

# iglD ima važnu ulogu u unutarstaničnom razmnožavanju *F. tularensis* u *A. castellanii*

## iglD plays a crucial role in intracellular replication of *F. tularensis* in *A. castellanii*

Martin Brezovec, Aida Iljazović, Zlata Zaharija, Mateja Ožanić, Marina Šantić\*

Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

Primljeno: 2. 12. 2009.  
Prihvaćeno: 20. 1. 2010.

**Sažetak. Uvod:** *Francisella tularensis* gram-negativna je fakultativna unutarstanična bakterija koja može uzrokovati tešku bolest, tularemiju, u ljudi i životinja. Izolirana je u više od 250 divljih vrsta, uključujući ribe, ptice, vodozemce, zečeve, vjeverice, voluharice, krpelje i muhe. Podnosi teške uvjete i dokazano je da preživljava u vodi i blatu više od jedne godine. Prirodni rezervoar u vodi su praživotinje, uključujući mnoge vrste ameba. Prijašnji rezultati pokazali su preživljavanje i rast *F. tularensis* subsp. *novicida* u *Acanthamoeba castellanii*. **Metode:** U ovom radu ispitivano je unutarstanično razmnožavanje divljeg soja *F. tularensis* subsp. *novicida* te mutante iglD metodom CFU te konfokalnom mikroskopijom. **Rezultati:** Nema dokaza o ulozi iglD proteina u unutarstaničnom preživljavanju i razmnožavanju *F. tularensis* subsp. *novicida* unutar *A. castellanii*. Naši rezultati pokazuju da se *F. tularensis* subsp. *novicida* razmnožava u *A. castellanii* s pikom infekcije pri 48 sati. Mutanta iglD defektna je u razmnožavanju u stanicama *A. castellanii*. **Rasprava:** Ovi podaci sukladni su s prijašnjim istraživanjima u stanicama sisavaca gdje je ovaj gen ključan za unutarstanično razmnožavanje *F. tularensis* subsp. *novicida* u stanicama makrofaga. **Zaključak:** Naši rezultati ukazuju na sličnosti između dvaju okolišnih uvjeta koji utječu na preživljavanje i patogenost *F. tularensis*.

**Ključne riječi:** *Acanthamoeba castellanii*, *Francisella tularensis*, iglD mutanta

**Abstract. Introduction:** *Francisella tularensis* is a gram-negative facultative intracellular bacterium that can cause a fatal disease, tularemia, in human and animals. This organism has been isolated from over 250 wildlife species, including fish, birds, amphibians, rabbits, squirrels, hares, voles, ticks, and flies. It resists harsh environments, and has been shown to survive in water and mud for more than a year. The natural reservoirs in water are protozoa including many species of amoeba. Previous results have shown survival and growth of *F. tularensis* LVS strain in *Acanthamoeba castellanii*. **Methods:** In this work we tested the intracellular replication of *F. tularensis* subsp. *novicida* and mutant strains iglD by CFU and confocal microscopy. **Results:** There is no evidence about the role of iglD protein in intracellular survival and replication of *F. tularensis* subsp. *novicida* inside *A. castellanii*. Our results show that *F. tularensis* subsp. *novicida* replicates in *A. castellanii* cells with the peak of infection at 48 hours. The iglD mutant showed growth defect in *A. castellanii*. **Discussion:** This data are consistent with previous finding in mammalian cells where this gene is crucial for intracellular replication of *F. tularensis* subsp. *novicida* in macrophages cells. **Conclusion:** Our results pointed the similarities between two different environmental niche for *F. tularensis* survival and pathogenicity.

**Keywords:** *Acanthamoeba castellanii*, *Francisella tularensis*, iglD mutant

**Adresa za dopisivanje:**  
\* Doc. dr. sc. Marina Šantić, dipl. ing.  
Zavod za mikrobiologiju i parazitologiju,  
Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci,  
Braće Branchetta 22, 51 000 Rijeka  
e-mail: marina@medri.hr

<http://hrcak.srce.hr/medicina>

## UVOD

*F. tularensis* mala je gram-negativna, asporogena, pleomorfna, nepokretna bakterija koja ne posjeduje pile. Postoje četiri podvrste *F. tularensis*: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B), *mediasiatica* i *novicida*. Od navedenih, samo *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. tularensis* subsp. *holartica* uzrokuju bolest kod ljudi<sup>1,2</sup>. Obje su vrlo zarazne, infektivna doza je vrlo niska i iznosi svega 10 CFU<sup>3</sup>. *Francisella tularensis* subsp. *novicida* avirulentna je za lju-

*F. tularensis* mala je gram-negativna, asporogena, pleomorfna, nepokretna bakterija koja ne posjeduje pile. Postoje četiri podvrste *F. tularensis*: *tularensis* (tip A), *holartica* (tip B), *mediasiatica* i *novicida*. Od navedenih, samo *F. tularensis* subsp. *tularensis* i *F. tularensis* subsp. *holartica* uzrokuju bolest kod ljudi. *F. tularensis* je ameba-rezistentni mikroorganizam te se smatra kako su slobodnoživuće amebe poput *A. castellanii* glavni rezervoar *F. tularensis*. igID gen *F. tularensis* subsp. *novicida* ključan je za njezino preživljavanje i rast u *A. castellanii*.

de, ali kod miševa uzrokuje bolest s istim simptomima tularemije kao i subsp. *tularensis*<sup>4</sup>. Studije pokazuju kako su se četiri usko povezane podvrste *F. tularensis* razvile vertikalnom linijom među kojima je upravo *novicida* najstarija<sup>5</sup>.

Temelji iznimne virulencije *F. tularensis* još su uvijek nedovoljno objašnjeni. Poznato je kako ima sposobnost inficirati velik broj tipova stanica, ali *in vivo* primarno inficira makrofage. Virulencija *F. tularensis* temelji se na razmnožavanju u različitim tkivima i organima domaćina, ometajući tako njihove normalne funkcije te inducirajući upalne procese koji pridonose razvoju bolesti<sup>6,7</sup>. Iznimnoj virulenciji pridonose geni unutar FPI (engl. *Francisella pathogenicity island*) koji su pokazali veliku i važnu ulogu u unutarstaničnom preživljavanju i razmnožavanju ove bakterije<sup>8-10</sup>. *Francisella* patogeni otok sastoji se od 19 gena i pronađen je u dvije kopije kod većine sojeva *F. tularensis*, (a kod soja *novicida* u jednoj kopiji), te se sastoji od igIABCD operona i pdpABD gena<sup>11</sup>. Protein IgID koji je dio FPI, veličine je 17 kb, a na 3' kraju ima 26,6 % G+C. Nužan je za unutarstanično razmnožavanje bakterija u makrofagima<sup>3</sup>. Mnogi geni unutar FPI regulirani su proteinom MgIA koji je smješten izvan FPI<sup>9</sup>.

*Francisella tularensis* ulazi u makrofage fagocitozom. Potom izlazi iz unutrašnjosti fagosoma u citosol gdje se ubrzano razmnožava. Na kraju, inficirana stanica podliježe apoptozi, a namnožene bakterije mogu započeti novi krug infekcije<sup>3</sup>.

*Francisella tularensis* široko je rasprostranjena u sjevernoj hemisferi i ima mogućnost inficirati velik broj kralježnjaka i beskrležnjaka. Nađena je među raznim vrstama sisavaca, ptica, vodozemaca i riba, ali najčešće je vezana uz zečeve, kuniće, vjeverice, voluharice i vodene štakore koji se ujedno smatraju i jednim od rezervoara bolesti<sup>12</sup>. *Acanthamoeba spp.* su jedne od najrasprostranjenijih slobodnoživućih ameba. Mogu se naći u raznim staništima; u vodi (prirodnoj i tretiranoj, u moru i bazenima), tlu, zraku i u prašini<sup>13</sup>. Iako su slobodnoživuće amebe važan predator u odnosu na bakterije i gljive, neki mikroorganizmi evoluirali su i stekli rezistenciju. Takvi ameba-rezistentni mikroorganizmi mogu koristiti unutarstanični okoliš ameba za razmnožavanje, koristiti ih kao zaštitu za vrijeme encistacije, te se služiti amebama kao vektorom za širenje u prirodi<sup>14</sup>. Nedavna istraživanja pokazuju kako je *F. tularensis* ameba-rezistentni mikroorganizam, te se sumnja kako su upravo slobodnoživuće amebe poput *A. castellanii* glavni rezervoar *F. tularensis*<sup>15</sup>.

U ovom radu uspoređivano je preživljavanje i razmnožavanje divljeg soja *F. tularensis* subsp. *novicida* i njezine mutante igID unutar stanica *A. castellanii*. Po prvi put pokazano je da je igID gen *F. tularensis* subsp. *novicida* ključan za njezino preživljavanje i rast u *A. castellanii*.

## METODE

### BAKTERIJSKI SOJEVI I AMEBA

Divlji soj *F. tularensis* subsp. *novicida* i njena mutanta, igID, prethodno su opisane<sup>16</sup>. Obje bakterije kultivirane su na krvnom agaru uz dodatak tetraciklina (10 µg/ml), a za rast mutante dodan je i kanamicin u koncentraciji 10 µg/ml. Bakterije sadrže plazmid pKK214 koji kodira gfp<sup>16</sup>. *A. castellanii* ATCC 30234 (LGC Standards) soj uzgajan je u hranjivom mediju ATCC 30234 na 25 °C.

### POSTUPAK INFEKCIJE

Stanice ameba inficirane su bakterijskim sojevima u omjeru 1 : 10, tj. MOI (engl. *multiplicity of in-*

fection) je 10 (10 bakterija na 1 stanicu amebe). Broj stanica ameba određen je brojenjem u Neubauerovoj komorici, dok je potreban broj bakterija određen spektrofotometrijski na valnoj duljini od 580 nm te je napravljen potvrdni test određivanjem CFU na krvnom agaru. Inficirane amebe tretirane su gentamicinom 1 h (40 µg/ml) te im je oštećena membrana djelovanjem triton-X 100 (0,1 %) tijekom 10 min kako bi se oslobodile unutarstanične bakterije. Broj unutarstaničnih bakterija, CFU, određivan je 2, 6, 12, 24, 48 i 72 sata nakon infekcije. Deseterostruka razrjeđenja uzoraka naciepljivana su na hranjive podloge te inkubirane na 37 °C uz 5 % CO<sub>2</sub>. Nakon 3 dana inkubacije određivan je broj poraslih kolonija. Pokus je ponovljen tri puta.

### KONFOKALNA LASERSKA MIKROSKOPIJA

Stanice *A. castellanii* adherirane su na pokrovno stakalce u pločicama s 24 jačice u 30234 ATCC mediju. Nakon jednog sata inkubacije i infekcije, stanice su tretirane gentamicinom da se uklone izvanstanične bakterije. Nakon 24 sata od infekcije stanice su fiksirane, permeabilizirane i blokirane kao što je to prethodno opisano<sup>16</sup>.

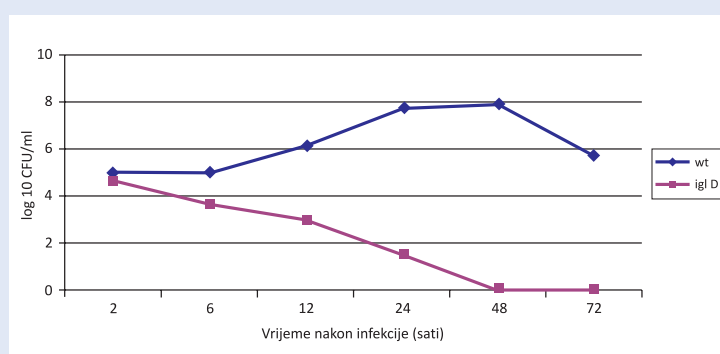
### REZULTATI

*A. castellanii* inficirane su bakterijama *Francisella tularensis* subsp. *novicida* i mutantom iglD u omjeru 1 : 10. Niska infektivna doza korištena je jer su prethodna istraživanja pokazala da velika infektivna doza kod soja *novicida* dovodi do superinfekcije zbog bolje prilagođenosti *novicida* soja na okolišne uvjete odnosno na život unutar ameba<sup>8</sup>.

Dva do šest sati nakon infekcije broj bakterija *F. tularensis* subsp. *novicida* je konstantan i iznosi oko 10<sup>5</sup> CFU/ml, dok se broj mutante iglD smanjuje s 10<sup>5</sup> na 10<sup>4</sup> CFU/ml (slika 1). Zatim dolazi do postepenog porasta broja bakterija *F. tularensis* subsp. *novicida* na oko 10<sup>6</sup> CFU/ml nakon dvanaest sati, dok kod mutante iglD broj i dalje opada na 10<sup>3</sup> CFU/ml (slika 1). Nakon 24 sata od infekcije broj bakterija *F. tularensis* subsp. *novicida* doseže oko 10<sup>8</sup> CFU/ml, a broj mutante iglD opada na oko 10<sup>2</sup> CFU/ml, što je vidljivo i iz slika konfokalne mikroskopije (slika 1 i 2). Nakon 48 sati od infekcije broj bakterija *F. tularensis* subsp. *novicida* je konstantan i iznosi oko 10<sup>8</sup> CFU/ml, dok broj mutante iglD opada na nulu (slika 1). Na-

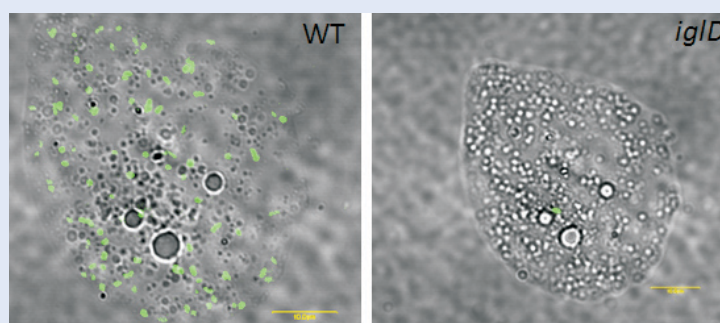
kon 72 sata od infekcije broj bakterija *F. tularensis* subsp. *novicida* značajno se smanjuje s 10<sup>8</sup> na oko 10<sup>6</sup> CFU/ml (slika 1).

*F. tularensis* subsp. *novicida* unutarstanični je patogen i ima sposobnost inficirati velik broj stanica, kao i stanice ameba, te se razmnožavati u njima. Rezultati pokazuju da se *F. tularensis* subsp. *novicida* postepeno razmnožava i preživljava u *A. castellanii* kroz 48 sati nakon čega naglo prestaje



**Slika 1.** Kinetika rasta *Francisella tularensis* subsp. *novicida* i mutante iglD u *A. castellanii*. Stanice *A. castellanii* (5x10<sup>5</sup>) inficirane su bakterijama tijekom 1 sata te tretirane gentamicinom da se odstrane izvanstanične bakterije. U naznačenom vremenskom periodu određivan je broj bakterija (CFU). Pokus je ponovljen 3 puta. Podaci su obrađeni statistički te je izračunata STDEV.

**Figure 1.** Intracellular growth of the WT strain of *F. tularensis* subsp. *novicida* and the *iglD* mutant in *A. castellanii*. *A. castellanii* cells in concentration of 5x10<sup>5</sup>/ml were infected for 1h, followed by a gentamycin treatment to remove the extracellular bacteria, and determination of the number of intracellular bacteria at the indicated time points. The results are representative of three different experiments with STDEV.



**Slika 2.** iglD mutanta ne razmnožava se u *A. castellanii*. Reprezentativne slike konfokalne mikroskopije za unutarstanični smještaj *F. tularensis* subsp. *novicida* i iglD mutante u *A. castellanii*. Stanice *A. castellanii* inficirane su divljim sojem *F. tularensis* subsp. *novicida* i iglD mutantom u omjeru 1 : 10 te tretirane gentamicinom. Bakterije su obilježene zelenom bojom (GFP), a stanice ameba prikazane su faznim kontrastom.

**Figure 2.** The *iglD* does not replicate in *A. castellanii*. Representative confocal laser scanning microscopy images for intracellular location of *F. tularensis* subsp. *novicida* and *iglD* mutant in *A. castellanii*. *A. castellanii* were infected with the wt strain of *F. tularensis* subsp. *novicida* and *iglD* mutant at MOI of 10 for 1 h, followed by gentamycin treatment. The bacteria express GFP (green), and the amoeba cells were showed by phase contrast.

njezino razmnožavanje, dok se njezina mutanta igLD ne razmnožava niti nakon 2 sata od infekcije. Njezin broj se sve više smanjuje i kroz 48 sati u potpunosti nestaje.

#### RASPRAVA

Iako je *F. tularensis* humani patogen i potencijalno biološko oružje s visokom stopom mortaliteta, još uvijek se nedovoljno zna o mehanizmima patogeneze. U virulenciji *F. tularensis* značajnu ulogu svakako ima njena sposobnost razmnožavanja u velikom broju različitih stanica, uključujući stanice hepatocita, fibroblasta, endotelne i epitelne stanice, no najčešće inficira makrofage<sup>6</sup>. Također, može preživjeti i razmnožavati se unutar stanica ameba koje se ujedno smatraju i jednim od rezervoara ove bakterije u prirodi.

Istraživanja su pokazala da *Francisella* može iskoristivati praživotinje kao prirodni rezervoar, te da je razvila mehanizam preživljavanja fagocitoze unutar protozoa, kao što je to slučaj kod bakterija iz roda *Legionella*, *Mycobacterium*, *Escherichia*<sup>14</sup>. Nedavna istraživanja pokazala su da LVS soj *F. tularensis* ima sposobnost rasta i razmnožavanja unutar praživotinja, odnosno ameba<sup>15</sup>. Praćenjem rasta i razmnožavanja *F. tularensis* subsp. *novicida* u *A. castellanii* u ovom radu pokazalo se da se *F. tularensis* subsp. *novicida* bolje razmnožava u amebama u odnosu na LVS soj. Razlog tome je bolja prilagodba *F. tularensis* subsp. *novicida* na vodeni okoliš u kojem se nalazi i *A. castellanii*<sup>16</sup>.

Naša prijašnja istraživanja pokazala su da je igLD protein, koji je dio FPI, esencijalan za unutarstanično razmnožavanje u primarnim ljudskim monocitima<sup>16</sup>. Također smo pokazali da je igLD protein kao faktor virulencije potreban za rast *F. tularensis* subsp. *novicida* i u stanicama insekata<sup>17</sup>. U ovom istraživanju pokazali smo da za razliku od divljeg soja koji preživljava i razmnožava se unutar ameba, mutanta igLD ne pokazuje istu sposobnost preživljavanja u *A. castellanii*. Već 6 sati nakon infekcije broj mutante igLD u amebama počeo se smanjivati, ukazujući na važnost igLD gena za unutarstanični život *F. tularensis* i u stanicama protozoa.

#### ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem pokazali smo da je igLD gen bitan za rast i razmnožavanje *F. tularensis* subsp. *novicida* u stanicama ameba *A. castellanii*.

#### ZAHVALA:

Ovaj rad nastao je uz financijsku potporu projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa: 062-0621273-0950.

#### LITERATURA

1. Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH et al. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* 2005; 37:153-9.
2. Petrosino JF. Chromosome rearrange and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the Type B (OSU18) genome sequence. *J Bacteriol* 2005;188:6977-85.
3. Santic M, Molmert M, Klose KE, Abu Kwaik Y. *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol* 2006;14:37-44.
4. Sjosted A. Tularemia: History, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann NY Sci* 2005; 11:1-29.
5. Keim P, Johansson A, Wagner ADM. Molecular epidemiology, evolution and ecology of *Francisella*. *Ann NY Sci* 2007;1105:30-66.
6. Oyston PC. *Francisella tularensis*: unravelling the secrets of an intracellular pathogen. *Journal of Medical Microbiology* 2008;57:921-30.
7. Titball RW, Johansson A, Forsman M. Will the enigma of *Francisella tularensis* virulence soon be solved? *Trends in Microbiology* 2003:11.
8. Larsson P, Elfsmark D, Svensson K, Wikström P, Forsman M, Brettin T et al. Molecular evolutionary consequences of niche restriction in *Francisella tularensis*, a facultative intracellular pathogen. *PLoS Pathog* 2009;5:6-24.
9. Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Cheung KKM, Roberts MJ et al. A *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *Journal of Bacteriology* 2004;186:6430-6.
10. Santic M, Molmeret M, Klose KE, Jones S, Abu Kwaik YA. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cell Microbiol* 2005;17:969-79.
11. Nano FE, Schemerk C. The *Francisella* Pathogenicity Island. *Ann NY Sci* 2007;11:12-137.
12. Morner T. The ecology of tularemia. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1992;11:1123-30.
13. Rodriguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. *Crit Rev Microbiol* 1994;20:225-41.
14. Greub G, Raoult D. Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 2004;17:413-33.
15. Abd H, Thorsten JT, Golovliov I, Sandström G, Forsman M. Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and environmental microbiology* 2003;69:600-6.
16. Santic M, Molmeret M, Barker JR, Klose KE, Dekanic A, Doric M et al. A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cell Microbiol* 2007;9:2391-403.
17. Santic M, Akimana C, Asare R, Kouokam JC, Atay S, Kwaiik YA. Intracellular fate of *Francisella tularensis* within arthropod-derived cells. *Environ Microbiol* 2009;11:1473-81.