrokuju bolest u ljudi: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B) i *mediasiatica*. *F. novicida*, *F. philomoragia* i *F. hispaniensis* mogu uzrokovati tularemiju kod imunokompromitiranih ljudi. *F. noatunensis* prepoznat je kako patogen riba, dok nedavno otkrivene vrste prilagođene okolišu uključuju *F. piscidida*, *F. guangzhouensis*, *F. opportunistica*, *F. salina*, *F. uliginis*, *F. 37 frigiditurris* i *F. adeliensis*. Sve podvrste *F. tularensis* razlikuju se po virulenciji, zemljopisnom porijeklu, i sposobnosti da izazovu bolest u ljudi ili u životinja. Prijenos i infekcija u ljudi i drugih sisavaca može se dogoditi prilikom kontakta sa zaraženim životinjama i životinjskim proizvodima, putem kontaminirane hrane i vode, ugrizom insekta poput krpelja i komaraca i aerosolom. Simptomi tularemije i ozbiljnost infekcije ovise o virulenciji uzročnika, načinu ulaska bakterije u organizam, te imunološkom stanju čovjeka. *F. tularensis* subsp. *holartica* LVS (engl. Live Vaccine Strain) je živo atenuirano cjepivo proizvedeno iz soja *holartica* u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. Uporaba cjepiva u SAD-u i njegovo licenciranje još nije omogućeno zbog nedostatka znanja o mehanizmima koji mogu oslabiti bakteriju. Geni koji se nalaze unutar FPO (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI) pokazali su važnu ulogu u unutarstaničnom preživljavanju i razmnožavanju *Franciselle* u stanicama sisavaca. Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi ulogu gena *iglI*, *iglG* i *pdpC* *F. tularensis* subsp. *holartica* u unutarstaničnom razmnožavanju *A. castellanii* kako bi razjasnili životni ciklus bakterije u okolišnim uvjetima. U praktičnom radu korišten je bakterijski soj *F. tularensis* LVS, njezine mutante *iglI*, *iglG* i *pdpC* i ameba *A. castellanii*. Rast bakterija u amebama pratio se kroz 3 dana. Rezultati su pokazali da geni *iglI*, *iglG* i *pdpC* nemaju ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju *F. tularensis* subsp. *holartica* soj LVS u amebi *A. castellanii* s obzirom da je broj bakterija u stanicama amebe isti kao i kod divljeg soja. Možemo zaključiti da bakterija ne ispoljava iste čimbenike virulencije u stanicama ameba i stanicama sisavaca.

**Ključne riječi:** *Francisella tularensis*, *iglI*, *iglG*, *pdpC*, razmnožavanje, *A. castellanii*

## SUMMARY

Edward Francis is the most significant scientist in the field of tularemia research. *F. tularensis* is a gram negative, aerobic, asporogenous, immobile bacteria that belongs to family *Francisellaceae*. *F. tularensis* is one of the most infectious bacteria that can cause deadly disease tularemia by inhalation of only 10-15 bacteria. It is considered that *F. tularensis* can be used as a biological weapon, which is why all research that includes *F. tularensis* must be conducted in BSL-3 laboratories. There are three subspecies of *F. tularensis* that can cause disease in humans: *tularensis* (type A), *holartica* (type B) and *mediasiatica*. *F. novicida*, *F. philomoragia* and *F. hispaniensis* can cause tularemia in immunocompromised people. On the other hand, *F. noatunensis* is known as a fish pathogen while recently discovered species adapted to the environment include *F. piscidida*, *F. guangzhouensis*, *F. opportunistica*, *F. salina*, *F. uliginis*, *F. 37frigiditurris* and *F. adeliensis*. All subspecies *F. tularensis* are different in virulence, geographical origin, and ability of causing diseases in humans or in animals. Transmission and infection in humans and other mammals can occur by contact with infected animals and animal products, through contaminated food and water, by insect bites such as ticks and mosquitoes and by aerosol. Symptoms of tularemia and severity of infections depend on the virulence of the pathogen, the way the bacteria enters the body, and the immune system. *F. tularensis* subsp. *holartica* LVS (Live Vaccine Strain) is live attenuated vaccine produced from *holartica* strains in the countries of the former Soviet Union. The use of the vaccine in the United States and its licensing has not been yet accomplished due to a lack of knowledge about mechanisms that can weaken the bacteria. Genes found within FPI (*Francisella pathogenicity island*) have shown an important role in intracellular survival and reproduction of *Francisella* in mammalian cells. Therefore, the aim of this study was determining the role of the *iglI*, *iglG* and genes *pdpC* *F. tularensis* subsp. *holartica* in intracellular reproduction of *A. castellanii* to explain the life cycle of the bacterium under environmental conditions. In practical work were used bacterial strain *F. tularensis* LVS, mutants *iglI*, *iglG*, *pdpC* and amoeba *A. castellanii*. Bacterial growth in amoebae were followed during 3 days. Since the number of bacteria in amoeba cells are the same as in the wild strain, it is concluded that the *iglI*, *iglG* and *pdpC* genes have no role in intracellular reproduction of *F. tularensis* subsp. *holartica* strain LVS in amoeba *A. castellanii*. We can conclude that the bacterium does not exhibit the same virulence factors in amoeba cells and mammalian cells.

**Key words:** *Francisella tularensis*, *iglI*, *iglG*, *pdpC*, reproduction, *A. castellanii*



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
<b>1.1. Povijest istraživanja roda <i>Francisella</i></b> .....	1
<b>1.2. Rod <i>Francisella</i></b> .....	1
<b>1.2.1. <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> (tip A)</b> .....	2
<b>1.2.2. <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (tip B)</b> .....	2
<b>1.2.3. <i>F. novicida</i></b> .....	3
<b>1.3. Epidemiologija</b> .....	3
<b>1.4. Tularemija u ljudi</b> .....	4
<b>1.4.1. Prevencija</b> .....	5
<b>1.5. Patogeneza i virulencija <i>Francisella</i></b> .....	6
<b>1.5.1. Čimbenici virulencije</b> .....	6
<b>1.5.2. <i>Francisella</i> patogeni otok ( FPO )</b> .....	6
<b>1.5.3. Životni ciklus <i>Francisella</i></b> .....	7
<b>1.6. <i>Acanthamoeba castellanii</i></b> .....	8
<b>1.6.1. Ameba kao model za istraživanje</b> .....	9
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1. Bakterijski soj</b> .....	11
<b>3.2. Amebe</b> .....	11
<b>3.3. Hranjive podloge</b> .....	11
<b>3.4. Priprema bakterijske suspenzije</b> .....	12
<b>3.5. Priprema <i>A. castellanii</i></b> .....	13
<b>3.6. Brojanje <i>A. castellanii</i></b> .....	13
<b>3.7. Infekcija <i>A. castellanii</i> s <i>F. tularensis</i> LVS i njezinim mutantama <i>pdpC</i>, <i>iglI</i> i <i>iglG</i></b> .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	15
<b>5. RASPRAVA</b> .....	17
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	20
<b>7. LITERATURA</b> .....	21
<b>8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA</b> .....	25

# 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

## 1.1. Povijest istraživanja roda *Francisella*

Tijekom proučavanja kuge u vjeverica 1911. g., George McCoy i Charles Chapin otkrili su bakteriju koja je izazivala „drugačiju bolest“, bolest sličnu kugi. Bakteriju su nazvali *Bacterium tularense* po okrugu Tulare, u Kaliforniji, mjestu gdje je bolest istraživana. Ubrzo nakon otkrića bakterije uočili su da ova otporna bakterija, koje ne stvara spore, može dugo opstati u okolišu i uzrokovati bolest u ljudi. Edward Francis, djelatnik Službe za javno zdravstvo, je 1919. godine istraživao slučaj osobe koja je nakon ugriza muhe *Crysops discalis* imala povećane limfne čvorove te povišenu tjelesnu temperaturu. Godine 1921. bolest je zabilježena kod mesara u Washingtonu koji je sam rekao da ima „zečju bolest“. Godine 1925. H. Ohara izolirao je isti mikroorganizam, koji je također izazivao bolest i nazvao ga yato-byo odnosno zečja groznica (engl. rabbit fever). Godine 1959. predloženo je da se uzročnik tularemije nazove *Francisella tularensis* u čast bakteriologu Edwardu Francisu najznačajnijem znanstveniku u području istraživanja tularemije (1).

## 1.2. Rod *Francisella*

*F. tularensis* je gram negativna, asporogena, aerobna, nepokretna, fakultativna unutarstanična bakterija koja je prvenstveno primarni patogen životinja. Kod ljudi i životinja *F. tularensis* uzrokuje smrtonosnu bolest tularemiju. *F. tularensis* jedna je od najinfektivnijih bakterija, udisajem 10-15 bakterija može izazvati bolest u ljudi. Zbog svoje velike virulencije *F. tularensis* subsp. *tularensis* smatra se potencijalnim biološkim oružjem (2).

*F. tularensis* ima vrlo složen taksonomski položaj. Na početku istraživanja prvobitno je bila uključena u rod *Bacterium*, kasnije u rod *Pasteurella*, a potom je privremeno smještena u rod *Brucella*. Godine 1947. podnesen je prijedlog da bakterija bude jedini član novog roda zvanog *Francisella* (3). Rod *Francisella* svrstan je u porodicu *Francisellaceae*. *F. tularensis* i *F. philomiragia* dvije su vrste koje se ubrajaju u rod *Francisella* (2).

Postoje tri podvrste *F. tularensis* koje uzrokuju bolest u ljudi: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B) i *mediasiatica*. *F. novicida*, *F. philomiragia* i *F. hispaniensis* mogu uzrokovati

tularemiju kod imunokompromitiranih ljudi. *F. noatunensis* prepoznat je kako patogen riba, nedavno otkrivene vrste prilagođene okolišu uključuju *F. piscidida*, *F. guangzhouensis*, *F. opportunistica*, *F. salina*, *F. uliginis*, *F. 37 frigiditurreis* i *F. adeliensis* (4).

### **1.2.1. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A)**

*F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) vrlo je zarazna, i općenito virulentnija podvrsta od subsp. *holarctica*, a moguće ju je pronaći isključivo u Sjevernoj Americi. Gel elektroforezom s pulsirajućim poljem utvrđen je genotip *F. tularensis* subsp. *tularensis* koji je podjeljen u dva tipa, tip A.I i tip A.II. Unutar tipa A.I definirana su tri pod tipa: A.I.3, A.I.8 i A.I.12. Vrste tipa A.I najčešće se nalaze u središnjem dijelu Amerike i u Kaliforniji, dok su vrste A.II tipa najčešće izolirane u planinskim državama Amerike i Kaliforniji. Genotipska i zemljopisna podjela koja je promatrana kod ljudi identična je i za životinjske vrste koje su povezane sa infekcijama uzrokovanih kod ljudi i održavanjem tularemije u prirodi. Utvrđene su značajne razlike između infekcija kod ljudi uzrokovanih različitim genotipovima. Schu S4 je najvirulentniji soj ove bakterije. Budući da je vrlo patogen za ljude i životinje svega 10 bakterija dovodi do infekcije, *F. tularensis* se smatra biološkim oružjem i pripada kategoriji A biološkog patogena (5).

### **1.2.2. *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B)**

*F. tularensis* subsp. *holarctica* najraširenija je podvrsta. Naziva se još i *F. tularensis* tip B. Na području sjeverne polutke moguće ju je pronaći u najvećem broju i jedina je podvrsta koja se nalazi u Europi (6). *F. tularensis* subsp. *holarctica* zbog svoje smanjene virulencije ima značajno nižu stopu smrtnosti te uglavnom uzrokuje sporadične slučajeve zaraze (7).

*F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (engl. Live Vaccine Strain) je živo atenuirano cjepivo proizvedeno iz soja *holarctica* u zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. El'bert i suradnici 1934. godine inokulirali su životinje sa slabo virulentnim sojem *Franciselle*. Nakon što su te imunizirane životinje bile izložene virulentnijim sojem iste bakterije dokazan je zaštitni učinak cjepiva. Sugeriralo se kako bi ovaj isti postupak mogao biti učinkovit ako se primjeni na ljude. U narednim godinama otkrivani su novi sojevi koji su se koristili kao cjepiva, no neki od njih su nedugo nakon toga izgubljeni. Godine 1956. iz Instituta Gemaleya u Moskvi sojevi su prebačeni u Sjedinjene Države gdje je nastavljeno istraživanje (3). LVS je razvijen 1959.

godine. Ovo cjepivo pruža učinkovitu zaštitu od respiratorne tularemije te modificira simptome ulceroglandularnog oblika bolesti. Iako je cjepivo podrijetlom iz *F. tularensis* tipa B, pruža zaštitu i od tipa A, što ukazuje da ta dva tipa dijele iste osobine koje su važne za poticanje urođenog imuniteta (8).

Uporaba cjepiva u SAD-u i njegovo licenciranje spriječeno je zbog nedostatka znanja o mehanizmima koji mogu oslabiti bakteriju i zbog mogućnosti prelaska bakterije iz njezinog ne virulentnog stanja u virulentno. Iako je LVS atenuiran kod ljudi, kod miševa izaziva bolest koja je vrlo slična ljudskoj tularemiji, pa se stoga široko koristi pri eksperimentalnom istraživanju bolesti (9).

### **1.2.3. *F. novicida***

Godine 1951. izolirana je bakterija slična *F. tularensis*. U početku je bila svrstana u rod *Pasturella*. Godine 1989. nazvana je *F. tularensis* subsp. *novicida*. Danas je na temelju fenotipskih razlika klasificirana kao zasebna vrsta roda *Francisella*. *F. novicida* nije patogena za čovjeka, ali može izazvati simptome bolesti kod imunokompromitiranih osoba. Budući nije patogena za čovjeka, često se koristi u eksperimentalnom istraživanju tularemije (10).

## **1.3. Epidemiologija**

Zbog svoje široke rasprostranjenosti *F. tularensis* može zaraziti više od stotine kralježnjaka i bez kralježnjaka. Najvažnije vrste sisavaca koji su uključeni u prijenos bakterije, te samim time i uzrokovanje infekcije kod ljudi su voluharice, miševi, vjeverice i dabrovi. Prijenos i infekcija u ljudi i drugih sisavaca može se dogoditi prilikom kontakta sa zaraženim životinjama i životinjskim proizvodima, putem kontaminirane hrane i vode, ugrizom insekta i aerosolom (11).

U prirodi *F. tularensis* također je pronađena i kod velikog broja člankonožaca uključujući komarce, muhe, krpelje, buhe i uši. Unatoč velikom broju člankonožaca koji mogu biti zaraženi s *F. tularensis* samo su krpelji, komarci, jelene muhe i konjske muhe važni vektori u prijenosu bakterije na ljude. *Aedes*, *Culex* i *Anopheles* su najznačajniji rodovi komaraca koji prenose uzročnika tularemije. Infekcije koje prenose komarci povezane su s nekim od najvećih

epidemija tularemije. Krpelji se smatraju biološki važnim vektorima, koji nisu samo sposobni ugrizom prenijeti *F. tularensis* između životinja i ljudi, već imaju sposobnost uzročnika održavati u prirodi kroz duži vremenski period. U SAD-u ugriz krpelja jedan je od dominantnih puteva prijenosa bakterije. *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* i *Amblyomma americanum* su tri najvažnije vrste krpelja koje prenose tularemiju u SAD-u (12). U srednjoj Europi krpelji *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* najvažniji su prijenosnici uzročnika tularemije (3).

*F. tularensis* u prirodi je povezana sa više domaćina nego većina ostalih zoonoza. Održavanje u prirodi prije svega je povezano s glodavcima i zečevima. Dvije podvrste *F. tularensis*, tip A i tip B povezane su s različitim životinjskim domaćinom. Tip A češće se povezuje sa zečevima, dok se tip B češće povezuje sa glodavcima. Ektoparaziti i člankonošci imaju važnu ulogu u održavanju širenja infekcije unutar populacije domaćina (12).

Domaće životinje također mogu biti izvor zaraze. Klinička slika bolesti kod životinja najčešće je nespecifična, a simptomi se češće pojavljuju kod mačaka i ovaca. Neki od simptoma koji se mogu pojaviti su pneumonija, ulceracija, dehidracija i anoreksija. U endemskim područjima psi su relativno često inficirani. Kod oboljelih domaćih životinja (ovaca i konja) povećana je pojava infestacije krpeljima koji su važan vektor u prijenosu uzročnika tularemije (13).

## **1.4. Tularemija u ljudi**

Bolest koja je ozbiljna i potencijalno opasna po život ljudi naziva se tularemija, a uzrokuje ju *F. tularensis*. Ljudi su vrlo osjetljivi na tularemiju, a osobe s povećanim rizikom od zaraze su lovci, šumski radnici, mesari, poljoprivrednici, izletnici, šetači i druge osobe s većom vjerojatnošću kontakta sa zaraženom životinjom ili tjelesnim tekućinama zaraženih životinja (14).

Bolest započinje naglo, 2-4 dana nakon infekcije. Tularemiju karakteriziraju tipični simptomi, kao što su visoka temperatura, opća slabost, zimica i povećani limfni čvorovi koji se nalaze u blizini mjesta infekcije. Uzročnik u organizam može ući kroz kožu, sluznice, pluća i gastrointestinalni trakt. Simptomi ovise o putu ulaska bakterije u organizam (15).

Tularemija ima nekoliko kliničkih oblika koji se mogu manifestirati kod ljudi uključujući ulceroglandularni oblik koji je i najčešći oblik tularemije i obično se javlja nakon ugriza krpelja ili jelene muhe. Na mjestu gdje je *F. tularensis* ušla u organizam pojavljuje se čir na koži, a na mjestu infekcije dolazi do povećanja limfnih žlijezda. Glandularni oblik sličan je ulceroglandularnom obliku tularemije, ali bez pojave čira. Također, uobičajeno se prenosi ugrizom krpelja i muha ili u doticaju s bolesnom ili mrtvom životinjom. Okuloglandularni oblik nastaje kada bakterija uđe u organizam kroz oko. Simptomi su bol, crvenilo, oticanje i iscjedak iz oka. Tifoidni oblik karakteriziraju nespecifičan ulazak bakterije u organizam, bez naznake na mjesto infekcije ili lokaliziranih simptoma, a neki od simptoma mogu biti visoka temperatura, gastrointestinalne smetnje, vrućica, zimica. Orofaringealni oblik nastaje konzumacijom kontaminirane hrane ili vode. Simptomi su povraćanje, proljev, grlobolja, oticanje žlijezda na vratu. Pneumonija je najozbiljniji oblik tularemije. Simptomi su kašalj, bol u prsima i otežano disanje, iznenadna vrućica, oticanje limfnih čvorova u plućima. Bakterije se iz pluća dalje mogu širiti prema jetri i slezeni. Ovaj oblik nastaje kao posljedica udisanja prašine ili aerosola koji sadrži bakteriju *F. tularensis* (16). Ozbiljnost bolesti ovisi o soju, odnosno podvrstama bakterije (15).

#### **1.4.1. Prevencija**

Ne postoji način da se u potpunosti spriječi infekcija i nastanak bolesti, ali rizik od infekcije može se umanjiti koristeći sredstva protiv insekata, izbjegavanjem uboda insekata noseći duge hlače i duge rukave kako bi se prekrili vidljivi dijelovi kože, nadalje, potrebno je izbjegavati piti neobrađenu površinsku vodu koja može biti kontaminirana i ne jesti nedovoljno termički obrađeno meso divljači (17).

Najčešći put ulaska bakterije i pojava laboratorijske infekcije primijećena je prilikom ulaska *F. tularensis* kroz konjunktive. Ovakav ulazak bakterije objašnjava visoku stopu infekcije koja je opažena kod laboratorijskog osoblja koji radi ili je u doticaju s *F. tularensis*. Pri radu s virulentnijim sojevima bakterije, obavezno je nositi naočale i masku za lice kao zaštitnu opremu. Zbog svoje visoke virulencije i mogućnosti prijenosa aerosolom, istraživački i dijagnostički rad sa *F. tularensis* mora se provoditi u laboratoriju s oznakom BSL-3, stupanj biološke zaštite 3 ( engl. *Biosafety Level 3* ) (18).

Budući da trenutno nije dostupno učinkovito i dovoljno sigurno cjepivo, profilaksa tularemije nakon dokazane izloženosti oslanja se na upotrebu antibiotika. Antibiotičko liječenje tularemije temelji se na uporabi nekoliko lijekova uključujući fluorokinolone, tetracikline i aminoglikozide. Pacijenti koji imaju teški oblik tularemije i koji zahtijevaju hospitalizaciju preporuča se da prime parenteralno streptomycin ili gentamicin. Oba aminoglikozida pokazuju *in vitro* baktericidno djelovanje protiv *F. tularensis* tipa A i tipa B. Nove terapijske alternative i lijekovi potrebni su zbog potencijalne toksičnosti, koja je utvrđena kod djece i trudnica, te zbog visoke stope neuspjeha u liječenju, posebno kod težih oblika bolesti (19).

## **1.5. Patogeneza i virulencija *Francisella***

### **1.5.1. Čimbenici virulencije**

Glavni faktori virulencije *F. tularensis* su lipopolisaharid (LPS ili endotoksin) i kapsula. Kapsula obično štiti bakterije od lize, fagocitoze i imunološkog prepoznavanja. LPS kod francisele je specifičan i ne daje dovoljnu protektivnu zaštitu. *F. tularensis* ima sposobnost da spriječi potencijalni zaštitnički upalni odgovor domaćina sve do kasne faze infekcije kada je količina bakterija u organizmu visoka (14).

Pili tipa IV također su važni faktor virulencije, nalaze se na površini bakterije i služe za adheziju bakterije na površinu stanice. Istraživanja pokazuju da samo pojedini pod sojevi *Francisella* sadrže pile, te da postoji niz varijanti u genima pila tipa IV koji su specifični za pojedinu vrstu (20).

### **1.5.2. *Francisella* patogeni otok ( FPO )**

Geni koji se nalaze unutar FPO (engl. *Francisella pathogenicity island*, FPI) pokazali su važnu ulogu u unutar staničnom preživljavanju i razmnožavanju *Francisella*. FPO sastoji se od 19 gena koji su kod većine sojeva *F. tularensis* pronađena u dvije kopije, a sastoje se od *iglABCD* operona i *pdpABD* gena (21).

FPO se sastoji od nekoliko važnih virulentnih gena uključujući *iglA-D* koji su odgovorni za intracelularni rast *Francisella* unutar makrofaga, *iglG* koji je važan faktor

virulencije, *iglI* i *pdpA* koji su važni bakteriji za unutar staničnu aktivnost i replikaciju (22). Jedan od gena koji se također nalazi u FPO kodira IglC protein. IglC je jedan od najreguliranih proteina tijekom rasta u makrofazima. IglC protein potreban je i za izlazak bakterije iz fagosoma (23). IglG protein potreban je za bijeg *Francisella* u citosol domaćina, što omogućava bakteriji da se replicira u citosolu i da izazove urođene imunološke reakcije (24).

*Francisella* može koristiti nekoliko receptora za ulazak u makrofage, uključujući receptor komplementa 3 (CR3). Međutim *F. tularensis* bježi iz fagosoma makrofaga, odlazi u citosol i tamo se replicira. Bijeg iz fagosoma omogućen je uz pomoću nekoliko bakterijskih gena koji se nalaze u FPO. 19 gena koji se nalaze u FPO većinom su neophodni za rast *Francisella* u makrofazima kao i za njezinu virulenciju. *PdpC* mutante stvorene iz *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, u dosadašnjim istraživanjima pokazali su se kao proteini koji pomažu pri replikaciji *Francisella* u makrofazima (25).

### 1.5.3. Životni ciklus *Francisella*

Ključni dio životnog ciklusa *Francisella* je vezanje i ulazak u stanicu domaćina gdje se može replicirati i preživjeti. *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *holarctica* te *F. novicida* kao i ostali sojevi *Francisella* imaju sposobnost da uđu, prežive i razmnože se u različitim tipovima stanica kao što su makrofazi, dendritičke stanice, hepatociti, neutrofili, endotelne i epitelne stanice. Strategija za preživljavanje i širenje bakterije oslanja se na fizički bijeg iz fagosoma i replikacija u citosolu stanice domaćina što ovu bakteriju čini tipičnim patogenom koji živi u citosolu (26).

Nakon umnažanja unutar makrofaga, *F. tularensis* izaziva staničnu smrt, apoptozu. Apoptoza omogućava oslobađanje bakterije iz stanice, te omogućava infekciju zdravih stanica (3).

Većina unutarstaničnih patogena pa tako i *Francisella* pokreće svoj unutar stanični ciklus unutar zatvorenog fagosoma. Novo formirani fagosomi obično prolaze kroz proces sazrijevanja te tako mijenjaju svoj sastav. Da bi preživjela u zreлом fagosomu *Francisella* mora ili pobjeći ili izdržati okruženje u kojem se nalazi. Među mikrobicidnim agensima s kojim se susreće *Francisella* u fagosomu su ROS (engl. Reactive oxygen species) koji generiraju kompleks NADPH oksidaza koja se nalazi na membrani fagosoma. *Francisella* izbjegava ovaj mehanizam ranog ubijanja blokirajući aktivaciju NADPH oksidaze na novo formiranom



fagosomu koji sadrži *Francisellu*, FCP-u (engl. *Francisella* containing phagosome) u ljudskim neutrofilima kao i u makrofazima. *F. tularensis* LVS smanjuje proizvodnju ROS, zadržavanjem ne funkcionalnog kompleksa NADPH oksidaze na membrani fagosoma. Kisela fosfataza AcpA iz atenuiranog soja *F. tularensis* tipa A (ATCC6223) inhibira oksidativni nalet aktiviranih neutrofila. Gubitak funkcije AcpA dovodi do proizvodnje ROS-a i narušava unutar stanično preživljavanje bakterije. Osim ovih navedenih, *Francisella* primjenjuje i ostale višestruke strategije, gene i enzime koji joj služe za preživljavanje unutar stanice i bijeg iz fagosoma (27).

*F. tularensis* također blokira respiratorni prasak u neutrofilima, suzbija i odgađa upalnu proizvodnju citokina. Većina onoga što se zna o imunološkom odgovoru domaćina na *F. tularensis* proizašlo je iz studija na miševima inficiranim intradermalno ili intraperitonealno s *F. tularensis* LVS. Imunološki odgovor na infekciju *F. tularensis* uključuje aktiviranje IFN- $\gamma$ - (Interferon gamma) i TNF (engl. Tumor necrosis factor) posredovanih makrofaga i neutrofila koji su važni za kontrolu početne infekcije, te CD4+ i CD8+ T stanice koje su potrebne da se infekcija u potpunosti spriječi i da se proizvede dugoročni zaštitni imunitet. Toll-receptori (TLR) su proteini koji imaju veliku ulogu pri aktivaciji urođenog imunološkog odgovora pri ulasku *Francisella* u organizam domaćina tako što organizam domaćina prepoznaje određene dijelove koje se nalaze na površini *Francisella*. Mehanizmi kojima *F. tularensis* izmiče urođenom imunološkom odgovoru domaćina i brzo se razmnožava i širi na druge organe kako bi se uspostavila sistemska infekcija do sada nisu poznati (28).

## 1.6. *Acanthamoeba castellanii*

*Acanthamoeba castellanii* su slobodno živuće amebe koje u svom životnom ciklusu postoje u dvije faze. Prva faza je faza ciste koja se javlja u nepovoljnim životnim uvjetima i predstavlja otpornosti amebe prema vanjskim utjecajima, te druga faza, trofozoit odnosno faza repliciranja amebe. *A. castellanii* moguće je pronaći u različitim okruženjima kao što su tlo, morska i slatka voda, bazeni, kontaktne leće, klimatizacijski sustavi i životinjsko tkivo. *A. castellanii* može dovesti do keratitisa, pogotovo korisnika kontaktnih leća, može izazvati amebni encefalitis i kožne lezije kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom (29).

Zbog svoje velike rasprostranjenosti *A. castellanii* mogući je i važan rezervoar *Francisella* u okolišu. *Francisella* može inficirati i razmnožavati se unutar slobodno živućih ameba, te kada dođe do ruptуре amebe, oslobađa se veliki broj *Francisella*. Unutarstanični život

u amebama omogućava *Francisella* preživljavanje u nepovoljnim uvjetima, te povećanu ukupnu stopu rasta, što sugerira da bakterija ima korist od povezanosti s amebama.

### **1.6.1. Ameba kao model za istraživanje**

Razne amebe koje se mogu pronaći u tlu uključujući *Dictyostelium*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella* i *Naegleria* mogu biti inficirane unutarstaničnim bakterijama. Bakterije rezistentne na amebe nazivaju se one koje mogu izbjeći obranu amebe. U amebama rezistentne bakterije mogu preživjeti, razmnožavati se i zaštititi se u nepovoljnim situacijama, posebno kada ameba kao domaćin formira čvrstu cistu s bakterijama koje se nalaze unutra. Ulazak bakterije u amebe je jednostavan. Amebe fagocitiraju bakterije, u fagosomu bakterije prije nego što bivaju ubijene suočavaju se sa zakiseljavanjem fagosoma, oksidativnim stresom i uskraćivanjem hranjivih tvari. Neke bakterije imaju razvijene strategije za preživljavanje fagocitoze. Jedna od najboljih strategija za preživljavanje je bijeg iz fagosoma ili vakuole u citosol amebe. Bakterije poput *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium marinum* i *Mycobacterium tuberculosis* razvile su tu sposobnost preživljavanja (30).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada bio je utvrdi ulogu gena *iglI*, *iglG* i *pdpC* *F. tularensis* subsp. *holarctica* u unutarstaničnom razmnožavanju *A. castellanii*.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Bakterijski soj

U eksperimentalnom radu korišten je bakterijski soj *Francisella tularensis* LVS te 3 soja mutanti kojima su deletirani geni *iglI*, *iglG* i *pdpC*. *F. tularensis* i njezine mutante uzgajane su na GC mediju 3 dana na temperaturi od 37 °C i u atmosferi s 3% CO<sub>2</sub>.

### 3.2. Amebe

U eksperimentalnom radu korištena je ameba *Acanthamoeba castellanii*. *A. castellanii* uzgajana je u ATCC (engl. American Type Culture Collection) 30234 mediju s glukozom na temperaturi od 25 °C. Zbog potrošnje hranjivih tvari iz medija potrebno je svaka 3 dana zamijeniti medij te dodati novi.

### 3.3. Hranjive podloge

#### Sastav GC hranjive podloge

##### Medij za agar

- Otopina A - 36 g GC agar base (BD 228950)
  - -500 ml deionizirane vode
- Otopina B - 10 g sušeni goveđi hemoglobin (BD 212392)
  - -500 ml deionizirane vode
- 10,00 ml IsoVitaleX (BD 211876)

Otopine A i B autoklaviraju se odvojeno na 121 °C. Otopine je zatim potrebno ohladiti na 50 °C. Otopina B se aseptično dodaje u otopinu A. Otopine je potrebno dobro promiješati. U otopinu je zatim potrebno dodati IsoVitaleX.

##### Hranjivi bujon

- Otopina A - 15 g proteinski pepton #3
  - -1,0 g kukuruzni škrob

- 4,0 g dikalij-fosfat
- 1,0 g monokalijev fosfat
- 5,0 g natrijev klorid
- 500 ml deionizirane vode

pH otopine a mora biti 7,2 +/- 0,2

- Otopina B -10 g sušeni goveđi hemoglobin (BD 212392)
- -500 ml deionizirane vode
- 10 ml IsoVitaleX (BD 211876)

Otopine A i B autoklaviraju se odvojeno na 121 °C. Otopine je zatim potrebno ohladiti na 50 °C. Otopina B dodaje se aseptično u otopinu A. Otopine je potrebno dobro promiješati. Otopine je zatim potrebno obogatiti s IsoVitaleX (BD 211876).

#### **Sastav ATCC 30234 medija ( 1L )**

- 20 g proteinski pepton
- 1 g ekstrakt kvasca
- 20 g agar
- 8 ml CaCl<sub>2</sub> ( 0,05 M )
- 10 ml MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O ( 0,4 M )
- 10 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O ( 0,25 M )
- 10 ml KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ( 0,25 M )
- 1,0 g Na citrat x 2 H<sub>2</sub>O
- 10 ml Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O ( 0,005 M )

pH otopine treba biti 6,5. Otopina se autoklavira na temperaturi od 121 °C. U autoklaviranu otopinu aseptično se dodaje 50 ml filtrirane 2M glukoze.

### **3.4. Priprema bakterijske suspenzije**

Pomoću sterilnog brisnog štapića s hranjive podloge uzete su kolonije bakterije *F. tularensis* LVS te njezine mutante *iglI*, *iglG* i *pdpC*. Svaka je posebno dodana u 3 mL sterilne vode iz špine.

Pomoću spektrofotometra određena je optička gustoća pripremljene bakterijske suspenzije. Ona nam govori koliko bakterija imamo u uzorku. Optička gustoća može biti od 0-2 i ona predstavlja odnos intenziteta između upadnog zračenja i propuštenog zračenja kroz uzorak. Što je suspenzija gušća, što ima više bakterija u uzorku to će optička gustoća biti veća.

Za spektrofotometrijsko određivanje gustoće potrebna nam je kiveta u koju je stavljeno 500  $\mu$ L pripremljene bakterijske suspenzije te slijepa proba u kojoj se ne nalazi uzorak već samo voda iz špine. Optička gustoća slijepa probe je 0 jer slijepa proba propušta najviše svjetlosti. Optička gustoća ispitivanog uzorka je 1 što znači da imamo u uzorku  $10^9$  CFU/mL, što je utvrđeno prethodnim istraživanjima.

### **3.5. Priprema *A. castellanii***

Iz bočice za uzgoj staničnih kultura u kojoj se nalaze *A. castellanii* potrebno je ukloniti ATCC 30234 medij u kojem je *A. castellanii* uzgajana. *A. castellanii* je zatim dobro isprana sa stijenki bočice za uzgoj staničnih kultura te joj je dodan novi ATCC 30234 medij bez glukoze. Glukoza u ovom koraku nije potrebna pošto je cilj da bakterija *Francisella tularensis* LVS, i njezine mutante *pdpC*, *iglI*, *iglG* uđu u stanicu. U mikrotitar pločice s 24 mjesta stavlja se po 1 ml *A. castellanii* koje moraju adherirati za dno mikrotitar pločica.

### **3.6. Brojanje *A. castellanii***

Za određivanje broja *A. castellanii* koristi se Neubauer-ova komorica. Neubauer-ova komorica je debela staklena ploča debljine (30x70x4mm). Područje za brojanje sastoji se od 9 kvadrata, svaki s površinom od 1mm<sup>2</sup>. Veliki središnji kvadrat podijeljen je na 25 manjih kvadratića s dvostrukim ili trostrukim linijama. Svaki od tih 25 kvadrata podijeljen je u 16 manjih kvadratića tako da svaki ima površinu 1/400 mm<sup>2</sup>. Pokrovno stakalce širine 22 mm postavlja se na vrh Neubauer-ove komorice, pokrivajući njezin središnji dio. Područje na kojem je Neubauer-ova komorica presječena je 0,1 mm niža od ostatka komore, tako da je razmak između pokrovnog stakalca i komore 0,1 mm. Brojanje ameba vrši se u 4 kutna kvadrata koja su podijeljena u 16 ( 4x4) manjih kvadratića (31).

Neubauer-ova komorica čuva se u 3% vodikovom peroksidu radi dezinfekcije. Pokrovno stakalce se pomoću destilirane vode zalijepi na Neubauer-ovu komoricu tako da prekriva središnje područje za brojanje. Pomoću pipete u Neubauer-ovu komoricu doda se 10  $\mu\text{L}$  suspenzije ameba. Uzima se aritmetička sredina prebrojanih ameba u 4x4 kvadratića te se množi s faktorom Neubauerove komorice koji iznosi  $10^4$  (31). Dobivena vrijednost nam govori koliko stanica imamo po mililitru uzorka. Za infekciju je potrebno ukupno  $10^5$  stanica/mL.

### **3.7. Infekcija *A. castellanii* s *F. tularensis* LVS i njezinim mutantama *pdpC*, *iglI* i *iglG***

U mikrotitar pločice s 24 mjesta u kojima se nalazi  $1 \times 10^5$  stanica/mL *A. castellanii* u ATCC 30324 mediju bez glukoze dodano je 10  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija. MOI (engl. multiplicity of infection) mora biti 100, što znači da je na jednu stanicu ameba dodano 100 bakterija.

24 sata nakon infekcije dodan je 1% saponin koji razara staničnu membranu amebe kako bi smo mogli izolirati samo bakterije koje su se razmnožile unutar amebe. Saponin je prije upotrebe potrebno filtrirati da bi dobili sterilnu otopinu. Iz mikrotitar pločice s 24 mjesta supernatant smo otklonili, a na stanice je dodano 200  $\mu\text{L}$  saponina. Važno je dobro promućkati i sastrugati amebe koje su adherirale na dno mikrotitar pločice. Deseterostruka razrjeđenja pripremljena su u mikrotitar pločicama s 96 jažica. U prvi red jažica odpipetirano je 200  $\mu\text{L}$  suspenzije bakterija svakog uzorka. U preostalim 7 donjih jažica odpipetirano je 180  $\mu\text{L}$  fiziološke otopine, a zatim su pomoću multikanalne pipete pripremljena deseterostruka razrjeđenja. Iz osnovnog razrjeđenja pripremljena su sva ostala prijenosom po 20  $\mu\text{L}$  suspenzije u drugi red, ali je vrlo važno prije prijenosa dobro resuspendirati otopinu. Iz svakog razrjeđenja se zatim nanosi po 10  $\mu\text{L}$  na GC agar. Inkubacija traje 24 sata na temperaturi od 37 °C i atmosferi s 3%  $\text{CO}_2$ . Isti postupak ponovljen je 48 i 72 sata nakon infekcije.

## 4. REZULTATI

*A. castellanii* inficirane su s *F. tularensis* LVS i njezinim mutantama *iglI*, *iglG* i *pdpC*. Broj unutar staničnih bakterija praćen je 24, 48 i 72 sata nakon infekcije. Bakterije su rasle na GC mediju na temperaturi od 37 °C i atmosferi s 3% CO<sub>2</sub>.

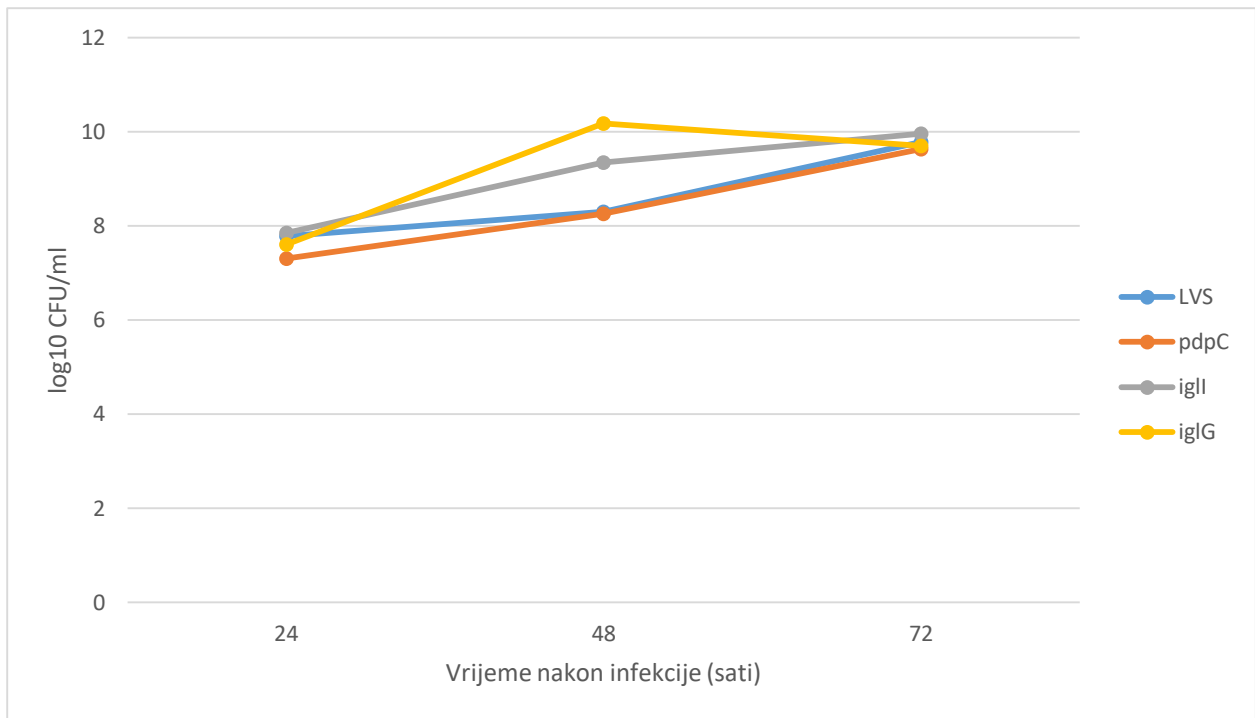
U periodu od 24 sata nakon infekcije broj bakterija *F. tularensis* LVS iznosi  $6 \times 10^7$  CFU/mL, dok broj njezine mutante *pdpC*  $2 \times 10^7$  CFU/mL, *iglI*  $7 \times 10^7$  CFU/mL, *iglG*  $4 \times 10^7$  CFU/mL.

Nadalje, u periodu od 48 dolazi do postepenog porasta broja bakterija *F. tularensis* LVS te tako njezin broj iznosi otprilike  $2 \times 10^8$  CFU/mL, a broj njezinih mutanti također se povećao i iznosi: *pdpC*  $1,8 \times 10^8$  CFU/mL, *iglI*  $2,2 \times 10^9$  CFU/mL, *iglG*  $1,5 \times 10^{10}$  CFU/mL.

Nakon 72 sata od infekcije broj bakterija *F. tularensis* LVS i dalje raste te iznosi  $6 \times 10^9$  CFU/mL, također raste i broj *pdpC* mutante te broj bakterija iznosi  $4,2 \times 10^9$  CFU/mL, nadalje kod mutante *iglI* broj bakterija ostaje poprilično jednak te on iznosi  $9 \times 10^9$  CFU/mL, broj mutanta *iglG* lagano opada za razliku od prethodnog dana, ali je broj bakterija veći nego 24 sata nakon infekcije te njezin broj iznosi  $5 \times 10^9$  CFU/mL.

Možemo zaključiti da geni *iglG*, *pdpC* i *iglI* nemaju ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS u amebi *A. castellanii* s obzirom da je broj bakterija u stanicama amebe isti kao i kod divljeg soja.





**Slika 1. Kinetika rasta *F. tularensis* LVS i njezinih mutanti *pdpC*, *igII*, *igIG* u *A. castellanii*.** Stanice *A. castellanii* ( $3,2 \times 10^5$ ) inficirane su bakterijama, svakih 24 sata tretirane saponinom da bi odredili broj samo unutarstaničnih bakterija. Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C i atmosferi s 3% CO<sub>2</sub> na GC mediju uspoređen je broj bakterija (CFU) u naznačenom vremenskom periodu.

## 5. RASPRAVA

Tijekom posljednjih desetljeća značajni istraživački naponi usmjereni su na istraživanje i razumijevanje molekularnih i genetskih značajki koje su odgovorne za patogenezu tularemije.

*F.tularensis* LVS je bakterija, koja je atenuirana kod čovjeka, ali kod miševa može izazivati znakove tularemije (9). S obzirom da je ovaj soj atenuiran kod ljudi koristi se u eksperimentalnom istraživanju u razvoju cjepiva. Općenito, *F. tularensis* subsp. *holarctica* je jedina podvrsta u Europi, ima smanjenu virulencije i značajno nižu stopu smrtnosti, te uglavnom uzrokuje sporadične slučajeve zaraze (7). Tularemija je bolest blisko povezana s razmnožavanjem bakterija unutar makrofaga domaćina, iako najčešće inficira makrofage, bakterija ima sposobnost razmnožavanja i u drugim stanicama poput hepatocita, epitelnih i endotelih stanice. Za razmnožavanje bakterije unutar makrofaga, unutarstaničnu replikaciju, izbjegavanje imunoloških odgovora domaćina i virulenciju potrebna je ekspresija *Francisella* otoka patogenosti (FPO), za koje se vjeruje da kodiraju sekrecijski sustav tipa VI (T6SS). Iako se još uvijek nisu otkrile točne funkcije mnogih komponenti, otkriveno je da neke doprinose sposobnosti da *Francisella* izazove sistemsku infekciju kod miševa, kao i da spriječi fagolizosomsku fuziju i olakša bijeg u citosol domaćina (32).

Do sada postoji vrlo malo podataka koja govore o razmnožavanju *iglI*, *iglG* i *pdpC* mutanti, stoga se u ovom radu proučavao rast spomenutih mutanti u amebama *A. castellanii*.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da *iglG* i *iglI* mutante, iako su se efikasno razmnožavale u stanicama J774A.1, obje su pokazale usporen bijeg iz fagosoma, odgođenu aktivaciju upala i smanjenu citopatogenost kao i značajnu oslabiljenost u mišjem modelu. Autori navode da *iglG* i *iglI* igraju ključnu ulogu u promjeni unutarstaničnog odgovora domaćina i odgovorni su za virulenciju *F. tularensis*. Visoko virulentna bakterija *F. tularensis* sposobna je za intracelularni rast unutar citosola stanica, čemu predhodi njegov početni bijeg iz fagosoma. (32).

Nadalje, neka istraživanja pokazuju da se mutante *iglG* učinkovito repliciraju u staničnoj liniji makrofaga J774 i u primarnim makrofazima. U tom istom istraživanju primijećeno je da se *iglI* i *iglG* mutante razmnožavaju vrlo učinkovito u makrofazima J774, štoviše, i nešto bolje nego LVS. Značajan rast LVS i *iglG* zabilježen je kod BMDM (engl. Bone marrow-derived macrophage), mutanta *iglI* brzo se replicirala u makrofazima J774, ali nije u

BMDM stanicama (34). Istraživanja također navode da je *iglI* gen potreban za bijeg iz fagosoma i naknadnu replikaciju u citosolu i indukciju oslobađanja IL1- $\beta$ -ovisnog o upalama i virulenciju kod miševa. Smatra se da je primarna funkcija *iglI* destabilizacija / razgradnja membrane fagosoma (23).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da sojevi kojima nedostaju *pdpC* geni nisu u mogućnosti pobjeći iz fagosoma, aktivirati AIM2 upale ili uzrokovati bolest kod miševa. Bijeg iz fagosoma u potpunosti ovisi o *pdpC* genu koji je neophodan za sastavljanje i dinamiku T6SS, te ti proteini funkcioniraju kao efektori koji su neophodni za bijeg iz fagosoma. Štoviše, *F. tularensis* i *F. holarctica* kojima nedostaje *pdpC* gen nisu u mogućnosti pobjeći iz fagosoma, inducirati citotoksičnost i umnožavati se unutar stanice. Sojevi *iglG* i *iglI* nisu uspjeli pobjeći u citosol zaraženih makrofaga, te prema tome nisu uspjeli aktivirati citosolnu urođenu imunološku signalizaciju (35).

Cilj ovog rada bio je utvrditi ulogu gena *iglI*, *pdpC* i *iglG* *F. tularensis* subsp. *holarctica* u unutarstaničnom razmnožavanju unutar *A. castellanii*.

Epidemiologija tularemije u nekim dijelovima svijeta povezana je s prijenosom bolesti putem vode, komaraca ali i ameba koje su potencijalni rezervoar *Francisella* u vodenom okolišu. Virulentni sojevi *F. tularensis* preživljavaju tjednima unutar *A. castellanii*. Životni stil *F. novicida* vrlo je različit u stanicama amebe u odnosu na stanice sisavaca, gdje je citoplazmatski položaj bakterija presudan korak u produktivnoj unutarstaničnoj replikaciji (36).

Dobiveni rezultati ovoga istraživanja pokazali su da je broj svih bakterija rastao kroz 3 dana. 24 sata nakon infekcije broj bakterija svih mutanti uspoređujući s LVS-om je podjednak. Veće odstupanje vidi se tek 48 sati nakon infekcije gdje je broj bakterija *iglG* i *iglI* nešto veći u odnosu na LVS i *pdpC*.

Rezultati našega istraživanja pokazali su da 72 sata nakon infekcije broj svih bakterija raste, iznimka je jedino *iglG* mutana čiji broj naglo pada, ali uspoređujući s ostalim mutantama i LVS-om, broj bakterija nije pao ispod prosjeka ostalih bakterija. *PdpC* mutanta za koju neka istraživanja govore da doprinosi ali nije ključno bitna za bijeg iz fagosoma i replikaciju u citosolu (33), rezultati našeg istraživanja pokazuju da ima najmanju stopu rasta od svih navedenih mutanti. Uspoređujući je s LVS, *pdpC* mutanta ima nešto nižu stopu rasta kroz cijeli period od 72 sata. Usporedbom preživljavanja *F. tularensis* LVS i njezinih mutanti unutar *A. castellanii* može se reći da nema značajno većeg odstupanja u broju bakterija. Uspoređujući istraživanja provedena na stanicama makrofaga i *A. castellanii*, može se vidjeti da većina gena

uključujući *iglG*, *iglI* i *pdpC* gene u stanicama makrofaga imaju ključnu ulogu u bijegu bakterije iz fagosoma te replikaciji u citoplazmi, dok navedeni geni nemaju utjecaja na preživljavanje i razmnožavanje *Franciselle* u ameba.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata eksperimentalnog istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- Ne postoji razlike u unutarstaničnom preživljavanju mutante *iglI*, *iglG* i *pdpC* unutar amebe *A. castellanii* u odnosu na divlji soj LVS,
- Geni *iglI*, *iglG* i *pdpC* nemaju ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju bakterije *F. tularensis* subsp. *holarctica* soj LVS u amebi *A. castellani*, što je različito od stanica sisavaca.

## 7. LITERATURA

1. Mannikkö N. Etymologia: *Francisella tularensis*. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(5):799. doi: 10.3201/eid1705.ET1705
2. Whitehouse C.A., Kesterson K.E., Duncan D.D., Eshoo M.W., and Wolcott M. Identification and characterization of *Francisella* species from natural warm springs in Utah, USA. *Letters in Applied Microbiology*. 2012; 54,313-324. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03214.x
3. Ellis J., Oyston P.C.F., Green M., and Titball R.W. Tularemia. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15.4.631-646. doi: 10.1128/CMR.15.4.631-646.2002
4. Thelaus J., Lundmark E., Lindgren P., Sjödin A. and Forsman M. *Galleria mellonella* Reveals Niche Differences Between Highly Pathogenic and Closely Related Strains of *Francisella* spp. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:188. doi: 10.3389/fcimb.2018.00188
5. Kugeler KJ., Mead PS., Janusz AM., Staples JE., Kubota KA., Calcraft LG., Petersen JM. Molecular Epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009 Apr 1; 48(7): 863-70. doi: 10.1086/597261
6. Gyuranecz M., Birdsell D.N., Splettstoesser W., Seibold E., Beckstorm-Sternberg S.M., Makrai L. and other authors. Phylogeography of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, Europe. *Emerg Infect Dis*. 2012 Feb; 18(2): 290-293. doi: 10.3201/eid1802.111305
7. Wittwer M., Altpeter E., Pilo P., Gygli S.M., Beuret C., Foucault F. and others authors. Population Genomics of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* and its Implication on the Eco-Epidemiology of tularemia in Switzerland. *Front cell Infect Microbiol*. 2018; 8:89. doi: 10.3389/fcimb.2018.00089
8. Tarnvik A. (1998). *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition), str. 956-957. (pristupljeno 28.02.2020) Dostupno na: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/tularemia-vaccine>
9. Abplanalp A.L., Morris I.R., Parida B.K., Teale J.M. and Berton M.T. TLR- Dependent Control of *Francisella tularensis* Infection and Host Inflammatory Responses. *PLoS One*. 2009; 4(11):e7920. doi: 10.1371/journal.pone.0007920
10. Kingry L.C. and Petersen J.M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014; 4:35. doi:10.3389/fcimb.2014.00035

11. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.A.H. Francisella Tularensis: Taxonomy, Genetics, and Immunopathogenesis of a Potential agent of Biowarfare. *Annu Rev Microbiol.* 2006; 60:167-185. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142126
12. Petersen J.M., P.S., & Schrefer M.E. Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res* 2009 Mar-Apr; 40(2):07. doi: 10.1051/vetries:20008045
13. <http://www.veterinarstvo.hr/default.aspx?id=2368> (pristupljeno 04.03.2020)
14. Kinkead L.C., and Allen L.A.H. Multifaceted effects of Francisella tularensis on human neutrophil function and lifespan. *Immunol Rev.* 2016; 273(1):266-281. doi: 10.1111/imr.12445
15. Colquhoun D.J., Larsson P., Duodu S., Forsman M. (2013). The prokaryotes Gammaproteobacteria (pp 287-314) (pristupljeno 04.03.2020.). Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/285202046\\_The\\_Family\\_Francisellaceae](https://www.researchgate.net/publication/285202046_The_Family_Francisellaceae)
16. <https://www.cdc.gov/tularemia/signssymptoms/index.html> (pristupljeno 04.03.2020.)
17. <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/17775-tularemia/prevention> (pristupljeno 04.03.2020.)
18. Collins F.M. *Medical Microbiology*. 4th edition, Chapter 29 Pasteurella, Yersinia and Francisella. (pristupljeno 07.03.2020.). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7798/>
19. Boisset S., Caspar Y., Sutera V., and Mauirin M. New therapeutic approaches for treatment of tularemia: a review. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4:40. doi:10.3389/fcimb.2014.00040
20. Rowe H.M. and Huntley J.F. From the Outside-In: The Francisella tularensis Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015; 5:94. doi: 10.3389/fcimb.2015.00094
21. Brezovec M., Iljazović A., Zaharija Z., Ožanić M., Šantić M. iglD ima važnu ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju F. tularensis u A. castellanii. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis Vol. 46 No.1, 2010*
22. <https://www.medt.com.es/biocatalysis/enzymatic-pathways-of-intracellular-survival-replication-and-phagosomal-escape-of-francisella-spp-a-review.php?aid=6988> (pristupljeno 14.03.2020.)
23. Barker J.R., Chong A., Wehrly T.D., Yu J.J. Rodriguez S.A., Liu J. and other authors. The Francisella tularensis Pathogenicity Island Encodes a Secretion System that is required for Phagosome Escape and Virulence. *Mol Microbiol.* 2009; 74(6):1459-1470.
24. Rigard M., Bröms J.E., Mosnier A., Hologene M., Martin A., Lindgren L., and other authors. Francisella tularensis IglG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS

- Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. *PLoS Pathog.* 2016; 12(9):e1005820. doi: 10.1371/journal.ppat.1005821
25. Uda A., Sekizuka T., Tanabayashi K., Fujita O., Kuroda M., Hotta A., and other authors. Role of Pathogenicity Determinant Protein C (pdpC) in Determining the Virulence of the *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU. *PLoS One.* 2014; 9(2):e89075. doi: 10.1371/journal.pone.0089075
  26. Celli J., and Zahrt T.C. Mechanisms of *Francisella tularensis* Intracellular Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(4):a010314. doi: 10.1101/cshperspect.a010314
  27. Chong A. and Celli J. (2010). The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. Dostupno na: [https://www.researchgate.net/publication/51233222\\_The\\_Francisella\\_Intracellular\\_Life\\_Cycle\\_Toward\\_Molecular\\_Mechanisms\\_of\\_Intracellular\\_Survival\\_and\\_Proliferation](https://www.researchgate.net/publication/51233222_The_Francisella_Intracellular_Life_Cycle_Toward_Molecular_Mechanisms_of_Intracellular_Survival_and_Proliferation) (pristupljeno 14.03.2020.)
  28. Abplanalp A.L., Morris I.R., Parida B.K., Teale J.M., Berton M.T. TLR-Dependent Control of *Francisella tularensis* Infection and Host Inflammatory Responses. *PLoS One.* 2009; 4(11):e7920. doi:10.1371/journal.pone.0007920
  29. <https://en.vircell.com/diseases/21-acanthamoeba-castellanii/> (pristupljeno 16.03.2020)
  30. Strassmann J.E., and Shu L. Ancient bacteria-amoeba relationships and pathogenic animal bacteria. *PloS Biol.* 2017 May; 15(5): e2002460. doi: 10.1371/journal.pbio.2002460
  31. <https://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/> (pristupljeno 26.02.2020.)
  32. Bröms E.J., Lavander M., Meyer L. and Sjöstedt A. (2011). IgG and IgII of the *Francisella* Pathogenicity Island Are Important Virulence Determinants of *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun.* 2011 sept; 79(9):3683-3696. doi: 10.1128/IAI.01344-10
  33. Long E.M., Lindemann R.S., Rasmussen A.J., Jones D.B., Allen H.L.A. (2013). Disruption of *Francisella tularensis* Schu S4 *iglI*, *iglJ*, and *pdpC* Genes Results in Attenuation for Growth in Human Macrophages and In Vivo Virulence in Mice and Reveals a Unique Phenotype for *pdpC*. *Infect Immun.* 2013 Mar; 81(3): 850-861. doi: 10.1128/IAI.00822-12
  34. Meyer L., Bröms E.J., Liu X., Rottenberg E.M., and Sjöstedt A (2015). Microinjection of *Francisella tularensis* and *Listeria monocytogenes* Reveals the Importance of



Bacterial and Host Factors for Successful Replication. *Infect Immun.* 2015 Aug; 83(8): 3233–3242. doi: 10.1128/IAI.00416-15

35. Brodmann M., Dreier F.R., Broz P., and Basler M. (2017). *Francisella* requires dynamic type VI secretion system and ClpB to deliver effectors for phagosomal escape. *Nat Commun.* 2017; 8: 15853. doi: 10.1038/ncomms15853
36. Ozanic M., Gobin I., Brezovec M., Marecic V., Trobonjaca Z., Kwaik A.Y., and Santic M. *F. novicida*-Infected *A. castellanii* Does Not Enhance Bacterial Virulence in Mice. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6: 56. doi: 10.3389/fcimb.2016.00056.

## **8. KRATKI ŽIVOTOPIS PRISTUPNIKA**

### **OSOBNNE INFORMACIJE:**

**IME I PREZIME:** Vedrana Nefat

**DATUM I MJESTO ROĐENJA:** 07.10.1997., Rijeka

**ADRESA STANOVANJA:** Ćikovići Novo Naselje 85, 51215 Kastav (Hrvatska)

**KONTAKT:** +385 91/9310443

**MAIL:** vedrananefat7@gmail.com

### **OBRAZOVANJE:**

**2004. – 2012.:** Osnovna škola „Milan Brozović“ Kastav

**2012. – 2016.:** Medicinska škola u Rijeci

**2017. – 2020.:** Preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva  
Medicinski fakultet Rijeka