



Høgskulen  
på Vestlandet

# BACHELOROPPGAVE

IFN- $\gamma$  og guanylat-bindende proteiners rolle ved infeksjon med *Francisella tularensis*

The role of IFN- $\gamma$  and Guanylate-binding proteins during infection with *Francisella tularensis*

**Mariann Steine**

Bioingeniørutdanningen

Fakultet for ingeniør og naturvitenskap

Intern veileder: Turid Aarhus Braseth (HVL)

29.05.2020

Jeg bekrefter at arbeidet er selvstendig utarbeidet, og at referanser/kildehenvisninger til alle kilder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

## Sammendrag

GBP5s (guanlylat-bindende protein 5) rolle ved infeksjon med *Francisella tularensis* er lite studert. GBP er immunitetsrelaterte GTPaser som kan stimuleres med IFN- $\gamma$  (interferon-gamma). *F. tularensis* er en Gram-negativ kokkobasill som forårsaker tularemi (harepest). Våre forsøk gjort med benmargsderiverte musmakrofager (BMDMs) fra C57BL/6 mus indikerer at GBP5 spiller en viktig rolle i å begrense intracellulær formering av *F. tularensis* og *F. novicida*. Dataene indikerer imidlertid at SCHU S4 strain (en pasientisolert høggradig virulente subspecies *tularensis*) ikke lar seg påvirke av GBP5-mediert kontroll.

Gjennom dette prosjektet ønsket vi å undersøke hvorvidt priming med IFN- $\gamma$  kan kontrollere prolifereringen av intracellulære bakterier i BMDMs og hvilken rolle GBP5 spiller i infeksjonsforløpet. Disse aspektene ble undersøkt ved hjelp av metoder som celledyrkning, infisering av BMDMs i nærvær eller fravær av IFN- $\gamma$ , lysing av infiserte celler og bestemmelse av intracellulære bakterieantall, gel-elektroforese og Western Blot for å undersøke uttrykket av GBP5, samt hvorvidt IFN- $\gamma$  påvirker disse aspektene.

**Nøkkelord:** IFN- $\gamma$ , GBP5, Francisella, BMDMs, inflammasom.

## Summary

The role of GBP5 (guanlylate-binding protein 5) in infection with *Francisella tularensis* have seldom been studied. GBPs are immunity-related GTPases that can be stimulated with IFN- $\gamma$  (interferon-gamma). *F. tularensis* is a Gram-negative cocoa bacillus that causes tularemia. Our experiments with bone marrow-derived mouse macrophages (BMDMs) from C57BL / 6 mice indicate that GBP5 plays an important role in limiting the intracellular proliferation of *F. tularensis* and *F. novicida*. However, the data indicate that SCHU S4 strain (a patient-isolated high-grade virulent subspecies *tularensis*) is unaffected by GBP5-mediated control.

Through this project, we wanted to investigate whether priming with IFN- $\gamma$  can control the proliferation of intracellular bacteria in BMDMs and the role of GBP5 in the course of infection. These aspects were investigated by methods such as cell culturing, infection of BMDMs in the presence or absence of IFN- $\gamma$ , lysis of infected cells and determination of intracellular bacterial numbers, gel electrophoresis and Western Blot to investigate the expression of GBP5, and whether IFN  $\gamma$  affects these aspects.

## Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet i samarbeid mellom Høgskolen på Vestlandet (HVL) og Universitetet i Umeå. Bacheloren var planlagt til å gjennomføres i Sverige, men på grunn av Covid-19 måtte det praktiske samarbeidet avsluttes etter kort tid. Jeg er derfor svært takknemlig for at samarbeidet kunne fortsette over nett. Noen ekstra utfordringer kom det selvfølgelig med situasjonen. Innhenting av praktiske data ble spesielt utfordrende, og situasjonen var generelt stressende og usikker for mange. Prosjektet ble dessverre sterkt komprimert. Flere aspekter som skulle vært med, måtte gå ut grunnet situasjonen.

Jeg vil takke de involverte for samarbeidet og for erfaringer og kunnskaper jeg tar med meg fra prosjektperioden. Jeg vil takke for forståelsen og fleksibiliteten rundt Covid-19 situasjonen, som gjorde samarbeidet svært utfordrende. Spesielt vil jeg takke mine veiledere i ved laboratoriet for molekylær infeksjonsmedisin, avdeling for klinisk mikrobiologi på universitetet i Umeå; professor og overlege Anders Sjöstedt, samt forskningsassistent og doktorgradsstipendiat Nasibeh Mohammadi for uvurderlig veiledning og velvillighet i en vanskelig situasjon. Jeg vil også rette en takk til min veileder i Norge, høgskolelektor Turid Aarhus Braseth som under stort press har jobbet for gode løsninger i en vanskelig situasjon. Takk til Erasmus-programmet for økonomisk støtte til utveksling som gjorde denne bacheloroppgaven mulig.

Bergen 29.05.20 (sign).

# Innholdsfortegnelse

Sammendrag .....	1
Summary .....	1
Forord .....	3
1. Introduksjon.....	5
1.1 Infeksjon.....	7
1.2 Guanylat-bindende proteiner .....	8
1.3 IFN- $\gamma$ .....	9
1.4 AIM2.....	10
1.5 Caspase-1 .....	11
2. Materiale og metode.....	13
2.1 Cellekultur .....	13
2.2 Infeksjon av BMDMs.....	13
2.3 Bestemmelse av bakterieantall.....	13
2.4 Immunoblot analyse .....	14
3. Resultater.....	15
3.1 Viabilitetstesting .....	15
3.2 Western blot analyse for GBP5.....	16
4. Diskusjon.....	18
4.1 Viabilitet.....	18
4.2 Western blot.....	18
5. Konklusjoner og videre arbeid .....	20
5.1 Konklusjoner .....	20
5.2 Videre arbeid .....	20
6. Litteraturliste .....	22
7. Definisjoner .....	25

## 1. Introduksjon

*Francisella tularensis* er en fakultativ intracellulær Gram-negativ kokkobasill som kan forårsake sykdommen tularemi (McLendon, Apicella & Allen, 2006). Den vanligste formen for tularemi hos mennesker er ulceroglandular tularemi med en dødelighet på ca. 3% (Ellis, Oyston, Green & Titball, 2002). Den mer dødelig pneumoniske formen forekommer sjeldnere og helst ved inhalering av bakterien, men kan også forekomme som en komplikasjon av ulceroglandular tularemi (Ellis et al., 2002). Det finnes flere subtyper av bakterien som forårsaker sykdom i ulik grad. Bakterien smitter fra dyr til menneske gjennom direkte kontakt, flottbitt, forurenset vann/mat eller inhalasjon av mikroorganismen (Strelkauskas, Edwards, Fahnert, Pryor & Strelkauskas, 2016, s. 621). Diagnostisering kan være utfordrende da bakterien er vanskelig å dyrke. Metoder som enzymkoblet immunosorbentanalyse og PCR-baserte metoder foretrekkes derfor i klinisk diagnostisering (Ellis et al., 2002). Foretrukket behandling ved tularemi er ciprofloxacin eller tetracyklin. Ved alvorlig sykdom er aminoglykosidene streptomycin og gentamicin foretrukket (Ellis et al., 2002).

I dette studiet vil *F. tularensis* subsp. *tularensis*, SCHU S4, *F. tularensis* subsp. *holarctica*, LVS (live vaccine strain), *F. novicida* (U112) og flere LPS (lipopolysakkarid) muterte versjoner av *F. tularensis* SCHU S4 (*lpcC*, *wbtC* og *wbtI*) benyttes. SCHU S4 er en svært høyvirulent stamme av *F. tularensis* der kun en dose på så lite som 10 CFU (colony-forming unit) kan forårsake død hos mennesker (Bakshi et al., 2008). Stammen som benyttes her er isolert fra en pasient i Nord-Amerika. Svekket LVS har blitt brukt som en vaksine mot tularemi i den vestlige verden og har vært effektiv mot både naturlig og laboratorieervert tularemi (Bakshi et al., 2008). Stammen som benyttes her er svekket, isolert fra russisk isolat benyttet for vaksinerings av laboratoriepersonell.

LPS-mutantene (*lpcC*, *wbtC* og *wbtI*) har blitt endret slik at LPS ikke er intakt. Dette har i studier vist seg å gi dem dempet virulens når de gis til mus (Twine, Vinogradov, Lindgren, Sjostedt & Conlan, 2012). Bakteriene viser seg derimot å være mer inflammatoriske når de infiserer celler og dermed medfører en sterkere immunrespons (Twine et al., 2012). Ved å benytte disse LPS-mutantene kan vi undersøke LPS sin funksjon i forbindelse med GBPs i forhold til SCHU S4 som har intakt LPS.

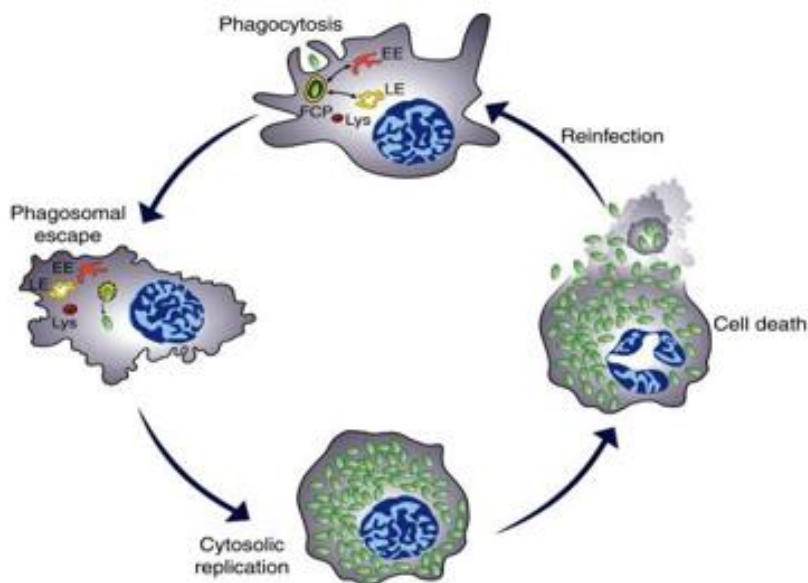
Når et intracellulært patogen kommer inn i en vertscelle trigges det medfødte immunsystemet. Det medfødte immunsystemet spiller en kritisk rolle i vertens forsvar ved å regulere produksjonen av pro-inflammatoriske cytokiner, antimikrobielle effektorer og aktivering av ulike celletyper. *F. tularensis* kan infisere hos både mennesker, hunder, kaniner, rotter og mus (McLendon et al., 2006). Ved infeksjon vil makrofagene utøve sin funksjon ved å fagocytosere bakteriecellene. Det spesielle er at ved fagocytose vil bakteriecellene unnsnippe fagosomene inne i cellen og slik unngå å bli ødelagt. Bakterien kan således formere seg i makrofagens cytosol (McLendon et al., 2006).

Hensikten med studien var todelt. For det første ønsket vi å undersøke hvilken rolle guanylat-bindende proteiner (GBPs), henholdsvis GPB5, spiller i intracellulær infeksjon med *F. tularensis* subspecies. For det andre ble det også i løpet av denne studien sett på hvorvidt priming med interferon- $\gamma$  vil påvirke intracellulær bakterieformering og nivåene av GPB5 i de infiserte cellene.

## 1.1 Infeksjon

Overlevelse inne i vertsceller er essensielt for bakteriens overlevelse og er en stor del av bakteriens livssyklus (Celli & Zahrt, 2013). Forskning tilsier at mannose-reseptoren er involvert i ikke-opsoniserende opptak av *F. tularensis* stammer og *F. novicida* (Celli & Zahrt, 2013). Serum opsonisering har vist seg å være mer effektivt i opptak av bakterien. Fcγ-reseptoren er den viktigste fagocyterende reseptoren under opptak av antistoff-opsoniserende *Francisella* (Celli & Zahrt, 2013).

Ved opptak inn i verts-cellen befinner bakterien seg på innsiden av et umodent fagosom. Vanligvis ville fagosomet gjennomgått en modningsprosess der fagosomet skulle interagert med lysosom for å bryte ned endosomets innhold, som i dette tilfellet ikke skjer (Celli & Zahrt, 2013). Bakterien bryter fysisk ut av fagosomets membran og rømmer ut i vert-cellens cytosol der bakterien kan formere seg (Celli & Zahrt, 2013).



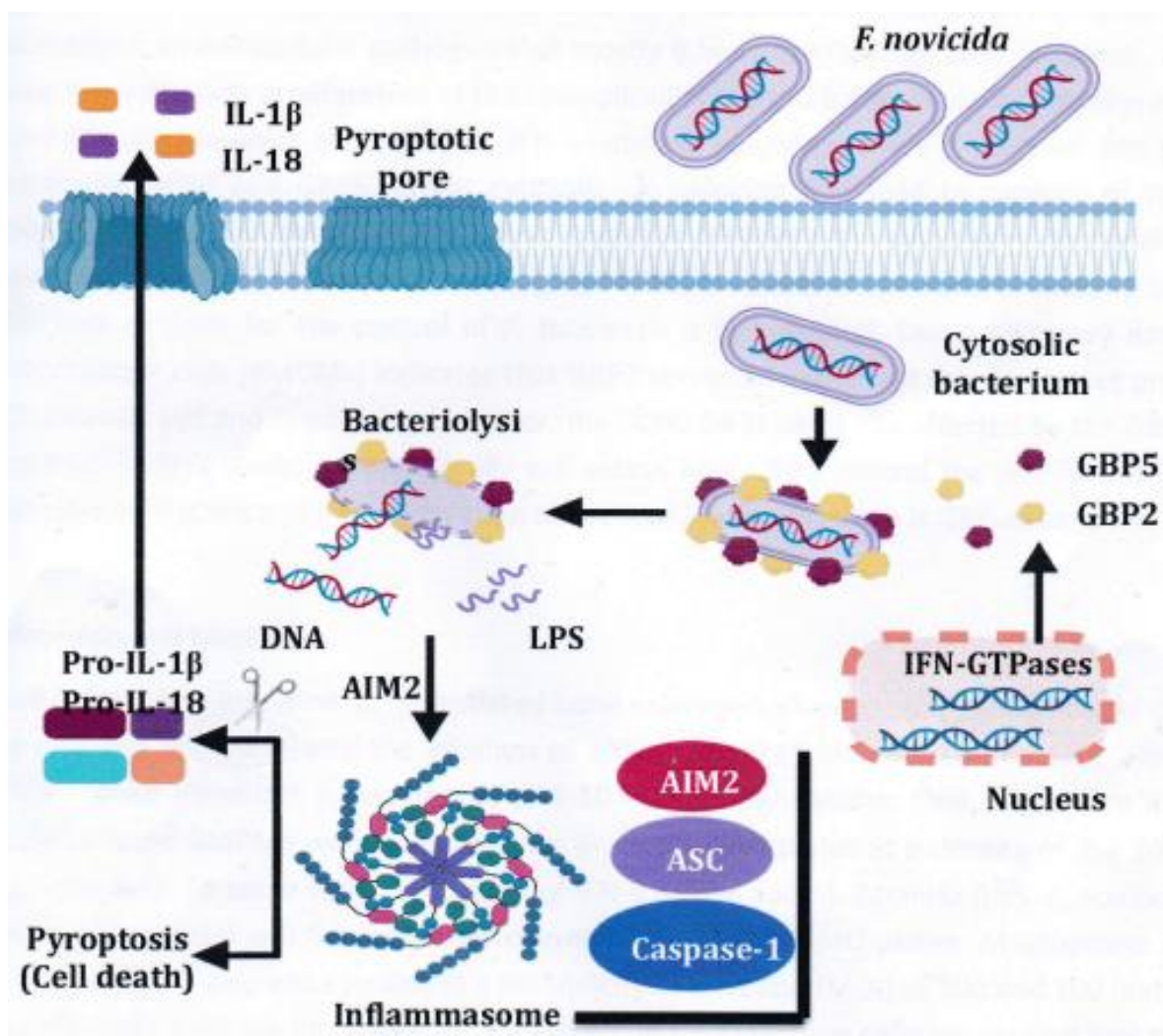
Jean Celli, et al. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Apr;3(4):a010314.

*Figur 1: Modell av Francisellas intracellulære livssyklus som avbilder stegene som er vanlig i både human og murine fagocytter. Ved fagocytose vil bakterien finnes i et umodent fagosom (FCP) som samvirker med tidlige (EE) og sene endocytiske (LE) rom, men ikke lysosom (lys). Bakterien bryter seg raskt ut gjennom fagosomets membran og kommer ut i cytosol hvor de kan formere seg, noe som til slutt medfører celledød, frigjøring av bakterieceller og reinfeksjon i andre omliggende celler.*



## 1.2 Guanylat-bindende proteiner

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. Genene som koder for menneskelige GBPs ligger samlet på kromosom 1, mens genene for muse-GBPs ligger samlet på kromosom 3 og 5 (Man, Place, Kuriakose & Kanneganti, 2017)



Figur 2: Intracellulært infeksjonsforløp med aktivering av ulike inflammasomer. Illustrasjon: Nasibeh Mohammadi ved Universitetet i Umeå.

Den viktigste biologiske funksjonen til GBPs er å lysere bakterieceller slik at mikroorganismens DNA eksponeres i cellens cytosol. Dette fører til aktivering av den medfødte DNA sensoren AIM2 inflammasom (Ngo & Man, 2017). Inflammasomer er typisk store multimolekulære komplekser som har hensikt i å regulere infeksjonsforløp/inflammasjonsforløp. Aktivering av AIM2 vil så sette i gang aktivering av andre inflammasomer som caspase-1 og sekresjon av IL-1 $\beta$  og IL-18 som til slutt induserer pyroptose altså ødeleggelse av den infiserte makrofagen (Ngo & Man, 2017).

Tidligere studier gjort med muse BMDMs fant både GBP2 og GBP5 på overflaten av intracellulær *F. novicida*, noe som medførte bakteriedød. BMDMs modifisert til å ikke inneha GBP2 og GBP5 derimot, inneholdt et mye høyere antall levende bakterieceller (Ngo & Man, 2017). En annen studie konkluderte med at rekruttering av både GBP2 og GBP5 var nødvendig for full aktivering av AIM2 inflammasom ved infeksjon med *F. tularensis* (Man et al., 2017). Studier gjort med andre Gram-negative bakterier konkluderer også med at AIM2-avhengig forsvar er GBP stimulert (Etienne Meunier & Broz, 2016). Dette peker mot at GBPs er essensielle i AIM2-avhengig forsvar mot intracellulære infeksjoner med Gram-negative bakterier.

### 1.3 IFN- $\gamma$

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) er et cytokin som spiller en viktig rolle i vertens forsvar mot intracellulære patogener ved å indusere og modulere en rekke immunresponser. IFN- $\gamma$  utskilles først og fremst av NK-celler (natural killer cells) og aktiverte T-celler, og kan fremme makrofagaktivering (Tau & Rothman, 1999). IFN- $\gamma$  har også mange andre funksjoner, blant annet formidling av antibakteriell immunitet, kontrollere cellulær spredning og indusere apoptose (Tau & Rothman, 1999). Cellulære responser på IFN- $\gamma$  formidles av den heterodimeriske celleoverflatereseptor (IFN- $\gamma$ R), som aktiverer nedstrøms signalkaskader som til slutt vil kunne få utslag i regulering av genuttrykk (Tau & Rothman, 1999).

Tidligere studier har vist at IFN- $\gamma$  kontrollerer infeksjonen med *F. tularensis* (LVS) ved å hemme intracellulær bakterievekst (McLendon et al., 2006). Det er dog ikke klart hvordan IFN- $\gamma$  hindrer proliferering av den cytosol lokaliserte bakterien (Wallet et al., 2017). IFN- $\gamma$  primede (celler utsatt for IFN- $\gamma$  før infeksjon) humane og murine benmargsmakrofager ble i en studie infisert med SCHU S4 for å undersøke hvorvidt primingen påvirket infeksjonsforløpet. Resultatene indikerte at primingen ikke påvirket selve utbrytningen fra fagosom postinfeksjon, men begrenset intracellulær formering senere i infeksjonsforløpet for både de humane og murine makrofagene (Edwards, Rockx-Brouwer, Nair & Celli, 2010).

Nyligere studier på *F. novicida* viser at IFN- $\gamma$  induisert gunanilate-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 pyroptose av den infiserte cellen (Wallet et al., 2017). På bakgrunn av disse studiene er det nærliggende å tro at også for vårt forsøk vil priming med IFN- $\gamma$  stimulere til tidligere pyroptose og stagnering i bakterievekst.

#### **1.4 AIM2 – en viktig komponent for bakteriell DNA-deteksjon**

AIM2 detekterer fritt dobbeltrådig DNA i cytosol og inducerer caspase-1 avhengig pyroptose, samt frigjøringen av de inflammatoriske interleukinene IL-1 $\beta$  og IL-18 (E. Meunier et al., 2015) og potenseres ved TLR2 (toll-like reseptor 2)-signalisering (Celli & Zahrt, 2013). Aktivering av AIM2 er derfor kritisk i organismens forsvar mot intracellulære patogener som *F. tularensis*.

Fritt DNA bindes til AIM2 via HIN-200 domene, noe som medfører rekruttering av inflammasomadapteren ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD) (E. Meunier et al., 2015). ASC oligomeriserer og danner komplekset ASC-speck. Det er ASC-speck som aktiverer caspase-1 (E. Meunier et al., 2015).

I en studie gjort med WT-BMDMs døde *F. novicida* infiserte celler på en AIM2-avhengig måte signifikant raskere enn celler uten AIM2. I tillegg viste studiet at celler som også manglet GBP<sup>chr3</sup> gjennomgikk pyroptose enda senere enn celler som bare manglet AIM2 (Wallet et al., 2017). Dette indikerer derfor også at AIM2 avhengig celledød avhenger av GBP.

Aktivering av AIM2 i seg selv er helt nødvendig for vertens forsvar mot *F. tularensis* viser en studie (Jonathan et al., 2010) som sammenlignet infiserte WT-mus mot AIM2<sup>-/-</sup>, caspase<sup>-/-</sup> mus. AIM2<sup>-/-</sup>, caspase<sup>-/-</sup> musene begrenset infeksjonen signifikant dårligere enn WT musene da bakterietallene i lunge, lever og milt var svært forhøyet hos AIM2<sup>-/-</sup>, caspase<sup>-/-</sup> musene 36 timer postinfeksjon i forhold til WT musene.

## 1.5 Caspase-1

Som tidligere nevnt medfører AIM2 aktivering induksjon av caspase-1 avhengig pyroptose av den infiserte cellen. Caspaser er en familie av intracellulære cytein proteaser som blant annet spiller en viktig rolle intracellulært forsvar mot patogener (Franchi, Eigenbrod, Muñoz-Planillo & Nuñez, 2009). Aktivt caspase-1 promoterer modning og frigjøring av de pro-inflammatoriske interleukinene IL-1 $\beta$  og IL-18 (E. Meunier et al., 2015). Som tidligere nevnt medfører dette pyroptose og dermed hindrer videre bakterieformering. IL-1 $\beta$  deltar i flere immunresponser, blant annet rekruttering av andre inflammatoriske celler til infeksjonsstedet, mens IL-18 er essensiell for produksjonen av IFN- $\gamma$  (Franchi et al., 2009).

Pyroptose i likhet med apoptose er en form for kontrollert celledød, men i motsetning til apoptose er pyroptose iboende inflammatorisk (Bergsbaken, Fink & Cookson, 2009). Pyroptose skiller seg også fra apoptose ved at pyroptose er casepase-mediert (Bergsbaken et al., 2009). Ved pyroptose vil heller ikke cellens innhold pakkes i vesikler og fagocyteres, men punktering av cellemembranen og lekkasje av pro-inflammatorisk celleinnhold (Bergsbaken et al., 2009).

## 2. Materiale og metode

### 2.1 Cellekultur

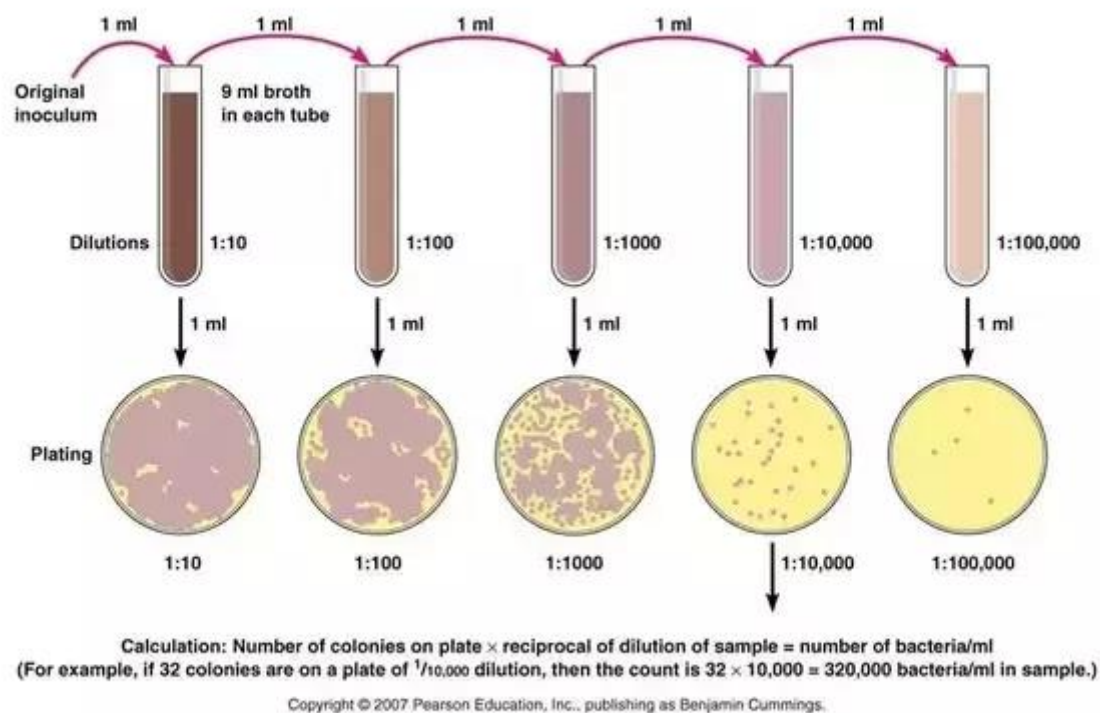
Differensierte benmargs-deriverte murine makrofager (BMDMs) fra mus (C57BL/6) ble kultivert i DMEM i tillegg til 10% (vol/vol) varmeinaktiverte FBS (føtalt bovine serum) av L929 musefibroblast supernatant, og 10mM L-glutamin. En dag før infeksjon ble de differensierte BMDMs sådd i 6-, eller 96-brønnplater med  $2 \cdot 10^6$ , eller  $2 \cdot 10^5$  antall celler pr. brønn. I noen av brønnene ble 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IFN- $\gamma$  tilsatt. Bakterier (LVS, *F. novicida* og SCHU S4) ble kultivert over natt ved 37°C på MC-plater.

### 2.2 Infeksjon av BMDMs

Makrofagkulturer ble infisert med *F. tularensis* strains ved 500-100 MOI (multiplicity og infection) avhengig av eksperimentet. Cellene ble inkubert i to timer ved 37°C og 5% CO<sub>2</sub>. I ettertid ble cellene vasket to ganger med FBS-fritt DMEM og 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gentamicin ble tilsatt for å drepe ekstracellulære bakterier, for så å bli inkubert i 45 minutter ved de samme betingelsene som før. Etter inkubering ble cellene igjen vasket med FBS-fritt DMEM og tilsatt komplett vekstmedium. I brønnene med celler pre-inkubert med IFN- $\gamma$  ble komplett medium med 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  IFN- $\gamma$  tilsatt.

### 2.3 Bestemmelse av bakterieantall

*F. tularensis* subsp. infiserte celler ble etter 8 timer postinfeksjon (T<sub>0</sub>) lysert med 0.1% deoxycholat og fortynnet i serier og sådd ut på MC plater ved hjelp av sterile glasskuler for jevn distribusjon av lysatet. Antall bakteriekolonier ble fastsatt etter 48-72 timer.



Figur 3: Seriefortynning ble gjort slik som sett i illustrasjonen.

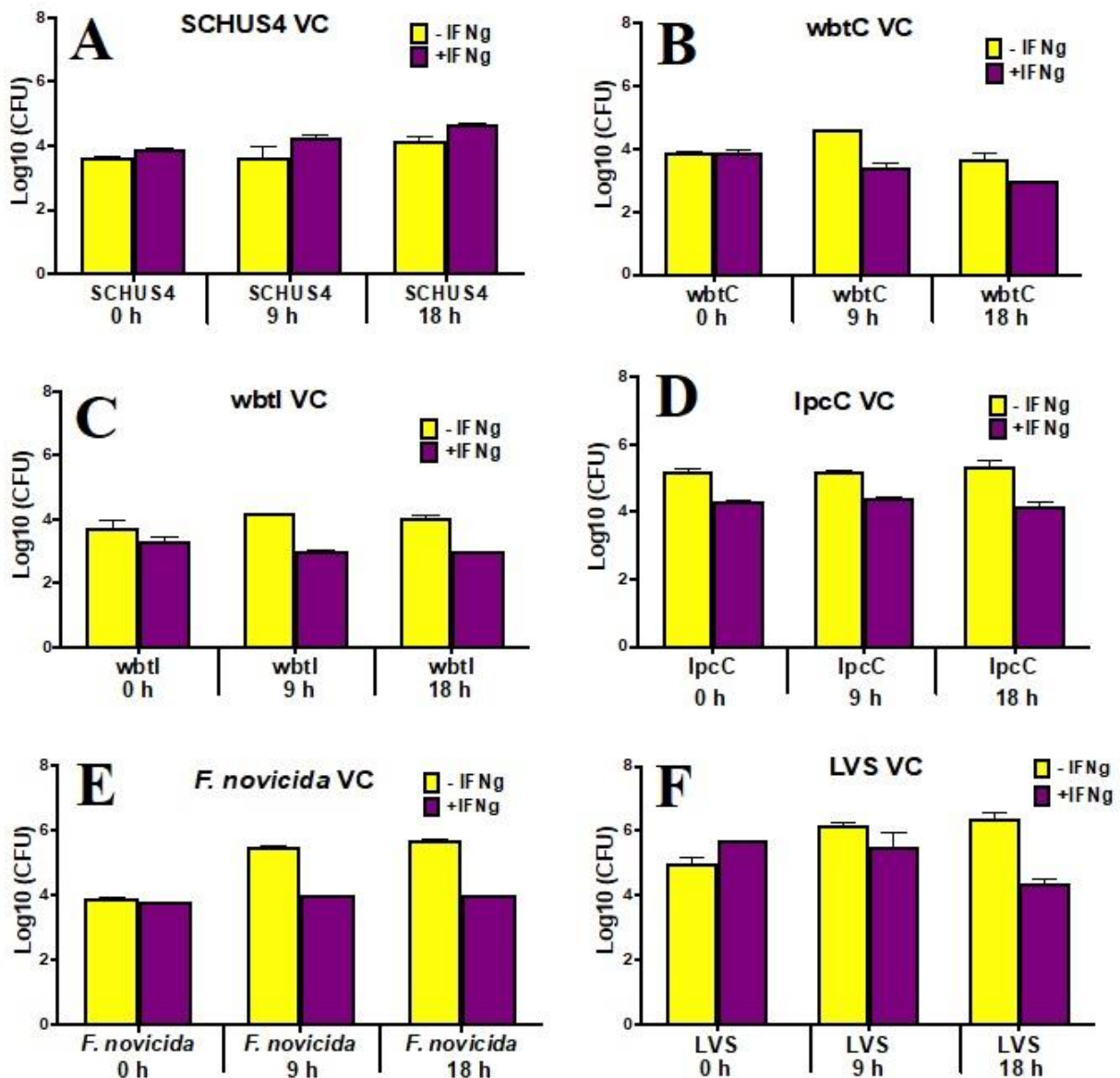
## 2.4 Immunoblot analyse

Brønnene ble vasket med avkjølt PBS (fosfatbufret saline) og lysesbuffer ble tilsatt til hver brønn. Lysatet ble resuspendert i SDS (sodium dodecyl sulfate) prøvebuffer og kokt ved  $90^{\circ}\text{C}$  i 5 minutter for deretter å bli analysert med 12% PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis). Western blot ble så utført med polyklonalt kanin anti-GBP5 fra proteintech.. Lysatet ble probet med monoklonalt anti-GAPDH fra invitrogen (Thermo Fisher Scientific) som loadingkontroll. Det sekundære antistoffet var konjugert HRP (horseradish peroxidase). For kvantitativ analyse av proteinbånd ble Amersham imager 600 benyttet.

### 3. Resultater

#### 3.1 Viabilitetstesting

For å vurdere hvorvidt IFN- $\gamma$  kunne kontrollere intracellulær bakterieformering ble det foretatt bestemmelse av intracellulært bakterieantall. Hver strain ble vurdert i serier på tre, med eller uten eksponering for IFN- $\gamma$  og ved tre forskjellige tidspunkt (0t, 9t og 18t).



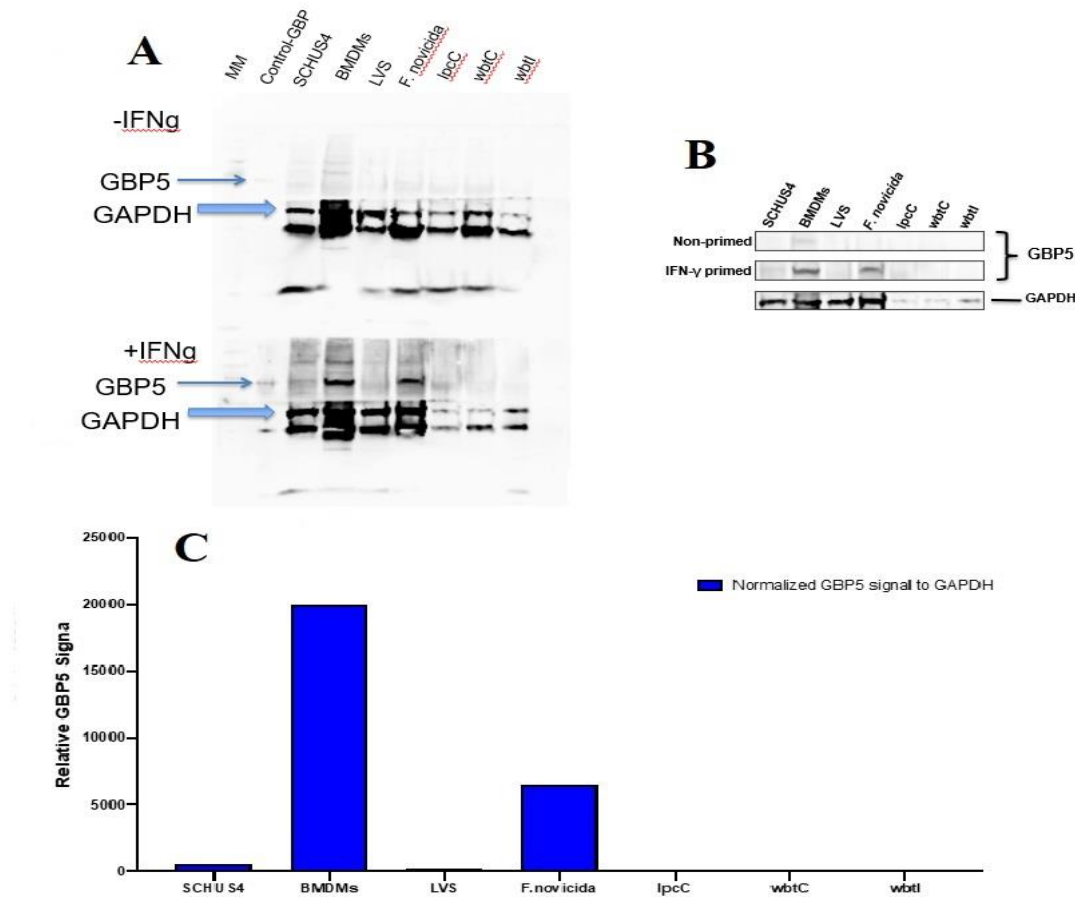
Figur 4: (A-F) Intracellulær vekst ble vurdert ved å determinere antall c.f.u som ble bestemt ved å telle kolonier fra lyserte makrofager infisert med *F. tularensis* subspecies. Antallet viable bakterier ble utregnet i duplikater for hvert tidspunkt. Gule søyler illustrer resultater fra celler som ikke ble primet med IFN- $\gamma$ , mens lilla søyler illustrer resultatene for celler som ble primet med 100 $\mu$ g/mL IFN- $\gamma$  (A-F).



Viabilitetstesting for *lpcC* viser et noe lavere bakterieantall ved IFN- $\gamma$  priming enn for *lpcC*-infiserte celler som ikke ble primet med IFN- $\gamma$ . De samme tendensene ses også for celler infisert med *wbtI*, *wbtC* og *F. novicida*. Celler infisert med LVS hadde høyere bakterieantall for IFN- $\gamma$  primede celler ved T<sub>0</sub>, men viser en reduksjon ved T<sub>9</sub> og T<sub>18</sub>. SCHUS4 infiserte celler derimot viser økning i bakterieantall ved IFN- $\gamma$  priming. Oppsummert viser resultatene at IFN- $\gamma$  primede celler trolig gir lavere bakterieantall for *lpcC*, *wbtI*, *wbtC* og *F. novicida*, men ikke for SCHUS4 som derimot viste en økning.

### 3.2 Western blot analyse for GBP5

Den ene av våre problemstillinger gikk ut på å undersøke hvilken rolle GBP5 spiller i intracellulær infeksjon med *F. tularensis* og hvorvidt IFN- $\gamma$  påvirker uttrykket av GBP5. For å få frem dette ble det kjørt Western blot analyse for alle de forskjellige subspecies, med og uten IFN- $\gamma$  priming. I tillegg ble wtBMDMs analysert for å undersøke hvordan en «frisk» celle vil reagere.



*Figur 5: (A-B) Westernblot for GBP5 ved intracellulær infeksjon med F. tularensis subspecies. GAPDH, et husholdningsgen ble benyttet som loadingkontroll og for normalisering av signalintensitet. Amersham Imager 600 ble brukt for kvantitativ analyse av proteinbånd*

Westernblot for GBP5 påviser GBP5 ved IFN- $\gamma$  priming for uinfiserte BMDMs og celler infisert med *F. novicida*. GBP5 påvises også, dog noe svakere for celler infisert med SCHUS4 og LVS. Det detekteres ikke GBP5 i celler infisert med *lpcC*, *wbtC* og *wbtI* for verken uprimede eller primede celler. Kontroll for GBP5 og loadingkontroll var positiv. Oppsummert viser resultatene at GBP5 induseres hos uinfiserte wtBMDMs og celler infisert med *F. novicida* og SCHU S4 (svakt), men ikke hos LPS mutantene.

## 4. Diskusjon

### 4.1 Viabilitet

Ved viabilitetstesting observeres en reduksjon i bakterieantall for IFN- $\gamma$  primede BMDMs infisert med *F. novicida* sammenlignet med ikke-primede celler. Lignende resultater ses også for LVS, *lpcC*, *wbtC* og *wbtI*. For primede celler infisert med SCHUS4 observeres ikke en slik reduksjon i bakterieantall. Dette betyr at IFN- $\gamma$  alene ikke er nok til å kontrollere en infeksjon med SCHUS4, men kan bidra til å kontrollere spredning av *F. novicida*. Dette stemmer også overens med funn fra lignende studier diskutert tidligere.

Resultatene for SCHU S4 LPS mutantene er som forventet da bakteriell LPS er en viktig virulensfaktor. Da LPS ikke er intakt for disse mutantene forventes det at de ikke reagerer på samme måte som for SCHU S4. Årsaken til at vi i det hele tatt velger å analysere LPS-mutantene er at de mulig binder seg til GBP på en annen måte en SCHU S4 og dermed fremtrer slik de gjør i våre resultater.

### 4.2 Western blot

Basert på resultatene fra Western blot observeres det sterk induksjon av GBP5-nivåene i IFN- $\gamma$  primede uinfiserte celler, samt i primede og infiserte celler med *F. novicida* eller SCHUS4. Signalene for LVS infiserte og primede celler er så svake at det kan tilnærmes til ingen induksjon av GBP5.

Selv om viabilitetstesting for SCHUS4 viser at IFN- $\gamma$  tilsynelatende ikke kan kontrollere intracellulær bakterievekst, påvises likevel GBP5 i Western blot. Dette forslår at selv om GBP5 stimuleres av IFN- $\gamma$ , spiller ikke det nødvendigvis en signifikant rolle for vertens forsvar mot SCHUS4. For de LPS muterte versjonene av SCHUS4 (*lpcC*, *wbtC* og *wbtI*) ble bakterieveksten begrenset av priming med IFN- $\gamma$ , men ved Western blot analyse ble ingen signaler for GBP5 observert. På bakgrunn av dette er det trolig andre mekanismer utenom GBP5 som spiller inn i begrensingen av infeksjoner med disse LPS mutantene. Hvilke mekanismer dette kan være er usikkert og krever videre arbeid.

På tross av at Western blotting er en relativt enkel metode, er det flere aspekter ved metoden som kan påvirke resultatene og hvordan de bearbeides. Det er mange variabler som skal stemme for et godt resultat. Alt fra hvilken volt og hvor lang tid en kjører elektroforese, til hvilke antistoffer og eksponeringsmetode en benytter kan påvirke hvordan resultatene fremstår. Gjennom systematisk utprøving har en kommet frem til hvilke forhold som er gunstige. Svake signaler kan eksempelvis forekomme av lav konsentrasjon av antigen eller antistoff (Mahmood & Yang, 2012). For våre resultater ser en eksempelvis svake bånd for størrelsesmarkøren. Eksponeringsmetode kan også ha noe å si for hvordan resultatene fremstår. I dette tilfelle ønsker vi å fremheve resultatene for GAPDH og GBP5 fremfor størrelsesmarkøren og har dermed valgt forhold som best fremhever disse resultatene.

## 5. Konklusjoner og videre arbeid

Som tidligere nevnt ønsket vi for det første å undersøke hvilken rolle guanylat-bindende proteiner (GBPs), henholdsvis GPB5, spiller i intracellulær infeksjon med *Fransicella tularensis* subspecies. For det andre ville vi se på hvorvidt priming med interferon- $\gamma$  vil påvirke intracellulær bakterieformering og nivåene av GPB5 i de infiserte cellene. Situasjonen rundt Covid-19 vanskeliggjorde gjennomføring av prosjektet, men vi har likevel klart å komme frem til noen konklusjoner.

### 5.1 Konklusjoner

Ut ifra resultatene og våre evalueringer kan vi oppsummere med at uttrykket av GPB5 kan induseres av IFN- $\gamma$  og at IFN- $\gamma$  induisert kontroll av *F. novicida* er avhengig av GPB5. I forhold til den høyvirulente SCHU S6 konkluderes det med at IFN- $\gamma$  alene kan ikke kontrollere spredningen av SCHUS4 ved infeksjon i wtBMDMs og at IFN- $\gamma$  induisert kontroll av LVS- og LPS-mutanter kanskje ikke er avhengig av GPB5, men at det mest sannsynlig finnes en alternativ IFN- $\gamma$ -avhengig vei for å kontrollere bakterievekst.

### 5.2 Videre arbeid

På bakgrunn av våre konklusjoner kan resultatene fra dette prosjektet fungere som et tilskudd i jakten på vert-kontroll ved infeksjon med *F. tularensis* og *F. novicida*. I videre arbeid vil det være gunstig å undersøke uttrykket av AIM, caspase-1 og andre GBPs, spesielt GPB2. Ideelt sett skulle disse aspektene også ha vært arbeidet med, men pga. situasjonen rundt pandemien med Covid-19 vil disse punktene utsettes til en annen anledning. Å undersøke uttrykket av disse andre inflammasomene vil være nødvendig for å forstå samspillet og avhengigheten av hverandre i forsvarskaskaden mot intracellulære patogener.

Et annet interessant aspekt å jobbe videre med vil være å forstå hvilke IFN- $\gamma$  induserte forsvarsmekanismer som er involvert for *lpcC*, *wbtI* og *wbtC* som viste hemmet bakterievekst selv om ikke GPB5 ble påvist.

For å oppnå en dypere forståelse kan det også være gunstig å ta i bruk et spekter av andre metoder. Dette kan være metoder som fluorescens, elektronmikroskop og modifiserte celler. Ved å påvise mekanismer på flere måter kan en oppnå en mer kompleks forståelse ikke bare for forsvarsmekanismer, men også for hvordan infeksjonen arter seg i ulike celler. Ved å benytte celler modifisert for å inneha eller ikke inneha en mekanisme kan en illustrere hvorvidt deler av infeksjonsforsvaret avhenger av hverandre for et vellykket forsvar. I tillegg vil det alltid stå sentralt å hele tiden optimalisere forholdene for å oppnå best mulige resultater.

## 6. Litteraturliste

- Bakshi, C. S., Malik, M., Mahawar, M., Kirimanjeswara, G. S., Hazlett, K. R. O., Palmer, L. E., ... Metzger, D. W. (2008). An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine*, 26(41), 5276-5288. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.051>
- Bergsbaken, T., Fink, S. L. & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2), 99-109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Celli, J. & Zahrt, T. C. (2013). Mechanisms of *Francisella tularensis* intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(4), a010314. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010314>
- Edwards, J. A., Rockx-Brouwer, D., Nair, V. & Celli, J. (2010). Restricted cytosolic growth of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* by IFN-gamma activation of macrophages. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 2), 327-339. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031716-0>
- Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M. & Titball, R. W. (2002). Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 631-646. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.631-646.2002>
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R. & Nuñez, G. (2009). The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol*, 10(3), 241-247. <https://doi.org/10.1038/ni.1703>
- Geier, H. & Celli, J. (2011). Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infection and immunity*, 79(6), 2204-2214. <https://doi.org/10.1128/IAI.01382-10>
- Hayes, J., Wormald, M., Rudd, P. & Davey, G. (2016). Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *Journal of Inflammation Research*, 9, 209-219. <https://doi.org/10.2147/JIR.S121233>

- Jonathan, W. J., Nobuhiko, K., Petr, B., Thomas, H., Kim, N., Karen, O. R., ... Denise, M. M. (2010). Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(21), 9771. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003738107>
- Li, H., Yao, X.-Q. & Grant, B. (2017). Comparative Structural Dynamic Analysis of GTPases. *Biophysical Journal*, *112*(3), 354a-354a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.11.1918>
- Mahmood, T. & Yang, P.-C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429-434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- 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>
- Meunier, E. & Broz, P. (2016). Interferon-inducible GTPases in cell autonomous and innate immunity. I(Vol. 18, s. 168).
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R. F., Costanzo, S., Anton, L., Ruhl, S., ... Broz, P. (2015). Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol*, *16*(5), 476-484. <https://doi.org/10.1038/ni.3119>
- 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>
- Oliveira-Nascimento, L., Massari, P. & Wetzler, L. (2012). The role of TLR2 in infect on and immunity. *Front. Immunol.*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00079>



Strelkauskas, A., Edwards, A., Fahnert, B., Pryor, G. & Strelkauskas, J. (2016). *Microbiology a clinical approach* (Second. utg.). New York, USA: Garland Science, Taylor & Francis Group.

Sung, M. W., Watts, T. & Li, P. (2012). Crystallographic characterization of mouse AIM2 HIN-200 domain bound to a 15 bp and an 18 bp double-stranded DNA. *Acta Crystallographica Section F*, 68(9), 1081-1084.

<https://doi.org/10.1107/S174430911203103X>

Tau, G. & Rothman, P. (1999). Biologic functions of the IFN- $\gamma$  receptors. *Allergy*, 54(12), 1233-1251. <https://doi.org/10.1034/j.1398-9995.1999.00099.x>

Twine, S. M., Vinogradov, E., Lindgren, H., Sjostedt, A. & Conlan, J. W. (2012). Roles for wbtC, wbtI, and kdtA Genes in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Protein Glycosylation, Virulence, and Immunogenicity in *Francisella tularensis*2 Strain SCHU S4. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 1(1), 12-29.

<https://doi.org/10.3390/pathogens1010012>

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>

## 7. Definisjoner

**CFU:** Colony forming unit. Benyttes f.eks. for å beregne bakterieantall i løsninger.

**Ciprofloxacin:** Et antibiotikum.

**Enzymkoblet immunosorbentanalyse:** F.eks. ELISA. Metode som benyttes for detektering av antigener ved hjelp av antistoffer.

**Fagocyterende reseptor:** Profesjonelle fagocytter som f.eks. makrofager uttrykker disse reseptorene og kan ved hjelp av dem gjenkjenne patogener (Geier & Celli, 2011)

**Fc $\gamma$ -reseptor:** Membranbundne glykoproteiner som overleverer informasjon detektert og samlet av antistoffer til immunsystemet. Reseptorene fungerer dermed som en kobling mellom det medfødte og det adaptive immunsystemet (Hayes, Wormald, Rudd & Davey, 2016).

**Gentamicin:** Et antibiotikum.

**GTPase:** Guanosine Triphosphate Phosphohydrolases omfatter en superfamilie av GTP-bindende proteiner med GTPase-aktivitet (Li, Yao & Grant, 2017).

**HIN200-domene:** Finnes på C-terminal av AIM2 og kjenner igjen mikrobielt DNA (Sung, Watts & Li, 2012)

**PCR:** Polymerase-chain-reaction. Benyttes for å amplifisere en bestemt DNA-sekvens.

**Pneumonisk tularemi:** En mer alvorlig form for tularemi der alvorlig pneumoni (lungebetennelse) er hovedfunn ved sykdom ((Ellis et al., 2002)

**Streptomycin:** Et antibiotikum.

**Tetracyklin:** Et antibiotikum.

**TLR2:** Toll-like reseptorer er gjenkjennelsesmolekyler for flere patogener inkludert bakterier, virus, sopp og parasitter. TLR2 danner heterodimer med TLR1 og TLR6, som er et initialiserende steg i en kaskade av reaksjoner som leder til en immunrespons (Oliveira-Nascimento, Massari & Wetzler, 2012).

**Ulceroglandular tularemi:** En mindre dødelig og vanlig form for tularemi der byller/hovne lymfeknuter, forkjølelssymptomer og betente sår som vedvarer over lang tid er hovedfunn ved sykdom (Ellis et al., 2002)