

Utjecaj citokalasina D na ulazak bakterija Legionella pneumophila i Francisella novicida u amebu Dictyostelium discoideum

Nora, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:184:334553>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNO INŽENJERSTVO**

Valerija Nora

**UTJECAJ CITOKALASINA D NA ULAZAK BAKTERIJA *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA I *FRANCISELLA NOVICIDA* U AMEBU *DICTYOSTELIUM*
*DISCOIDEUM***

Završni rad

U Rijeci, 2016.

**SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
SANITARNO INŽENJERSTVO**

Valerija Nora

**UTJECAJ CITOKALASINA D NA ULAZAK BAKTERIJA *LEGIONELLA*
PNEUMOPHILA I *FRANCISELLA NOVICIDA* U AMEBU *DICTYOSTELIUM*
*DISCOIDEUM***

Završni rad

U Rijeci, 2016.

Mentor rada: prof. dr. sc. Marina Šantić

Završni rad obranjen je dana _____ u/na

_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 30 stranica, 5 slika, 1 tablicu, 37 literaturnih navoda.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Marini Šantić na temi i savjetima tijekom izrade ovog završnog rada.

Također se zahvaljujem osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci na pomoći pri izradi ovog završnog rada, a osobito dr.sc. Mateji Ožanič.

Na kraju veliko hvala mojoj obitelji na podršci i omogućavanju pohađanja ovog studija na Medicinskom fakultetu u Rijeci.

SAŽETAK

Legionella pneumophila je gram-negativna aerobna bakterija koja pripada porodici *Legionelaceae*. Legionele su rasprostranjene posvuda u prirodi, a osobito su rasprostranjene u vodenom okolišu. Sposobnost preživljavanja u protozoama im omogućuje preživljavanje u nepovoljnim uvjetima. *L. pneumophila* uzrokuje blaži febrilni oblik bolesti, pontijačku groznicu te teži oblik bolesti, atipičnu pneumoniju koja se po američkim legionarima naziva legionarska bolest. *Francisella tularensis* je gram-negativna i asporogena bakterija koja pripada porodici *Franciselaceae*. U porodicu *Franciselaceae* pripada samo rod *Francisella* koji uključuje sljedeće vrste: *F. tularensis*, *F. hispaniensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis* i *F. novicida*. *F. tularensis* dijeli se na tri podvrste *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A) i *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) uzrokuju bolest kod čovjeka, dok se *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* pokazalomanje virulentnom. *F. tularensis* subsp. *tularensis* je visoko virulentna bakterija, a zbog lakog prenošenja zrakom i vrlo niske infektivne doze, smatra se i potencijalnim biološkim oružjem. Donedavno se četvrtom podvrstom smatrala i *novicida*, ali ona je ipak svrstana u zasebnu vrstu. *F. novicida* je avirulentna za čovjeka, a uzrokuje bolest samo kod imunokompromitiranih. Cilj ovog rada bio je pratiti mehanizam ulaska unutarstaničnih bakterija *L. pneumophila* i *F. novicida* u *D. discoideum*. Također, željeli smo utvrditi ovisi li učinak citokalasin D o njegovoj koncentraciji. Citokalasin D je alkaloid gljiva koji depolimerizira aktinski filament na način da se veže za jedan njegov kraj i tako blokira njegov daljnji rast pa se zbog toga naziva inhibitor polimerizacije aktinskih niti. Kinetika rasta i razmnožavanja bakterija *L. pneumophila* i *F. novicida* u amebama *D. discoideum* tretiranim citokalasinom D praćena je u periodima od 1, 5, 24 i 48 sati nakon infekcije. Broj unutarstaničnih bakterija određivan je nasađivanjem desetorostrukih razrijeđenja na BCYE podlogu. Naši rezultati pokazuju da se bakterije *F. novicida* i *L.*

pneumophila uspješno razmnožavaju i preživljavaju u amebi *D. discoideum*. Broj bakterija *F. novicida* u amebama doseže maksimum u periodu od 48 sati nakon infekcije. Međutim, rezultati su pokazali kako dodatak citokalasin D, kao ni njegova koncentracija, nema utjecaj na rast bakterija *F. novicida* i *L. pneumophila* u amebi *D. discoideum*.

Ključne riječi: *F. novicida*, *L. pneumophila*, citokalasin D, *D. discoideum*

SUMMARY

Legionella pneumophila is a gram-negative aerobic bacteria which belong to the family *Legionelaceae*. *Legionella* is ubiquitous in the nature, and is particularly widespread in the aquatic environment. The ability to survive in protozoa allows the bacterium to survive in unfavorable conditions. *L. pneumophila* causes a milder form of febrile disease, pontiac fever and severe form of the disease, atypical pneumonia, which is called legionnaires' disease. *Francisella tularensis* is a gram-negative bacteria which belongs to the family *Franciselaceae*. The family *Franciselaceae* contains only genus *Francisella* which includes the following subspecies: *F. tularensis*, *F. hispaniensis*, *F. philomiragia*, *F. noatunensis* and *F. novicida*. *F. tularensis* is divided into three subspecies of *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) and *F. tularensis* subsp. *mediastatica*. *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) cause disease in humans, while *F. tularensis* subsp. *mediastatica* showed to be less virulent. *F. tularensis* subsp. *tularensis* is a very virulent bacterium, and because of a very low infection dose and airborne transmission, is considered a potential biological weapon. Until recently, the fourth subspecies considered *novicida*, but it is still classified as a separate species. *F. novicida* is the avirulent bacteria that causes disease only in immunocompromised. The aim of this study was to monitor the entry and growth of bacteria *F. novicida* and *L. pneumophila* in *Dictyostelium discoideum* cells after treatment with cytochalasin D. Also, we wanted to determine whether the concentration of cytochalasin D has an influence on number of intracellular bacteria. Cytochalasin D, an alkaloid fungi depolymerize actin filaments in a way that it binds to one end and thereby blocks its further growth and thus is referred to as a polymerization inhibitor of actin filaments. The kinetics of growth and reproduction of bacteria *L. pneumophila* and *F. novicida* in amoeba *D. discoideum* treated with cytochalasin D is followed by a period of 1, 5, 24 and 48 hours after infection. Number

of intracellular bacteria was determined by seeding tenfold dilutions on BCYE surface. Our results show that the bacteria *F. novicida* and *L. pneumophila* successfully survive and replicate in amoeba *D. discoideum*. The number of bacteria *F. novicida* within the amoeba reaches maximum in the period of 48 hours after infection. However, the results showed that the addition of cytochalasin D, as well as its concentration, has no impact on the growth of *F. novicida* and *L. pneumophila* in amoeba *D. discoideum*.

Key words: *F. novicida*, *L. pneumophila*, cytochalasin D, *D. discoideum*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. <i>Legionella</i>	1
1.1.1. Rod <i>Legionella</i>	1
1.1.2. <i>Legionella pneumophila</i>	1
1.1.3. Epidemiologija	1
1.1.4. Pontijačka groznica i legionarska bolest	3
1.1.5. Prevencija	4
1.2. <i>Francisella</i>	4
1.2.1. Rod <i>Francisella</i>	5
1.2.2. <i>Francisella novicida</i>	5
1.2.3. Epidemiologija	6
1.2.4. Tularemija	6
1.2.5. Prevencija	7
1.4. Unutarstanični život <i>L. pneumophila</i>	8
1.5. Unutarstanični život <i>F. tularensis</i>	9
1.5.1. Ulazak <i>F. tularensis</i> u stanicu domaćina	9
1.5.2. Unutarstanični život <i>F. tularensis</i> u stanicama makrofaga	10
1.5.3. Unutarstanični život <i>F. tularensis</i> u stanicama ameba	10
1.6. <i>Dictyostelium discoideum</i> kao model za ulazak bakterija u stanicu	11
1.6.1. Životni ciklus <i>D. discoideum</i>	11
1.6.2. Genom <i>D. discoideum</i>	13
2. CILJ RADA	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. Bakterijski sojevi	16
3.2. Hranjive podloge	16
3.3. Citokalsin D	16
3.4. Infekcija <i>D. discoideum</i> s <i>F. novicida</i> i <i>L. pneumophila</i>	17
4. REZULTATI	19

4.1.	Kinetika rasta <i>F. novicida</i> u <i>D. discoideum</i> nakon tretmana sa citokalasinom D u koncentracijama 1 µg/mL i 2 µg/mL.....	19
4.2.	Kinetika rasta <i>L. pneumophilae</i> u <i>D. discoideum</i> nakon tretmana s citokalasinom D u koncentracijama 1 µg/mL i 2 µg/mL.....	20
5.	RASPRAVA	23
6.	ZAKLJUČAK	26
7.	LITERATURA	27

1. UVOD

1.1. *Legionella*

1.1.1. Rod *Legionella*

Bakterija je gram-negativni aerobni bacil koji od 1979.godine pripada porodici *Legionellaceae*. Rod *Legionella* je jedini u toj porodici. Do danas je otkriveno više od 50 vrsta legionela. Oko 90% slučajeva humanih infekcija uzrokuje *Legionella pneumophila*, a po učestalosti slijede *Legionella micdadei* (6%) i *Legionella bozemanii* (3%) [35].

1.1.2. *Legionella pneumophila*

L. pneumophila ima aeroban, kemoorganotrofan metabolizam, iako neke vrste rastu bolje u atmosferi uz prisutnost 1-5% CO₂. Genom bakterije sadrži 39% gvanina i citozina. Zbog specifičnih zahtjeva rasta, *Legionella* ne raste na uobičajenim hranjivim podlogama kao što je krvni agar. Porodicu *Legionellaceae* karakterizira potreba za L-cisteinom i željeznim solima.

Legionele su ubikvitarne u prirodi, a osobito su rasprostranjene u vodenom okolišu. Također, imaju sposobnost preživljavanja u protozoama što im omogućava preživljavanje u nepovoljnim uvjetima [35]

1.1.3. Epidemiologija

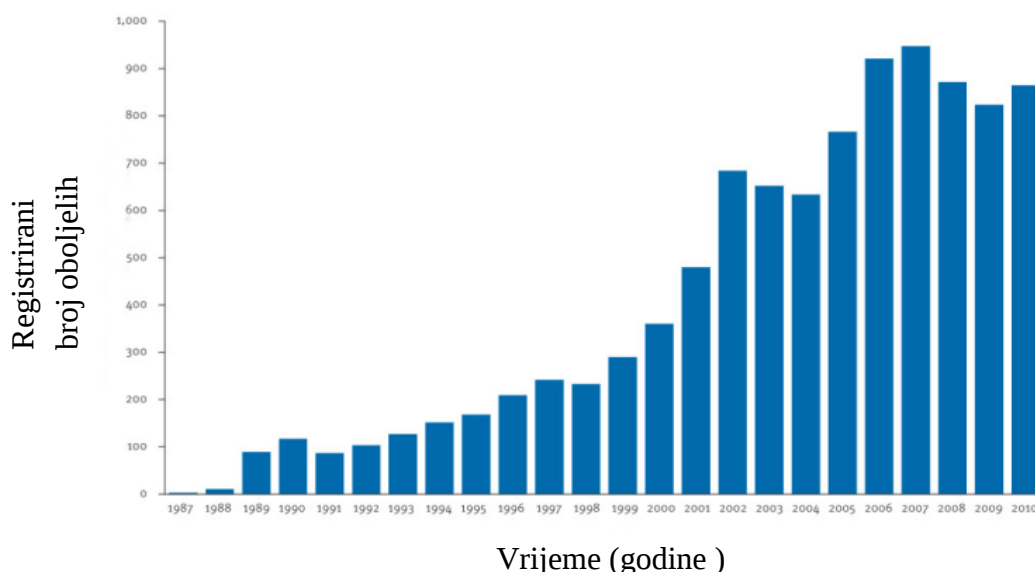
Zbog sposobnosti preživljavanja u kloriranoj vodi, *L. pneumophila* preživljava u vodenim ekosustavima i putem inficiranog aerosola uzrokuje bolest. Bolest se ne prenosi s čovjeka na čovjeka. *L. pneumophila* preživljava široki raspon temperatura (0-63°C), a optimalna temperatura za njezino razmnožavanje je oko 37°C [35].

Legionella se na čovjeka prenosi putem inficiranog aerosola pa se u početku bolest uzrokovana tom bakterijom povezivala samo s epidemijama putnika, odnosno gostiju različitih hotela. Međutim, danas je opće poznato da su puno češći i opasniji sporadični slučajevi koji nastaju u vlastitom domu s obzirom na slabu kontrolu temperature vode[1].

Od legionarske bolesti mogu oboljeti ljudi oba spola i svih dobnih skupina. Međutim, u rizične skupine ubrajamo osobe starije životne dobi, imunokompromitirani i osobe koje puše ili često konzumiraju alkohol.

U Hrvatskoj se legionarska bolest uglavnom javlja sporadično u ljetnim mjesecima (od srpnja do rujna), čemu pridonose povoljni uvjeti za razmnožavanje bakterija (klima – uređaji, bazeni, tuševi, itd.)[2].

L. pneumophila je jedan od najčešćih uzročnika pneumonija u općoj populaciji. Izuzetak je *L. longobeache* koja se u epidemijskom obliku pojavljuje endemski, samo u Australiji [35].



Slika 1. Učestalost legionarske bolesti u Europi od 1987. do 2010. godine
 Na slici se može uočiti nagli porast broja oboljelih ulaskom u 21.stoljeće te to možemo povezati s čestim putovanjima ljudi i boljom prometnom povezanosti gradova. Do 2007.godine se uglavnom radi o porastu broja oboljelih, dok nakon 2007.godine broj oboljelih se smanjuje te u 2010.godini on iznosi 864. Međutim, to se može povezati s prevencijom i kontrolom temperature vodenih sustava u hotelima. Izvor: I.Kuzman-Legionarska bolest

1.1.4. Pontijačka groznica i legionarska bolest

L.pneumophila kod čovjeka uzrokuje dva oblika bolesti. Lakši oblik je pontijačka groznica, bolest nalik gripi bez upale pluća. Javljaju se opći simptomi (povišena tjelesna temperatura, glavobolja te bolovi u mišićima i zglobovima) i vrlo blagi simptomi dišnog sustava. Bolest traje oko tjedan dana, a liječenje je simptomatsko. Teži oblik je legionarska bolest s pneumonijom, odnosno atipična pneumonija. Nakon inkubacije koja traje do 10 dana, javlja se jaki suhi kašalj, bolovi u grudnom košu te vrlo visoka tjelesna temperatura s tresavicom. Uz atipičnu upalu pluća, javljaju se i probavne smetnje (dijareja, mučnina, povraćanje i grčevi u trbuhu). Za razliku od pontijačke groznice, legionarska bolest zahtijeva liječenje antibioticima [35].

1.1.5. Prevencija

Budući da ne postoji profilaksa bolesti, važnost se pridaje prevenciji. Kod prevencije je nužno konstantno nadzirati izvore aerosola. Kontrola epidemije u hotelima postiže se najčešće grijanjem vodenih sustava na temperaturu od 55 do 75°C i hiperkloriranjem[3]. Temperatura hladne vode ne smije biti iznad 20°C, a temperatura tople mora biti viša od 46°C. Hiperkloriranje i obrada ozonom se također koristeu prevenciji legioneloze [35].

Također, preporuča se korištenje cjevovoda sa što manje račvi kako bi se spriječilo razmnožavanje legionele. Važnost se pridaje i odabiru materijala od kojeg su izrađene cijevi. Prednost treba dati cijevima od polimernih materijala jer su tada stjenke cijevi glatke. Vrlo je važno u cijevima održavati stalni protok vode, kako ne bi bilo mrtvih kutova u kojima bi se mogla zadržavati voda. U prevenciji bolesti, nužna je redovita provjera i čišćenje spremnika tople vode te kontrola ispravnosti vode.

U slučaju epidemije, potrebno je provesti epidemiološki nadzor. Provodi se detaljna analiza izvora infekcije kao i puteva širenja zaraze. S obzirom da se bolest ne prenosi direktnim kontaktom s čovjeka na čovjeka, bolesnika nije potrebno izolirati [2].

1.2. *Francisella*

Francisella tularensis je mala, gram-negativna, nepokretna i asporogena bakterija. Posjeduje sposobnost razmnožavanja u različitim fagocitnim i nefagocitnim stanicama. *F.tularensis* je vrlo virulentna bakterija. Infektivna doza ovisi o putu ulaska mikroorganizma u organizam, a najniža infektivna doza je prilikom respiratornog puta infekcije (oko 10 bakterija). Bakterija ostaje virulentna na različitim staništima (blato, voda, leševi životinja) i na niskim temperaturama, a liofilizirana na -70°C može zadržati virulenciju godinama [35].

1.2.1. Rod *Francisella*

Tablica 1. Taksonomija unutar roda *Francisella*

Rod	Vrsta	Podvrsta
<i>Francisella</i>	<i>tularensis</i>	<i>tularensis</i>
		<i>holarctica</i>
		<i>mediasiatica</i>
	<i>novicida</i>	
	<i>hispaniensis</i>	
	<i>philomiragia</i>	
	<i>noatunensis</i>	<i>noatunensis</i>
		<i>orientalis</i>

Porodica *Franciselaceae* sadrži samo jedan rod, rod *Francisella* koji uključuje sljedeće vrste: *F.tularensis*, *F. hispaniensis*, *F.philomiragia*, *F. noatunensis* i *F. novicida*. Vrsta *F. tularensis* je najznačajnija za humanu medicinu i dijeli se u tri podvrste: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A), *F. tularensis* subsp. *holarctica* (tip B) i *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. *F. noatunensis* je povezana s vodenim organizmima, a dijeli se na dvije podvrste: *F. noatunensis* subsp. *noatunensis* i *F. noatunensis* subsp. *orientalis* (Tablica 1.) [4].

1.2.2. *Francisella novicida*

F. novicida je u povijesti pripadala podvrsti *F. tularensis* zbog 97%-tne genske sličnosti. Međutim, istraživanja su kasnije pokazala da postoje bitne razlike između *F.tularensis* i *F.novicida* te se sada *F.novicida* smatra zasebnom vrstom [4, 5]. *F. novicida* nije

patogena za čovjeka, no može uzrokovati simptome bolesti kod imunokompromitiranih osoba. Iako avirulentna za čovjeka, *F. novicida* ima sposobnost razmnožavanja u humanim makrofazima [6]. Zanimljivo je kako kod glodavaca *F. novicida* izaziva tularemiju, slično kao *F.tularens* subsp. *tularens* kod čovjeka. Budući da *F. novicida* nije patogena za čovjeka, često se koristi u eksperimentalnom istraživanju tularemije [7].

1.2.3. Epidemiologija

F.tularens se na čovjeka prenosi uglavnom ubodom insekata, prilikom kontakta s bolesnim ili mrtvim životinjama, bakterijama u tlu ili preko zaražene hrane ili vode [8, 9].

Glavni rezervoar *Francisella* su zečevi i glodavci, a vektori prijenosa tularemije su člankonošci, kao što su muhe, komarci i krpelji. *F.tularens* subsp. *tularens* se uglavnom povezuje s ovčama i kunićima, dok je *F.tularens* subsp. *holarctica* najčešće prisutna u vodenim ekosustavima[10].

1.2.4. Tularemija

Razlikujemo vanjske i unutarnje oblike tularemije u ljudi. U vanjske oblike ubrajaju se: ulceroglandularni, glandularni, okuloglandularni i orofaringealni oblik, dok su unutarnji oblici bolesti: plućni, abdominalni i tifoidni. Klinična slika tularemije ovisi o putu infekcije[11].

Jedan od najčešćih vanjskih oblika tularemije je ulceroglandularni koji se prenosi kontaktom sa zaraženom životinjom ili ugrizom zaražene životinje. Najčešće je uzrokovan podvrstom *holarctica*. Uz opće simptome, javlja se povećanje limfnih čvorova. Na mjestu ugriza se nakon nekoliko dana stvara čir koji kasnije prelazi u papulu. Takva rana uglavnom zarasta u obliku ožiljka[11]. Okuloglandularni oblik se prenosi umivanjem zagađenom vodom ili inficiranim rukama, a očituje se promjenama na konjuktivi oka[12,13]. Glandularni oblik

tularemije javlja se u 5-10% neliječenih bolesnika, a očituje se povećanjem limfnih čvorova [11]. Konzumacija kontaminirane hrane ili vode može dovesti do razvoja orofaringealnog oblika tularemije. Najčešće se javlja na području Turske i Finske (oko 77 % slučajeva). Taj oblik bolesti karakteriziran je pojavom crvenila na sluznicama usta i ždrijela. Zanimljiva činjenica je da do povećanja limfnih čvorova dolazi jednostrano [14, 15]. Abdominalni oblik bolesti javlja se nakon konzumacije zaražene vode ili zaraženog mesa. Plućni oblik tularemije javlja se nakon udisanja kontaminiranog zraka. Poznati su slučajevi infekcije bakterijama prilikom rada s kontaminiranim sijenom ili prilikom košenja trave [16]. Nakon infekcije javlja se pneumonija, bolovi u području prsnog koša te jaki suhi kašalj [17].

Tifoidni oblik tularemije je najteži oblik i u 30% neliječenih bolesnika uzrokuje smrt. Takav oblik tularemije nastaje neovisno o mjestu ulaska uzročnika u organizam. Bolest počinje naglo s općim simptomima, visokom temperaturom i tresavicom, javljaju se poremećaji svijesti i septički šok [11].

1.2.5. Prevencija

U suzbijanju tularemije, vrlo je bitno izbjegavati kontakt s bolesnim i uginulim životinjama. Potrebno je smanjiti mogućnost uboda insekata: nošenjem zaštitne odjeće, korištenjem zaštitnih mreža na prozorima, korištenje repelentnih sredstava te uklanjanje krpelja [3].

1.3. Normalan put razgradnje mikroorganizama u fagocitnim stanicama

Fagocitoza je oblik endocitoze u kojem stanica koristi fagosome kako bi imala mogućnost razgradnje mikroorganizama. Fagocitozu provode posebne vrste stanica koje se nazivaju profesionalni fagociti. Neutrofili i makrofagi su dvije vrste bijelih krvnih stanica koje imaju mogućnost fagocitoze.

Nakon ulaska bakterije u stanicu makrofaga, uobičajeno dolazi do degradacije endosomalno – lizosomalnim putem. Fagosom iz prvobitnog stanja sazrijeva u rani endosom koji je reguliran proteinom Rab5. Nakon toga rani endosom sazrijeva u kasni endosom koji je reguliran proteinom Rab7. Protonska vATP- azna pumpa u fagosom unosi vodikove ione te na taj način dolazi do zakiseljavanja kasnog endosoma. Zakiseljeni endosom se spaja s lizosomima u oblik fagosoma unutar kojega počinje razgradnja bakterija pomoću hidrolaza [18].

1.4. Unutarstanični život *L. pneumophila*

L. pneumophila posjeduje sposobnost ulaska i razmnožavanja unutar različitih fagocitnih i nefagocitnih stanica. Međutim, još uvijek nije potpuno razjašnjen mehanizam kojim

L. pneumophila ulazi u stanice domaćina. Nakon ulaska u stanicu, bakterije se nalaze unutar membranom omeđene vakuole (engl. *Legionella containing vacuole*, LCV). Unutar vakuole dolazi do razmnožavanja bakterija. Nakon ulaska u stanicu domaćina fagocitozom, bakterija zaustavlja normalno dozrijevanje fagosoma te ne dolazi do razgradnje unutar lizosoma. Nasuprot tome, *L. pneumophila* boravi i razmnožava se unutar vakuole [19, 20].

L. pneumophila ima sposobnost razmnožavanja i preživljavanja osim u makrofazima i u stanicama ameba kao što su *Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Naegleria*, *Valkampfia* i *Dictyostelium*. Zanimljivo je što *L. pneumophila* pokazuje sličan životni ciklus unutar stanica makrofaga i protozoa. Nakon što stanica fagocitozom proguta bakteriju, bakterija *L. pneumophila* razmnožava se unutar vakuole. Ubrzo nakon infekcije *L. pneumophila* na površinu svoje vakuole regrutira stanične organele, kao što su mitohondriji, ribosomi, golgijev aparat i endoplazmatski retikulum. LCV na svojoj površini izražava i poliubikvitinirane proteine. Strategija koju *L. pneumophila* koristi kako bi promjenila stanične procese izaustavila normalno sazrijevanje fagosoma te izbjegla lizosomalnu razgranju, regulirano je

sustavom sekrecije Dot/Icm. Ovaj sekrecijski sustav ubacuje oko 300 efektornih proteina u citosol stanice domaćina. Oko 10% genoma bakterije *L. pneumophila* sudjeluje u kodiranju sekrecijskih efektornih proteina. Mnogi efektni proteini bakterije *L. pneumophila* na svojoj površini ekspimiraju proteinske domene kao što su Sel-1, U-box, F-box, C-terminalni CaaX motiv te domene bogate leucinom. Izražaj velikog broja efektornih proteina potaknut je tijekom eksponencijalne faze i unutarstaničnog rasta u amebama i makrofazima. Međutim, uloga svih proteina još uvijek nije dovoljno istražena. Tijekom kasne faze unutarstanične proliferacije dolazi do lize amebe, a bakterije izlaze u okoliš u potrazi za novim domaćinom [21].

1.5. Unutarstanični život *F. tularensis*

Ključni mehanizam patogeneze tularemije je sposobnost ulaska, preživljavanja i razmnožavanja bakterije *F. tularensis* u stanicama domaćina [22]. Za razliku od *L. pneumophila* koja pokazuje sličan životni ciklus unutar stanica makrofaga i protozoa, *F. tularensis* unutar stanica makrofaga i ameba pokazuje potpuno drugačiji način razmnožavanja. Unutarstanični život *F. tularensis* razlikuje se s obzirom na vrstu domaćina.

1.5.1. Ulazak *F. tularensis* u stanicu domaćina

Kako bi ušla u stanicu domaćina, *F. tularensis* koristi IV sustav pila [23]. Faktor elongacije (EF), koji se nalazi na površini bakterije te FsaP protein smješten u vanjskoj membrani, imaju vrlo važnu ulogu u adherenciji bakterije za stanicu domaćina [24].

Bakterija ulazi u stanicu domaćina procesom fagocitoze te vezanjem na površinske receptore. Različiti receptori sudjeluju u ulasku bakterije u stanicu domaćina. Ukoliko se radi o neopsoniziranoj *F. tularensis*, pri ulasku bakterije sudjeluje manozni receptor (MR), dok pri ulasku opsonizirane *F. tularensis*, važnu ulogu imaju receptori koji se nalaze na površini

stanice. Ukoliko je *F. tularensis* obložena protutijelima, za ulazak u stanicu domaćina koristi FC receptore [25].

1.5.2. Unutarstanični život *F. tularensi* su stanicama makrofaga

Francisella u makrofage ulazi fagocitozom vezujući se za površinske receptore. Vrsta površinskih receptora ovisi o tome nalazi li se *F. tularensis* u opsoniziranom ili neopsoniziranom stanju. Nakon ulaska u makrofage, *F. tularensis* se veže na područje bogato kolesterolom- lipidnu splav (engl. *Lipid Raft*). Lipidne splavi u kombinaciji s proteinom kaveolinom-1 ključni su za ulazak bakterije u stanicu makrofaga te postaju dio fagosoma (engl. *Francisella Containing Phagosome*, FCP). Fagosom sazrijeva u rani endosom u kojem sudjeluju protein Rab5 i rani endosomalni marker (engl. Early Endosomal Antigen 1, EEA1). Nakon toga slijedi sazrijevanje u kasni endosom gdje se oslobađaju kasni endosomalni makeri (engl. *Lysosomal Associated Membrane Proteins*, LAMP-1 i LAMP-2), protein Rab7 te manoza-6-fosfat. U razdoblju od 15-30 minuta nakon infekcije dolazi do aktivacije vATP-azne protonske pumpe koja zakiseljava fagosom. Nakon toga *F. tularensis* izlazi u citosol humanih makrofaga gdje se bakterije repliciraju, a inficirana stanica makrofaga podliježe apoptozi [26].

1.5.3. Unutarstanični život *F. tularensis* u stanicama ameba

Studije su pokazale da *Francisella* ulazi i razmnožava se unutar ameba *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis* te unutar *Dictyostelium discoideum*. Pretpostavlja se kako spomenute protozoe imaju vrlo važnu ulogu u prijenosu tularemije putem površinskih i izvorskih voda [27].

Mehanizmi i receptori potrebni za ulazak bakterije *F. tularensis* u amebe nisu poznati. Zanimljivo je da se životni ciklus bakterije *F. novicida* razlikuje unutar stanica ameba u usporedbi sa stanicama makrofaga. Dok unutar stanica makrofaga bakterije bježe iz

fagosoma, kako bi se razmnožavale u citosolu, unutar ameba *H. vermiformis* i *A. castellanii* bakterije se razmnožavaju unutar vakuole koja nije zakiseljena.

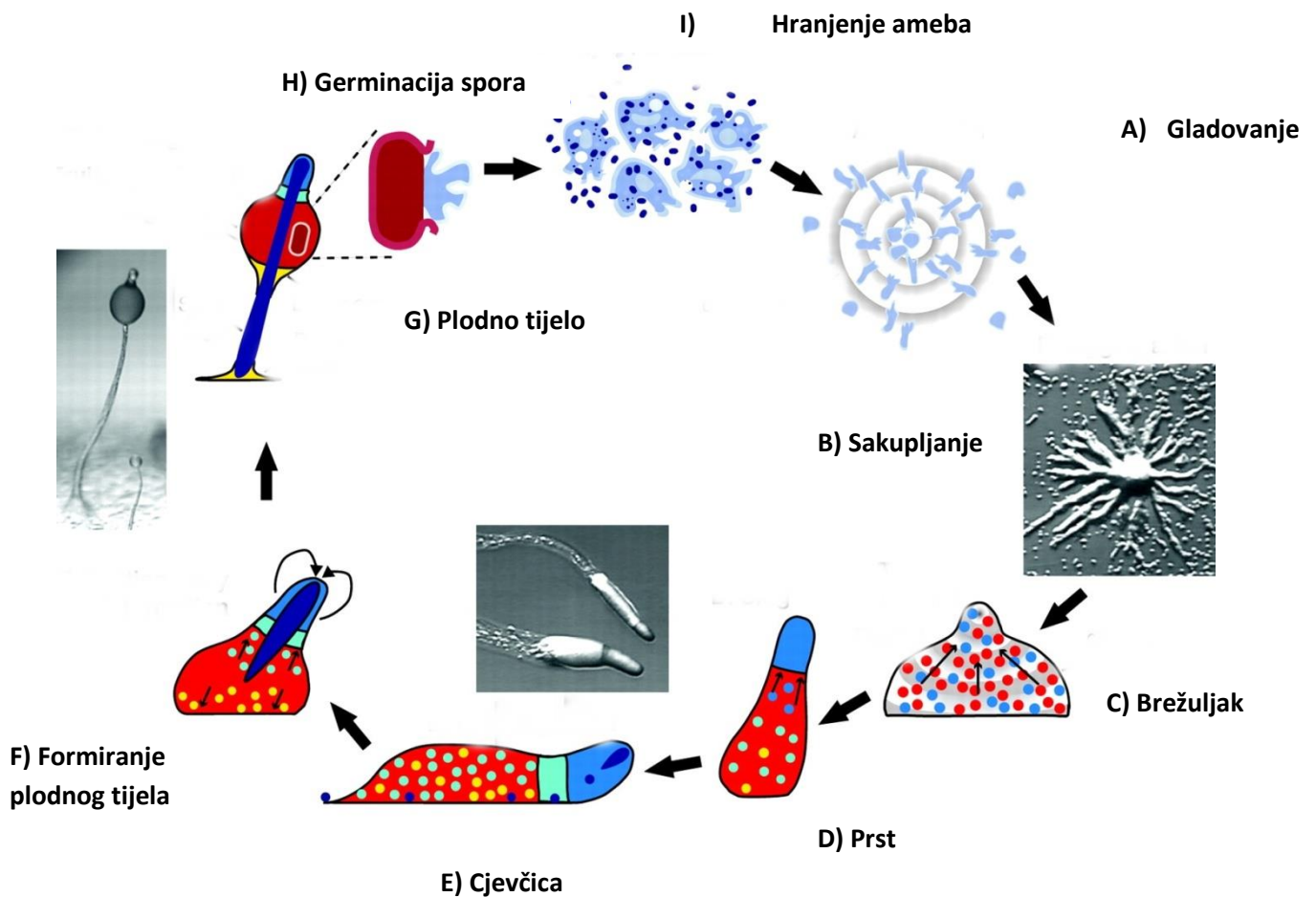
1.6. *Dictyostelium discoideum* kao model za ulazak bakterija u stanicu

D. discoideum je eukariotska, haploidna, jednostanična ameba koja živi u tlu i hrani se bakterijama. Često se naziva „sluzava plijesan“ ili socijalna ameba“[36]. Ameba *D. discoideum* pogodna je za znanstvena istraživanja s obzirom da se vrlo brzo razmnožava i da ne zahtijeva posebne uvijete uzgoja. Najpogodnija temperatura rasta za *D. discoideum* je sobna temperatura, od 22 do 25 °C[28]. Dok god su amebi dostupne bakterije, ona ih fagocitira, hrani se, raste i dijeli binarnom diobom svakih 8 do 10 sati tijekom vegetativnog perioda života[29]. Zanimljivo je da *D. discoideum* ima sposobnost agregiranja u višestaničnu strukturu. Kada stanice nemaju dovoljno hrane, one se udružuju u strukture nalik obliku puža (engl. *slug*). Svaki „slug“ sadrži preko 100 000 stanica, a funkcioniraju kao jedinka. Međutim, kada je prisutno dovoljno hrane *D. discoideum* živi kao jednostanična ameba, a hrani se kvascima i bakterijama [36].

1.6.1. Životni ciklus *D. discoideum*

Životni ciklus amebe započinje kada spore germiniraju iz plodnih tijela pod toplim i vlažnim uvjetima. Životni ciklus amebe *D. discoideum* sastoji se od dva ciklusa: spolnog i nespolnog. Njezin nespolni životni ciklus sastoji se od socijalne i vegetativne faze rasta. U vegetativnoj fazi rasta ameba se hrani procesom pinocitoze te fagocitozom. Ameba se hrani bakterijama i raste, udvostručuje svoj genom te se dijeli mitozom. Nakon diobe, ameba ponovo može ući u vegetativnu fazu ili može započeti socijalnu fazu, ovisno o uvjetima u kojima se nalazi.

Bakterije kojima se *D. discoideum* hrani luče folnu kiselinu i na taj način privlače amebe. Kada se potroši opskrba bakterijama, amebe ulaze u agregacijsku fazu. Tijekom agregacije, izgladnjivanje potiče stvaranje biokemijskih molekula koje uključuju glikoproteine i adenil ciklazu. Glikoproteini omogućuju međusobno prijanjanje stanica, a adenil ciklaza stvara ciklički AMP. Amebe stvaraju ciklički AMP kako bi privukle susjedne stanice. Dok se stanice kreću prema signalu, one se sudaraju jedna s drugom te se drže zajedno pomoću glikoproteina. Migracijska faza započinje nakon formiranja čvrste agregacijske strukture. Tijekom agregacijske faze amebe formiraju nakupine u obliku strukture „slug“, a funkcioniraju kao jedna. Ciklički AMP i faktor diferencijacije induciraju tvar koja pomaže u oblikovanju različitih oblika stanica (brežuljak, prst, cjevčica) (Slika 2.). Nakon što se „cjevčica“ smjestila na jednom mjestu, počinje se stvarati oblik „meksički šešir“, odnosno formiranje plodnog tijela[30].



Slika 2. Životni ciklus amebe *D. discoideum*

Bakterije kojima se hrani *D. discoideum* luče folnu kiselinu i na taj način privlače amebe nakon faze gladovanja. Kada se potroši opskrba bakterija, amebe ulaze u agregacijsku fazu tijekom koje formiraju različite oblike struktura. Stvaranje oblika „meksičkog šešira“ znači početak formiranja plodnog tijela amebe. Izvor: P.Schaap: *Evolutionary crossroads in developmental biology – Dictyostelium discoideum*, prilagođeno na hrvatski jezik

1.6.2. Genom *D. discoideum*

Genom amebe *D. discoideum* je puno veći i složeniji od genoma *Escherichie coli*, ali i jednostavniji od genoma višestaničnih eukariota. Ameba *D. discoideum* još uvijek nije dovoljno istražena. Međutim, u posljednjih 50 godina, sve se više istražuje životni ciklus te amebe [36].

Genom amebe sastoji se od haploidnih gena koji čine 6 kromosoma. Ukupna veličina genoma iznosi 34Mb, a kodira oko 12 500 proteina. Istraživanja su pokazala kako DNA amebe *D.discoideum* sadrži vrlo visoki postotak adenina i timina (oko 77%).

Genom amebe *D.discoideum* sekvencioniran je 2005.godine, a ujedno je i prvi genom protozoe koji je u potpunosti sekvencioniran. Sekvenca je postavljena pomoću klasičnih i fizikalnih mapa, a metoda je poboljšana tzv. HAPPY mappingom koji se temelji na analizi haploidnih DNA uzoraka koristeći enzim polimerazu.

Genom amebe *D.discoideum* pokazao je sličnost s ljudskim genima što pridonosi važnosti amebe u znanstvenim istraživanjima[31]. Zbog toga se ameba *D. discoideum* koristi kao modelni organizam za istraživanje raznih bakterija kao što su *L. pneumophila*, *F. novicida*, *Mycobacteria* i *Salmonella typhimurium*[32].

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je pratiti učinak citokalasina D na ulazak i razmnožavanje bakterija *F.novicida* i *L.pneumophila* u amebu *D. discoideum*. Također, željeli smo utvrditi je li učinak citokalasina D ovisan o njegovoj koncentraciji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

U eksperimentalnom radu koristila sam bakterijske sojeve *F. novicida* U112 te *L. pneumophila* AA100. Obje bakterije sam nasadila na agar s kvašćevim ekstraktom i aktivnim ugljenom (eng. Buffered Charcoal Yeast Extract, BCYE). *Francisella novicida* inkubirana je od 24-48 sati, dok je *L. pneumophila* inkubirana 48-72 sata. Obje bakterije su inkubirane pri 37°C.

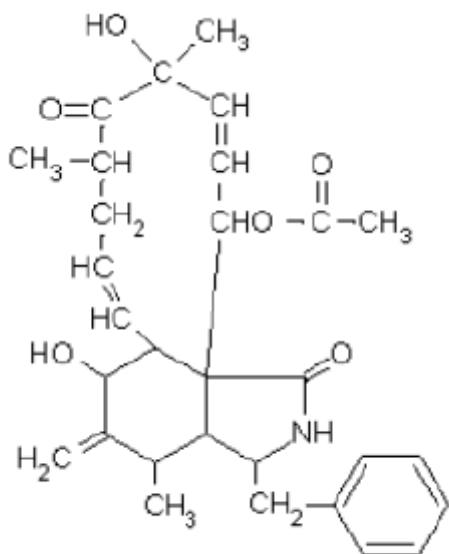
3.2. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija koristila sam BCYE agar koji sadrži aminokiseline L-cistein, serin i treonin kao izvore energije i ugljika te α -ketoglutarat koji pospješuje rast bakterije. U agaru se također nalazi kvašćev ekstrakt te aktivni ugljen koji je bitan za apsorpciju i detoksikaciju produkata razgradnje masnih kiselina čime se sprječava oksidacija L-cisteina.

Ameba *D. discoideum* je uzgajana u HL5 mediju. HL5 medij sadrži proteazu pepton, enzim tirozin E pepton, natrijev hidrogen fosfat-7-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4), glukozu, ekstrakt kvasca te antibiotik dihidrostreptomycin sulfat. HL5 medij je čuvan pri temperaturi od 4°C. Neposredno prije pokusa, medij smo ugrijali na 25 °C.

3.3. Citokalasin D

Citokalasin D je izomer metabolita jedne vrste gljiva - *Metarrhizium anisopliae*. Posjeduje antibiotska i antitumorska svojstva. Njegova molekulska formula je $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_6$. Ima visoku temperaturu taljenja koja varira od 268 do 271 °C, dok je molekulska masa ove kemikalije 507,62. Topiv je u kloroformu i dimetilsulfoksidu, a skladišti se na temperaturi od -20 °C.



Slika 3. Struktura citokalasina D.

Citokalasin D ima dosta složenu molekulsku strukturu. Sastoji se od 30 ugljikovih atoma, 37 vodikovih atoma, 6 kisikovih atoma te jednog dušikovog atoma (Slika 3.). Molarna masa citokalasina D iznosi 507.61788 g/mol. Izvor: Pubchem, open chemistry database

Citokalasin D depolimerizira aktinski filament na način da se veže na kukasti kraj aktinskih niti na kojem se 5-6 puta brže vežu monomeri nego na suprotni - točkasti kraj te na taj način sprječava daljnji rast aktinskih niti. Citokalasin D se zbog takvog djelovanja naziva inhibitor polimerizacije aktinskih niti [37].

3.4. Infekcija *D.discoideum* s *F. novicida* i *L. pneumophila*

Prilikom infekcije stanice su inkubirane u HL5 mediju u koji je dodan fosfatni pufer u omjeru 1:1. Takav medij korišten je kako bi spriječili izvanstanično razmnožavanje bakterija. Za pokus je korišteno 10^5 ameba/mL, a njihov broj određen je u Neubauerovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom. Nakon brojanja, stanice su smještene u mikrotitarske pločice s 24 jažice. Amebe *D. discoideum* tretirane su sa citokalasinom D u koncentraciji 1 μ g/mL ili 2 μ g/mL u periodu od 1 sat prije infekcije bakterijama. Suspenzije bakterija *L. pneumophila* i *F. novicida* pripremljene su u koncentracijama od 10^6 CFU/mL. Amebe su inficirane bakterijama u omjeru 1:10, što znači da je na jednu amebu dodano 10 bakterija (MOI iznosi

10, engl. *multiplicity of infection*). Nakon dodavanja bakterijske suspenzije, stanice su centrifugirane i inkubirane 1 h pri 27°C kako bi bakterije ušle u amebe. Nakon toga, stanice su tretirane gentamicinom u koncentraciji od 5 µg/ml, 1 h pri 27 °C, kako bi se ubile izvanstanične bakterije. Nakon sat vremena, medij sa gentamicinom je ispran pomoću fosfatnog pufera, a stanicama je dodan svježi medij bez antibiotika u koji je ponovno dodan citokalsin D. Praćena je kinetika rasta i razmnožavanja bakterija u amebama u periodima od 1, 5, 24 i 48 sati nakon infekcije. Nakon svakog spomenutog razdoblja, dodan je detergent Triton X-100 kako bi se razorila membrana ameba i omogućilo određivanje broja unutarstaničnih bakterija. Broj bakterija određen je nasađivanjem desetorostukih razrijeđenja na BCYE agar. Stanice koje nisu tretirane sa citokalsinom D su bile kontrola.

4. REZULTATI

4.1. Kinetika rasta *F. novicida* u *D. discoideum* nakon tretmana sa citokalasinom D u koncentracijama 1 µg/mL i 2 µg/mL

Amebe su tretirane sa citokalasinom D u različitim koncentracijama (1 µg/mL i 2 µg/mL) te zatim inficirane bakterijom *F. novicida*. Kao kontrolu koristila sam stanice koje nisu bile tretirane sa citokalasinom D. Broj unutarstaničnih bakterija praćen je 1, 5, 24, i 48 sati nakon infekcije (Slika 4.).

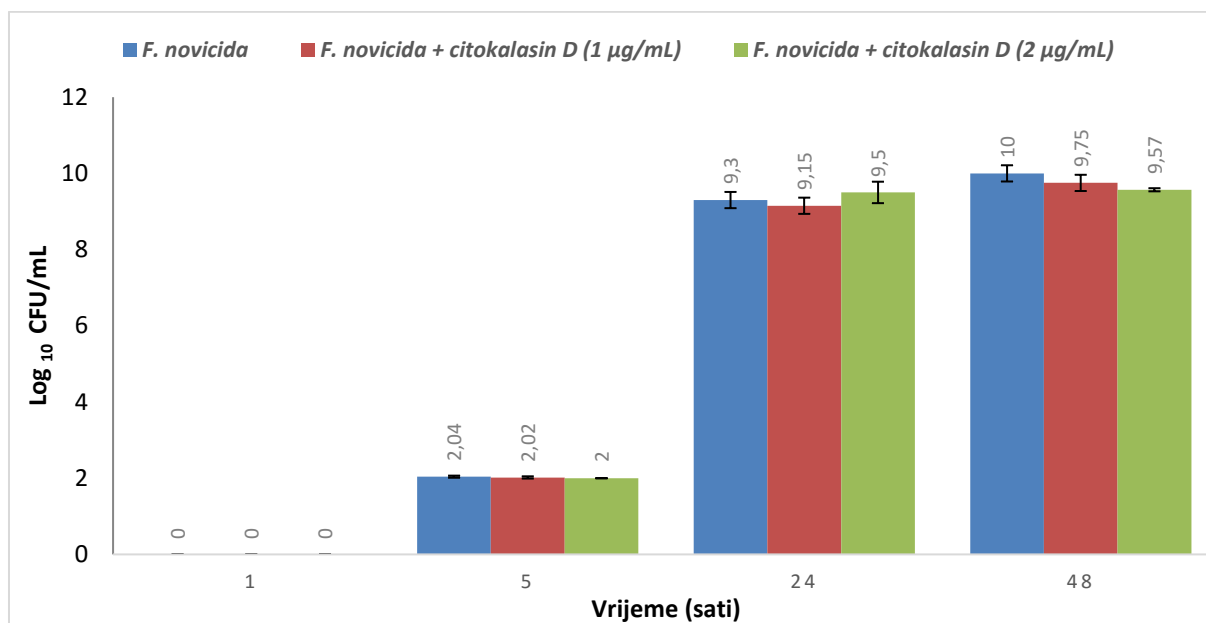
U periodu od jedan sat nakon infekcije, *F. novicida* nije porasla u niti jednom promatranom uzorku. Smatramo da je broj unutarstaničnih bakterija u tom vremenskom razdoblju bio prenizak da bi se odredio.

Pet sati nakon infekcije broj bakterija *F. novicida* u stanicama bez dodatka citokalasina D bio je $1,10 \times 10^2$ CFU/mL. U stanicama tretiranim sa citokalasinom D u koncentraciji 1 µg/mL, broj unutarstaničnih bakterija bio je $1,05 \times 10^2$ CFU/mL, dok je u stanicama kojima je dodana duplo veća koncentracija citokalasina D poraslo $1,00 \times 10^2$ CFU/mL bakterija (Slika 4.).

U razdoblju od 24 sata nakon infekcije broj unutarstaničnih bakterija bio je $2,5 \times 10^9$ CFU/mL u stanicama koje nisu tretirane citokalasinom D. U istom periodu, u stanicama koje su tretirane sa citokalasinom D u koncentraciji 1 µg/mL određeno je $1,5 \times 10^9$ CFU/mL bakterije *F. novicida*. U stanicama kojima je citokalasin D dodan u koncentraciji od 2 µg/mL broj bakterija u stanicama iznosio je $3,50 \times 10^9$ CFU/mL.

U periodu od 48 sati nakon infekcije, u netretiranim stanicama poraslo je $1,25 \times 10^{10}$ CFU/mL bakterije *F. novicida*. Unutar ameba kojima je dodan citokalasin D u koncentraciji

od 1 $\mu\text{g/mL}$ poraslo je $6,00 \times 10^9$ CFU/mL, dok je unutar stanica kojima je dodana duplo veća koncentracija citokalasina D, poraslo $3,75 \times 10^9$ CFU/mL bakterije *F. novicida*.



Slika 4. Utjecaj citokalasina D na rast bakterije *F. novicida* unutar ameba *D. discoideum*. Stanice amebe *D. discoideum* tretirane su sa citokalasinom D u koncentracijama od 1 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$ te inficirane bakterijom *F. novicida* u omjeru 1:10. Rast i razmnožavanje bakterija u stanicama praćeno je u periodima od 1, 5, 24 i 48 h nakon infekcije. Dobiveni podatci su statistički obrađeni i izračunata je standardna devijacija (STDEV).

Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako citokalasin D, kao ni njegova doza nemaju utjecaj na razmnožavanje *F. novicida* unutar amebe *D. discoideum*.

4.2. Kinetika rasta *L. pneumophila* u *D. discoideum* nakon tretmana s citokalasinom D u koncentracijama 1 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$

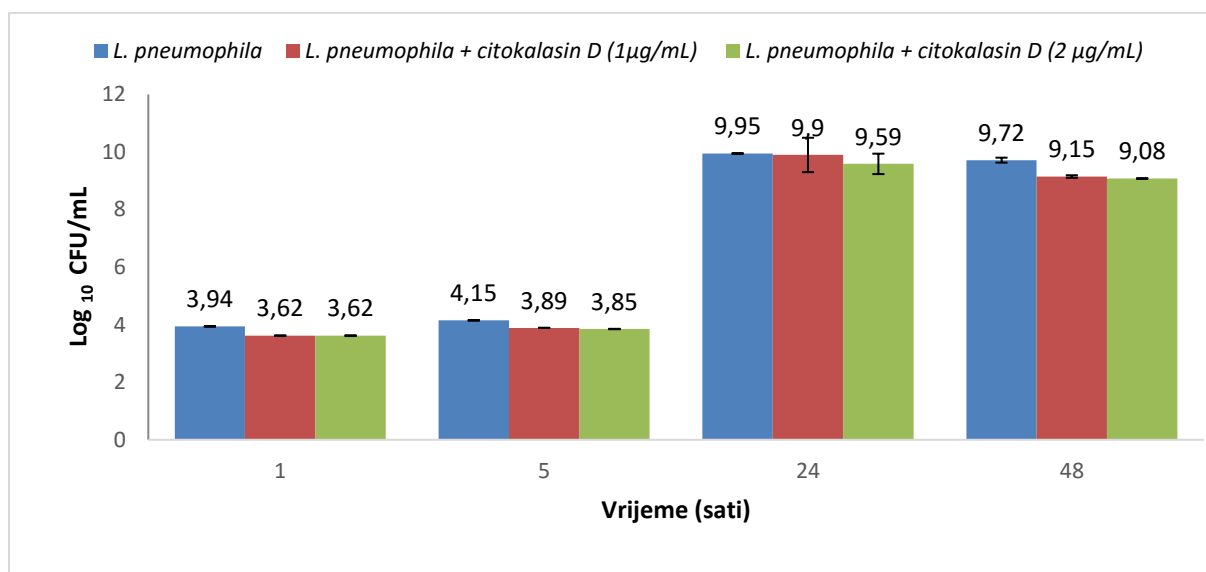
Kao što je prethodno opisano, amebe su tretirane sa citokalasinom D u različitim koncentracijama (1 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$) te zatim inficirane bakterijom *L. pneumophila*. Kao kontrolu koristila sam stanice koje nisu bile tretirane sa citokalasinom D. Broj unutarstaničnih bakterija praćen je 1, 5, 24, i 48 sati nakon infekcije (Slika 5.).

U razdoblju od jedan sat nakon infekcije u stanicama kojima nije dodan citokalsin D poraslo je $8,80 \times 10^3$ CFU/mL bakterije *L. pneumophila*. Unutar ameba tretiranih sa citokalsinom D u koncentraciji od $1 \mu\text{g/mL}$, određeno je $4,14 \times 10^3$ CFU/mL bakterija, dok je u stanicama tretiranim duplo većom dozom citokalsina D poraslo $4,20 \times 10^3$ CFU/mL *L. pneumophila*.

Pet sati nakon infekcije, broj unutarstaničnih bakterija u amebama bez tretmana kemikalijom citokalsin D bio je $1,42 \times 10^4$ CFU/mL. Unutar stanica tretiranih sa citokalsinom D u koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$ poraslo je $7,85 \times 10^3$ CFU/mL bakterije *L. pneumophila*. U stanicama kojima je dodan citokalsin D u koncentraciji od $2 \mu\text{g/mL}$ određeno je $7,12 \times 10^3$ CFU/mL bakterije.

U razdoblju od 24 sata nakon infekcije broj unutarstaničnih bakterija *L. pneumophila* bio je $9,00 \times 10^9$ CFU/mL u amebama kojima nije dodan citokalsin D. Unutar ameba *D. discoideum* kojima je dodan citokalsin D u koncentraciji od $1 \mu\text{g/mL}$ poraslo je $1,20 \times 10^{10}$ CFU/mL bakterija. U stanicama tretiranim duplo većom dozom citokalsina D, poraslo je $4,60 \times 10^9$ CFU/mL bakterije *L. pneumophila*.

U periodu od 48 sati nakon infekcije, u netretiranim stanicama detektirano je $5,50 \times 10^9$ CFU/mL bakterije *L. pneumophila*. U amebama kojima je dodan citokalsin D u koncentraciji od $1 \mu\text{g/mL}$ citokalsina D izbrojano je $1,40 \times 10^9$ CFU/ml bakterija. U stanicama koje su tretirane duplo većom dozom citokalsina D, izbrojano je $1,20 \times 10^9$ CFU/mL bakterija.



Slika 5. Utjecaj citokalsina D na rast bakterije *L. pneumophila* unutar ameba *D. discoideum*. Stanice amebe *D. discoideum* tretirane su sa citokalsinom D u koncentracijama od 1 µg/mL i 2 µg/mL te inficirane bakterijom *L. pneumophila* u omjeru 1:10. Rast i razmnožavanje bakterija u stanicama praćeno je u periodima od 1, 5, 24 i 48 h nakon infekcije. Dobiveni podatci su statistički obrađeni i izračunata je standardna devijacija (STDEV).

Iz ovih rezultata možemo zaključiti kako citokalsin D ni njegova doza nemaju utjecaj na razmnožavanje *L. pneumophila* unutar amebe *D. discoideum*.

5. RASPRAVA

Francisella tularensis je gram-negativna unutarstanična bakterija koja uzrokuje tularemiju kod ljudi i životinja. Postoje tri podvrste *F. tularensis*: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (tip A), *holarctica* (tip B) i *mediasiatica*. *F. novicida* se smatrala četvrtom podvrstom, međutim nedavno je svrstana kao zasebna vrsta. *F. novicida* nije patogena za čovjeka, već kod glodavaca uzrokuje bolest tularemiju, slično kao *F. tularensis* kod ljudi. S obzirom da je *F. novicida* avirulentna za ljude, često se koristi u eksperimentalnom proučavanju tularemije. Budući da je infektivna doza bakterije prilikom respiratornog puta infekcije vrlo niska (oko 10 bakterija), *F. tularensis* se smatra potencijalnim biološkim oružjem. Prema centru za prevenciju i kontrolu bolesti (engl. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) *F. tularensis* je klasificirana kao biološki obrambeni agens kategorije A.

L. pneumophila je gram – negativna, aerobna, unutarstanična bakterija koja pripada porodici *Legionellaceae*. Ima sposobnost preživljavanja u protozoama, što doprinosi njenoj virulenciji. Legionele su široko rasprostranjene u prirodi, a osobito vole vodeni okoliš. Uzrokuju dva oblika bolesti: pontijačku groznicu (lakši oblik) i legionarsku bolest (teži oblik). Bolest se ne prenosi s čovjeka na čovjeka, već isključivo aerosolom. *L. pneumophila* i *F. tularensis* imaju sposobnost ulaska, preživljavanja i razmnožavanja u stanicama makrofaga i stanicama ameba. Zanimljivo je da se životni ciklus bakterije *F. tularensis* razlikuje unutar stanica sisavaca u usporedbi sa stanicama ameba. Unutar stanica makrofaga, bakterije zaustavljaju normalno dozrijevanje fagosoma te bježe iz fagosoma pod utjecajem vATP-azne protonske pumpe, kako bi se razmnožavale u citosolu. Nasuprot tome, unutar ameba *F. tularensis* boravi i razmnožava se unutar membranom omeđenih vakuola. Međutim,

mehanizmi i receptori potrebni za ulazak bakterije *F. tularensis* u stanicu domaćina još uvijek nisu dovoljno razjašnjeni.

Za razliku od *F. tularensis* koja unutar makrofaga i ameba pokazuje potpuno drugačiji način razmnožavanja, *L. pneumophila* pokazuje sličan životni ciklus unutar obje vrste stanica. Nakon ulaska u stanicu, bakterije se nalaze unutar membranom omeđene vakuole (LCV) gdje *L. pneumophila* boravi i razmnožava se.

Cilj ovog rada bio je pratiti preživljavanje bakterija *F. novicida* i *L. pneumophila* unutar amebe *D. discoideum*. Cilj je također bio utvrditi postoji li razlika u rastu bakterija unutar *D. discoideum* s obzirom na prethodni tretman ameba sa citokalasinom D koji inhibira polimerizaciju aktina. Nadalje, cilj je bio pratiti ovisi li rast bakterija unutar *D. discoideum* o koncentraciji citokalasina D. Naši rezultati pokazuju da se *F. novicida* uspješno razmnožava i preživljava u amebi *D. discoideum* te da broj bakterija u amebama doseže maksimum u periodu od 48 sati nakon infekcije, kada je određeno $1,25 \times 10^{10}$ CFU/mL bakterija. Rezultati su pokazali kako dodatak citokalasina D, kao ni njegova koncentracija, nema utjecaj na rast bakterije *F. novicida* u amebi *D. discoideum*, što znači da *F. novicida* ne koristi aktinske niti prilikom ulaska u amebu *D. discoideum*. Rezultati drugog istraživanja u kojemu je praćen ulazak bakterije *F. tularensis* u amebe, također su pokazali da *F. tularensis* ulazi, preživljava i razmnožava se u amebi *D. discoideum*, ali i u drugim amebama kao što su *A. castellanii* i *H. vermiformis*[26]. Međutim, utjecaj citokalasina D na ulazak i razmnožavanje *F. novicida* u amebi *D. discoideum* još nije dovoljno istražen pa nije moguće usporediti rezultate.

Naši rezultati također pokazuju da *L. pneumophila* ulazi, preživljava i razmnožava se unutar stanica amebe *D. discoideum*. Broj bakterija u stanicama amebe doseže maksimum u periodu od 24 sata nakon infekcije, kada je određeno $9,00 \times 10^9$ CFU/mL bakterija. U razdoblju od 24 sata nakon infekcije unutar ameba *D. discoideum* kojima je dodan

citokalasin D u koncentraciji od $1\mu\text{g/mL}$ poraslo je $1,20 \times 10^{10}$ CFU/mL bakterija. U stanicama tretiranim duplo većom dozom citokalasina D, poraslo je $4,60 \times 10^9$ CFU/mL bakterije *L. pneumophila* te vidimo da porast koncentracije citokalasina D dovodi do smanjenog broja unutarstaničnih bakterija, iako to nije statistički značajno. S obzirom na to da citokalasin D nema utjecaja na razmnožavanje *L. pneumophila* unutar *D. discoideum*, pretpostavljamo da se *L. pneumophila* ne koristi aktinskim nitima prilikom ulaska u amebu.

Američki znanstvenici također su istraživali utjecaj citokalasina D na unutarstanični rast *L. pneumophila* u stanicama ameba i stanicama makrofaga [33]. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da *L. pneumophila* uspješno ulazi, raste i razmnožava se u stanicama makrofaga i stanicama ameba, što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Također, rezultati njihovog istraživanja su pokazali da citokalasin D inhibira unutarstanično razmnožavanje *L. pneumophila* u stanicama makrofaga [33]. Za razliku od našeg istraživanja, američki znanstvenici su kao model za istraživanje koristili stanice amebe *Hartmanella vermiformis*. Stanice su tretirane citokalasinom D koncentracije 0.5 i $1.0\mu\text{g/mL}$ [33]. Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da citokalasin D ne inhibira unutarstanično razmnožavanje *L. pneumophila* u stanicama amebe *H. vermiformis* te također da njezino razmnožavanje ne ovisi o dozi, što je u skladu s našim istraživanjem [33].

Drugo američko istraživanje je također pokazalo da se *L. pneumophila* uspješno razmnožava u stanicama makrofaga, ali dodatkom citokalasina D koncentracije 0.5 i $1.0\mu\text{g/mL}$ inhibira se razmnožavanje *L. pneumophila* unutar stanica makrofaga [34]. Također, pokazalo se kako povećane doze citokalasina D, dovode do smanjenja broja bakterija *L. pneumophila* unutar stanice makrofaga [34]. Možemo zaključiti da iako se radi o različitim vrstama stanica, *L. pneumophila* ima sposobnost preživljavanja i u stanicama ameba, kao i u stanicama makrofaga. Međutim, dodatak citokalasina D nema utjecaja, kao ni njegova doza, na rast unutarstaničnih bakterija unutar ameba.

6. ZAKLJUČAK

Iz rezultata pokusa vidljivo je:

- Dodatak citokalasina D, kao ni njegova doza nemaju utjecaj na razmnožavanje *F. novicida* u stanicama amebe *D. discoideum*.
- Dodatak citokalasina D, kao ni njegova koncentracija nemaju utjecaj na razmnožavanje *L. pneumophila* u stanicama amebe *D. discoideum*.
- Obzirom da citokalasin D nema utjecaja na broj bakterija *F. novicida* i *L. pneumophila* unutar amebe *D. discoideum*, možemo zaključiti kako *F. novicida* i *L. pneumophila* ne upotrebljavaju aktinske niti prilikom ulaska u amebu, već se koriste nekim drugim mehanizmima.

7. LITERATURA

- [1] Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med.* 1977;297:1189-97.
- [2] Coetzee N, Duggal H, Hawker J, Ibbotson S, Harrison TG, Phin N, et al. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display spa pool in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012. *Euro Surveill.* 2012;17.
- [3] From the Centers for Disease Control and Prevention. Tularemia--United States, 1990-2000. *JAMA.* 2002;287:1519-20.
- [4] Huber B, Escudero R, Busse HJ, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 60:1887-96.
- [5] Johansson A, Celli J, Conlan W, Elkins KL, Forsman M, Keim PS, et al. Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2010;60:1717-8; author reply 8-20.
- [6] Santic M, Molmeret M, Klose KE, Abu Kwaik Y. *Francisella tularensis* travels a novel, twisted road within macrophages. *Trends Microbiol.* 2006;14:37-44.
- [7] Owen CR, Buker EO, Jellison WL, Lackman DB, Bell JF. Comparative Studies of *Francisella Tularensis* and *Francisella Novicida*. *J Bacteriol.* 1964;87:676-83.
- [8] Sjostedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1105:1-29.

- [9] Whipp MJ, Davis JM, Lum G, de Boer J, Zhou Y, Bearden SW, et al. Characterization of a novicida-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J Med Microbiol.* 2003;52:839-42.
- [10] Hopla CE. The ecology of tularemia. *Adv Vet Sci Comp Med.* 1974;18:25-53.
- [11] Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:631-46.
- [12] Guerrant RL, Humphries MK, Jr., Butler JE, Jackson RS. Tickborne oculoglandular tularemia: case report and review of seasonal and vectorial associations in 106 cases. *Arch Intern Med.* 1976;136:811-3.
- [13] Steinemann TL, Sheikholeslami MR, Brown HH, Bradsher RW. Oculoglandular tularemia. *Arch Ophthalmol.* 1999;117:132-3.
- [14] Gulhan B, Tezer H, Kanik-Yukse S, Kilic S, Senel E. A rare cause of abdominal lymphadenopathy--tularemia: report of two pediatric cases. *Turk J Pediatr.* 2014;56:192-5.
- [15] Karadenizli A, Gurcan S, Kolayli F, Vahaboglu H. Outbreak of tularaemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey. *Scand J Infect Dis.* 2005;37:712-6.
- [16] Eliasson H, Lindback J, Nuorti JP, Arneborn M, Giesecke J, Tegnell A. The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:956-60.
- [17] Feldman KA, Stiles-Enos D, Julian K, Matyas BT, Telford SR, 3rd, Chu MC, et al. Tularemia on Martha's Vineyard: seroprevalence and occupational risk. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:350-4.
- [18] Roberts RL, Barbieri MA, Ullrich J, Stahl PD. Dynamics of rab5 activation in endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:627-32.

- [19] Creasey EA, Isberg RR. The protein SdhA maintains the integrity of the Legionella-containing vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:3481-6.
- [20] Harding CR, Stoneham CA, Schuelein R, Newton H, Oates CV, Hartland EL, et al. The Dot/Icm effector SdhA is necessary for virulence of Legionella pneumophila in Galleria mellonella and A/J mice. *Infect Immun*. 2013;81:2598-605.
- [21] Kwaik YA. The grand challenges to cellular and infection microbiology. *Front Microbiol*. 2010;1:3.
- [22] Celli J, Zahrt TC. Mechanisms of Francisella tularensis intracellular pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a010314.
- [23] Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56:289-314.
- [24] Melillo A, Sledjeski DD, Lipski S, Wooten RM, Basrur V, Lafontaine ER. Identification of a Francisella tularensis LVS outer membrane protein that confers adherence to A549 human lung cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;263:102-8.
- [25] Geier H, Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of Francisella tularensis. *Infect Immun*. 2011;79:2204-14.
- [26] Ozanic M, Marecic V, Abu Kwaik Y, Santic M. The Divergent Intracellular Lifestyle of Francisella tularensis in Evolutionarily Distinct Host Cells. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1005208.
- [27] Ryden P, Bjork R, Schafer ML, Lundstrom JO, Petersen B, Lindblom A, et al. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence. *J Infect Dis*. 2012;205:297-304.
- [28] Flowers JM, Li SI, Stathos A, Saxer G, Ostrowski EA, Queller DC, et al. Variation, sex, and social cooperation: molecular population genetics of the social amoeba Dictyostelium discoideum. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001013.
- [29] Escalante R, Vicente JJ. Dictyostelium discoideum: a model system for differentiation and patterning. *Int J Dev Biol*. 2000;44:819-35.

- [30] Devreotes PN. The effect of folic acid on cAMP-elicited cAMP production in *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol*. 1983;95:154-62.
- [31] Eichinger L, Pachebat JA, Glockner G, Rajandream MA, Sucgang R, Berriman M, et al. The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*. 2005;435:43-57.
- [32] Bozzaro S. The model organism *Dictyostelium discoideum*. *Methods Mol Biol*. 2013;983:17-37.
- [33] King CH, Fields BS, Shotts EB, Jr., White EH. Effects of cytochalasin D and methylamine on intracellular growth of *Legionella pneumophila* in amoebae and human monocyte-like cells. *Infect Immun*. 1991;59:758-63.
- [34] Elliott JA, Winn WC, Jr. Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 1986;51:31-6.
- [35] Smilja Kalenić i suradnici (2013.) *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada
- [36] G.M. Cooper, E. Hausmann. *Stanica*, 3. Izdanje
- [37] Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. *The Cell- A Molecular Approach*, Sixth Edition

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 4. studenog 1994. godine u Virovitici. Hrvatska sam državljanka sa stalnim prebivalištem u mjestu Veliki Banovac, nedaleko od Pakraca. Osnovnu školu sam završila 2009. godine u Pakracu, u Osnovnoj školi braće Radića Pakrac. Završila sam opću gimnaziju 2013. godine u Srednjoj školi Pakrac te sam iste godine upisala preddiplomski sveučilišni studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci.