

# Prosjektplan for bachelorprosjekt 2020

Fakultet for ingeniør og naturvitenskap, bioingeniørutdanningen

Navn: Mariann Steine

Intern veileder: Turid Aarhus Braseth

Ekstern veileder: Nasibeh Mohammadi og Anders Sjøstedt

Laboratorium: Laboratory for Molecular Infection Medicine Sweden, Department of Clinical Microbiology, Umeå University, Umeå, Sweden.

## 1. Guanylat-bindende proteiners rolle ved infeksjon av *Francisella tularensis*

The role of Guanylate-binding proteins during infection with *Francisella tularensis*

## 2. Bakgrunn, problemstilling

Vi ønsker å undersøke GBP 2 og GBP 5s rolle i intracellulær infeksjon med *F. tularensis*. I tillegg vil vi utprøve om priming med interferon-gamma vil påvirke celleviabilitet og hvordan proteinene uttrykkes under infeksjon. I dette studiet vil *F. tularensis* subsp. *Tularensis*, SCHU S4, *F. tularensis* subsp. *Holarctica*, LVS (live vaccine strain), *F. novicida* (U112) og flere muterte versjoner av *F. tularensis* SCHU S4 (LPCC, WBTC og WBTI) benyttes.

Når et intracellulært patogen kommer inn i en vertscelle trigges det medfødte immunsystemet. Det medfødte immunsystemet spiller en kritisk rolle i vertens forsvar ved å regulere produksjonen av pro-inflammatoriske cytokiner, antimikrobielle effektorer og aktivering av ulike celletyper.

Guanylat-bindende proteiner er interferonindusible GTPaser som utspiller sin rolle i det medfødte immunforsvaret ved å rette seg mot intracellulære patogener (Ngo & Man, 2017), i dette tilfelle patogener, intracellulære bakterier. Det er foreløpig identifisert 7 menneskelige

GBPs og 11 for mus. Genens om koder for menneskelig GBPs ligger samlet på kromosom en, mens genene for muse-GBPs ligger samlet på kromosom 3 og 5 (Man, Place, Kuriakose & Kanneganti, 2017)

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) er en cytokin som spiller en viktig rolle i vertens forsvar mot intracellulære patogener. Tidligere studier har vist at IFN- $\gamma$  kontrollerer infeksjonen med *Francisella tularensis* (LVS) (McLendon, Apicella & Allen, 2006), et intracellulært patogen som for det meste infiserer makrofager. Det er dog ikke klart hvordan IFN- $\gamma$  hindrer proliferering av den cytosol lokaliserte bakterien (Wallet et al., 2017). Nyligere studier på *Francisella novicida* viser at IFN- $\gamma$  induisert gunanylate-bindende proteiner (GBPs), nærmere bestemt GBP2 og GBP5 retter seg mot cytosolisk *F. novicida* og fører til ruptur/lysis av bakteriemembranen (Wallet et al., 2017). Dette resulterer dermed at bakterielt DNA eksponeres i cytoplasma. Bakterie-DNA vil bli oppfattet av AIM2 (absent in melanoma 2) reseptorer, noe som aktiverer AIM2 inflammasomene som promoterer bakterielysis (Wallet et al., 2017).

Relevant litteratur:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.12791>

<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006630>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867416312454?via%3Dihub>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1945232/>

### **3. Material og metode**

Det benyttes differensierte benmargs-deriverte murine makrofager fra mus (BMDMs). Cellene dyrkes, kultiveres, eventuelt primes med INF-gamma, infiseres med bakterier og til slutt lyses for å få tilgang til de intracellulære proteinene. Det vil også bli foretatt viabilitetstesting av cellene både pre- og postinfeksjon.

Bakteriene dyrkes på MC-plater fra frossen kultur i alt mellom en og tre dager. De dyrkede bakteriene benyttes siden for å lage løsning av bestemt konsentrasjon til infeksjon av cellene. Lysatet vil bli benyttet i Westernblot analyse for å detektere spesifikke proteiner, eksempelvis GBP2 og AIM2.

Alle forsøk utføres med tre paralleller for hvert aspekt. F.eks. vil det sås tre paralleller av gitt konsentrasjon infisert med en *F. tularensis subsp.* enten med eller uten IFN-gamma.

#### 4. Etiske betraktninger

Prosjektet krever dyreceller. Dette medfører å påføre skade og død for dyrene som cellene tilhører. Det etiske aspektet blir sådan om man kan rettferdiggjøre dette i forskningens navn, samt sørge for at dyrene så langt det lar seg gjøre behandles forsvarlig og med respekt.

#### 5. Fremdriftsplan

En «runde» i prosjektet er sammensatt av 3 arbeidsdager, men total tid vil bli rundt fem dager. Hvert forsøk gjentas tre ganger, dvs. total tid vil bli rundt 3 – 4 uker for å samle nok data.

Dag 1:

- Viabilitetsteste cellesuspensjon.
- Så BMDM celler i 96-brønner brett og 6-brønner brett.
- Så ut bakterieceller i MC-skåler.

Dag 2:

- Lage OD = 1 fra dyrkede bakterier i komplett DMEM for både viabilitetstest og Westernblot.
- Beregne og lage bakterieløsning som tilsvarer MOI=100 for viabilitetstest og MOI=500 for Westernblot.
- Infisere cellene.

Dag 3:

- Lysere celler.

- Fortynne.
- Preparere gel for Westernblot.
- Kjøre Westernblot.

Grunnet situasjonen rundt Covid-19 ble utveklingsarbeid avbrutt og dermed alt planlagt lab-arbeid kansellert. Fremdriftsplan endres derfor til teoretisk studie i Norge i relevans til prosjektarbeidet som ble gjort i Sverige. Eksperimentelle data sendes pr. e-post fortløpende i samsvar med bestemmelser gjort ved universitetet i Umeå. Detaljert plan for hver uke vedlegges i statusrapport 1-3 og dokumenteres i prosjektdagbok.

## **6. Ressurser**

Angi en oversikt over hvilke ressurser som kreves for gjennomføring av prosjektet. Utstyr, reagenser, samarbeidspartnere, økonomiske midler etc.

Diverse utstyr som benyttes:

- MC-skåler for dyrking av bakterier.
- Avtrekksskap med tilgang til gass.
- Sentrifuge med kjøling.
- Mikroskop.
- Vi-cell XR cell viability analyser.
- Utstyr for å kjøre elektroforese (gel, kar, buffer, strømkilde osv.)
- BioRad mini-protean tetra cell.
- Pipetter og pipettespisser i ulike størrelser.
- Inkubasjonsskap.
- MegaBlock 96 brønner, 1.2mL, PS.

Diverse reagenser som benyttes:

- DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) cellekultiveringsmedium.
- PBS buffer.
- Ionebyttet vann.
- Konsentrert interferon-gamma.

- 4x Laemmli sample buffer.
- Gentamycin.
- Natriumdeoxychololat 1%.
- Pierce RIPA-buffer.
- FBS (Fetal bovine serum).
- Diverse antistoffer.
- Trans-Blot Turbo transfer pack (BioRad).
- TGX FastCast acrylamide kit 12%.
- Mini-protean TGX gels.
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific).
- SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific).
- SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo scientific).
- Fosfatase inhibitor 100X.
- Halt Protease Inhibitor Single-use Cocktail 100X (Thermo scientific).

Samarbeidspartnere:

- Universitetet i Umeå.
- Sykehuset i Umeå.
- Leverandører av laboratorieutstyr.

## 7. Referanseliste

Man, S. M., Place, D. E., Kuriakose, T. & Kanneganti, T. D. (2017). Interferon-inducible guanylate-binding proteins at the interface of cell-autonomous immunity and inflammasome activation. *J Leukoc Biol*, 101(1), 143-150. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0516-223R>

McLendon, M. K., Apicella, M. A. & Allen, L. A. (2006). Francisella tularensis: taxonomy, genetics, and Immunopathogenesis of a potential agent of biowarfare. *Annu Rev Microbiol*, 60, 167-185. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142126>

Ngo, C. C. & Man, S. M. (2017). Mechanisms and functions of guanylate-binding proteins and related interferon-inducible GTPases: Roles in intracellular lysis of pathogens. *Cell Microbiol*, 19(12). <https://doi.org/10.1111/cmi.12791>

Wallet, P., Benaoudia, S., Mosnier, A., Lagrange, B., Martin, A., Lindgren, H., ... Henry, T. (2017). IFN- $\gamma$  extends the immune functions of Guanylate Binding Proteins to inflammasome-independent antibacterial activities during *Francisella novicida* infection. *PLoS Pathog*, 13(10), e1006630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006630>

## 8. Underskrifter

Student: \_\_\_\_\_

Veileder: \_\_\_\_\_