

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Mikrobiologie
Studijní obor: N-MIKR



Václava Hejnarová

Faktory přispívající k adaptaci lidského patogenu *Bordetella pertussis* na stresové
podmínky

Factors contributing to stress adaptation of human pathogen *Bordetella pertussis*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Branislav Večerek, Ph.D.

Praha, 2023

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Branislavu Večerkovi, Ph.D. a Janu Čapkovi, Ph.D. za vedení práce a pomoc při experimentech a psaní mé diplomové práce. Můj dík také patří všem členům laboratoře post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ AV ČR, v.v.i.). Za nekonečnou podporu při studiu bych také chtěla poděkovat své rodině, hlavně mým rodičům a sestře, která mi poskytla spoustu cenných rad při psaní této práce. Děkuji také svému partnerovi a svým pejskům, Aladinovi a Coreymu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 12. 12. 2023

Václava Hejnarová

Tato závěrečná práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky.

Abstrakt

Role dvojmocných kovů jako kofaktorů v celé řadě enzymů je klíčová pro všechny domény života. Uplatňují se i v interakci mezi hostitelem a patogenem, jakým je *Bordetella pertussis*. Tato bakterie má několik mechanismů obrany vůči oxidativnímu stresu, kterému je vystavena ve fagozomu imunitních buněk. Patří sem například enzym superoxidodismutáza, který využívá Mn^{2+} jako kofaktor. Právě ve fagozomu je ovšem limitující koncentrace důležitých kovů a je proto nezbytné regulovat import Mn^{2+} , aby byla hladina dostatečná pro funkci enzymu a přitom nedocházelo ke kumulaci a toxickému efektu mis-metalace. Tato práce je zaměřena na studium vybraného lokusu *BP3083-BP3077*, jež je u *B. pertussis* exprimován ve vyšší míře při přežívání bakterie uvnitř makrofágů THP-1. Obsahuje dva souhlasně orientované transportéry, z čehož jeden je homolog Mn^{2+} importéru SitABCD u *Salmonella enterica* a regulaci zajišťuje divergentně orientovaný represor. V práci je studován vliv toxické koncentrace kovů na expresi zkoumaných transportérů pomocí RT-qPCR a zároveň využití delečních mutantů pro sledování fenotypu bakterií. Výsledky práce naznačují, že lokus kóduje transportéry Mn^{2+} a Co^{2+} , přičemž je negativně regulován při toxických koncentracích Co^{2+} Fur proteinem. Homeostáze Fe, Mn a Co podléhá řadě komplexních regulací a vede ke zvýšené odolnosti bakterie vůči oxidativnímu stresu.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, oxidativní stres, přežívání patogenu, transport manganu, limitace železem, virulence

Abstract

The role of bivalent metals as cofactors in various enzymes is essential for all domains of life. Their importance can be seen in interactions of hosts with pathogens such as *Bordetella pertussis*. This bacterium has several mechanisms that protect it from oxidative stress in phagosomes of immune cells. One example is Mn-dependent enzyme superoxide dismutase. Phagosome itself is an environment with limiting concentrations of several key bivalent metals. Thus, the transport of these metals must be controlled to ensure sufficient concentration for enzymatic activity and prevent from toxic cumulation and mismetallation. This study focuses on a particular locus *BP3083-BP3077* that is highly expressed in *B. pertussis* surviving after internalization by THP-1 macrophages. The locus consists of two transporters, one of which shares homology with SitABCD Mn²⁺ importer of *Salmonella enterica* and is regulated by Fur family repressor. Bacterial cells were exposed to toxic concentrations of several bivalent metals and the level of gene expression was studied by RT-qPCR. Deletion mutants were used for examination of bacterial phenotype. Results of the study show that the locus encodes Mn²⁺ and Co²⁺ transporters and becomes negatively regulated by Fur family repressor in toxic concentration of Co²⁺. The homeostasis of bivalent metals such as Fe, Mn and Co is a subject of a number of complex regulations and leads to better resistance to oxidative stress.

Key words: *Bordetella pertussis*, oxidative stress, pathogen survival, manganese transport, iron limitation, virulence

Seznam zkratek

ABC	A TP b inding c aseette	ABC transportní systém
ACT	A denylate c yclase t oxin	Adenylát cyklázový toxin
BG	B ordet G engou	Bordet Gengou
dH₂O	destilled H₂O	Destilovaná voda
DNT	D ermonekrotic t oxin	Dermonekrotický toxin
ddH₂O	D ouble D estilled H₂O	Dvojitě destilovaná voda
dNTPs	D eoxy n ucleotide t riphosphates	Deoxy nukleotid trifosfáty
FHA	F ilamentous h aemagglutinin	Filamentózní hemagglutinin
Fur	F erric u ptake r egulator	Regulátor příjmu železa
gDNA	G enomic D N A	Genomová DNA
LB	L uria B ertani	Luria Bertani
LOS	L ipooligosaccharide	Lipooligosacharid
LPS	L ipopolysaccharide	Lipopolysacharid
MntH	M n transporter H⁺ -dependent	H ⁺ -dependentní transportér Mn
NRAMP	N atural r esistence- a sociated m acrophage p rotein	Makrofágový protein asociovaný s přirozenou rezistencí
PCI	P henol c hloroform i soamylalcohol	Fenol chloroform isoamylakohol
PCR	P olymerase c hain r eaction	Polymerázová řetězová reakce
pDNA	P lasmid D N A	Plazmidová DNA
PRN	P ertactin	Pertaktin
PTX	P ertussis t oxin	Pertusový toxin
RE	R estriction e ndonuclease	Restrikční endonukleáza
RT-qPCR	R ead t ime q uantitative P olymerase c hain r eaction	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
ROS	R eactive o xygen s pecies	Reaktivní formy kyslíku
RT	R oom t emperature	Pokojová teplota
SBP	S olute b inding p rotein	Vazebný protein
SS	S tainer S chelte	Steiner Scholte
<i>vags</i>	v irulence a ctivated g enes	Geny aktivované BvgAS
<i>vrgs</i>	v irulence r epressed g enes	Geny reprimované BvgAS
WT	W ild t ype	Divoký kmen

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Cíle práce	11
2	Přehled literatury	12
2.1	Rod <i>Bordetella</i> a jeho zástupci	12
2.1.1	<i>Bordetella pertussis</i>	14
2.1.2	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	16
2.2	Adaptace na patogenní způsob života u rodu <i>Bordetella</i>	16
2.2.1	Intracelularita u <i>B. pertussis</i>	20
2.2.2	Regulace genové exprese v kontextu intracelulárního přežívání <i>B. pertussis</i>	23
2.3	Důležitost vybraných kovů pro bakterie	27
2.3.1	Železo	27
2.3.2	Mangan	31
3	Materiál a metody	34
3.1	Materiál	34
3.1.1	Bakteriální kmeny	34
3.1.2	Plazmidy	34
3.1.3	Kultivační média	35
3.1.4	Roztoky	37
3.1.5	Enzymy a jejich pufrы	38
3.1.6	Syntetické oligonukleotidy	39
3.2	Metody	40
3.2.1	Kultivační metody	40
3.2.1.1	Kultivace	40
3.2.1.2	Růstová křivka	40
3.2.2	Stanovení genové exprese	41
3.2.2.1	Izolace celkové RNA	41
3.2.2.2	Reverzní transkripce RNA	43
3.2.2.3	RT-qPCR	43
3.2.3	Molekulárně-biologické metody	44
3.2.3.1	PCR	44

3.2.3.2	Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu	45
3.2.3.3	Konstrukce vektoru pro klonování	46
3.2.3.4	Konjugace a homologní rekombinace vektoru pSS4245 do <i>B. pertussis</i>	48
3.2.3.5	Sekvenace DNA	48
4	Výsledky	50
4.1	Mutantní kmeny <i>B. pertussis</i>	52
4.2	Vliv média obohaceného o mangan na růstové vlastnosti a genovou expresi u <i>B. pertussis</i>	54
4.3	Vliv média obohaceného o kobalt na růstové vlastnosti a genovou expresi u <i>B. pertussis</i>	59
4.4	Vliv média obohaceného o další vybrané kovy na růstové vlastnosti a ge- novou expresi u <i>B. pertussis</i>	63
5	Diskuze	70
6	Souhrn	76
	Seznam použité literatury	77

Seznam tabulek

1	Složení frakce A tekutého SS média.	35
2	Složení 100× koncentrované frakce B tekutého SS média.-	36
3	Látky pro přípravu obohacených médií.	36
4	Složení EDTA v PBS pufru.	37
5	Složení TAE pufru.	37
6	Složení TE pufru	37
7	Použité RE enzymy	38
8	Ostatní enzymy a jejich pufry.	38
9	Seznam syntetických oligonukleotidů pro PCR (Sigma Aldrich).	39
10	Seznam syntetických oligonukleotidů pro RT-qPCR (Sigma Aldrich).	39
11	Aminokyselinová sekvenční homologie proteinů BP3083-BP3077	51
12	Deleční mutanty <i>B. pertussis</i>	52

Seznam obrázků

1	Fylogenetický strom rodu <i>Bordetella</i>	13
2	Faktory virulence <i>B. pertussis</i>	15
3	Bizafický model evoluce	18
4	Invaze bakteriálních patogenů do hostitelské buňky s využitím lipidických raftů	22
5	Regulace genové exprese dvoukomponentovými systémy u <i>B. pertussis</i> . . .	24
6	Fentonova reakce	27
7	Struktura Fur represoru	29
8	Mechanismus fungování ABC transportéru	33
9	Schéma lokusu <i>BP3083-BP3077</i>	50
10	Zjednodušené schéma tvorby delečních kazet	53
11	Indukce lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 40 μ M a 400 μ M MnCl ₂	55
12	Represe lokusu <i>BP3082-BP3077</i> pomocí 200 μ M MnCl ₂	56
13	Růstová křivka v přítomnosti 40 μ M MnCl ₂	57
14	Růstová křivka v přítomnosti 1mM MnCl ₂	58
15	Růstová křivka v přítomnosti 100 μ M CoCl ₂	60
16	Růstová křivka v přítomnosti 100 μ M CoCl ₂	60
17	Represe lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 100 μ M CoCl ₂	61
18	Růstová křivka v přítomnosti 1mM ZnCl ₂	63
19	Represe lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 100 μ M ZnCl ₂	64
20	Růstová křivka v přítomnosti 500 μ M CuSO ₄	65
21	Růstová křivka v přítomnosti 100 μ M NiCl ₂	65
22	Represe lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 100 μ M CuSO ₄	66
23	Represe lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 100 μ M NiCl ₂	67
24	Indukce lokusu <i>BP3082-BP3077</i> 36 μ M FeSO ₄	69

1 Úvod

Bakteriální patogen *Bordetella pertussis* je původcem závažného lidského onemocnění dýchacího traktu zvaného černý kašel, neboli pertuse. Jedná se o Gram-negativní kokobacil plně adaptovaný na člověka, který produkuje celou řadu faktorů virulence, umožňujících infekci a navozujících patologické změny v hostiteli. Mezi nejvýznamnější toxiny sekretované *B. pertussis* patří pertusový toxin a adenylátcyklázový toxin, dále bakterie disponuje adheziny, jako například fimbrie typu 2 a 3, pertaktin a filamentózní hemaglutinin. Přestože znalost jednotlivých faktorů virulence je na velmi dobré úrovni, stále zůstávají nezodpovězené klíčové otázky, týkající se přenosu onemocnění, příčin symptomů černého kašle a složení ideální vakcíny pro prevenci onemocnění.

Studium interakce patogenu s hostitelem je tedy klíčové pro porozumění mechanismům, které bakterie využívá pro invazi a infekci, množení a šíření v populaci. Bakteriální patogeny jsou v lidském organismu vystaveny celé řadě obranných funkcí imunitního systému. *B. pertussis* je po přichycení k epitelu dýchacích cest rozpoznána dendritickými buňkami, nebo alveolárními makrofágy, které spouští prozánětlivou interleukinovou kaskádu, jejímž úkolem je do místa infekce přilákat další buňky imunitního systému, především neutrofilní granulocyty. Ty mají spolu s makrofágy za úkol fagocytovat bakterie. Uvnitř fagolysozomu jsou bakterie vystaveny limitujícím koncentracím živin, vysoké koncentraci reaktivních forem kyslíku, sníženému pH a baktericidním látkám. Řada bakteriálních patogenů si však vyvinula způsob, jak se ubránit buňkám imunitního systému, nebo je dokonce využít k přežívání a pomnožení se. *B. pertussis* byla dlouhou dobu považována za striktně extracelulární bakterii, nicméně čím dál více zdrojů naznačuje schopnost tohoto patogenu přežít uvnitř hostitelské buňky. Tato strategie může přispívat k lepší migraci a kolonizaci dýchacích cest člověka. Blízce příbuzná *B. bronchiseptica* dokáže využívat volně žijící améby jako svůj rezervoár, který navíc umožňuje disperzi v prostředí, což by mohlo poukazovat na jistou preadaptaci *B. pertussis* k vnitrobuněčnému přežívání.

Během přežívání uvnitř hostitelských buněk je klíčové udržet homeostázu kovů v cytoplazmě. Především železo a mangan jsou neodmyslitelnými prvky, které jsou velmi důležité pro obranu proti reaktivním formám kyslíku. Není tedy překvapivé, že imunitní systém využívá limitace těchto prvků během infekce, například ve fagozomu. Vybalancovat zvýšenou potřebu těchto kovů s toxicitou spojenou s jejich kumulací v cytoplazmě a zároveň s nemožností jejich získávání z prostředí je jeden z mnoha problémů, kterým musí intracelulární bakterie čelit.

1.1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat lokus *BP3077-BP3082*, u kterého byla pozorována silně zvýšená míra exprese v intracelulárních bakteriích *B. pertussis* během infekce lidských THP-1 makrofágu. Na základě homologie těchto často blíže necharakterizovaných genů s jinými druhy bakterií byly navrženy následující experimentální cíle práce.

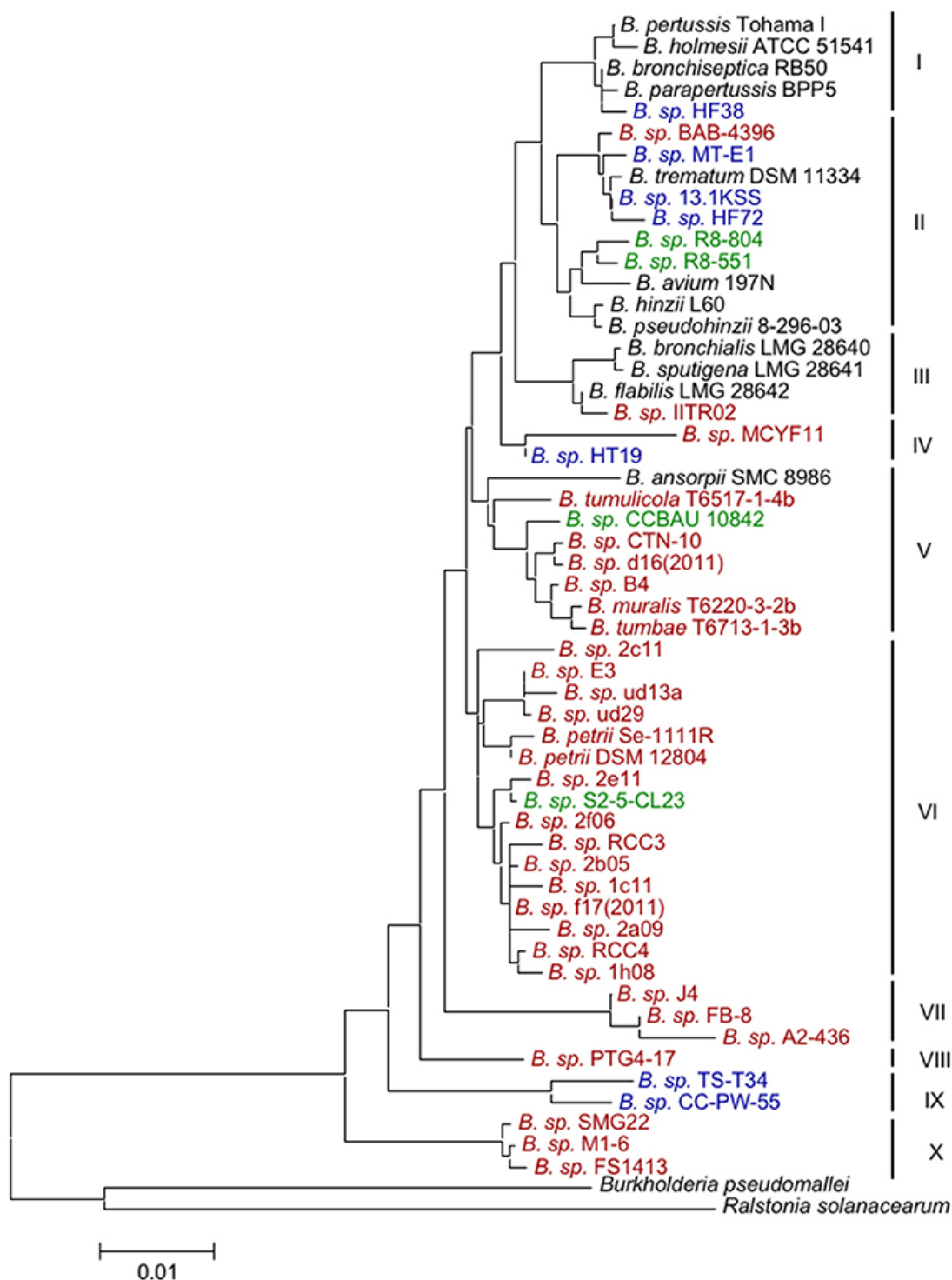
- Příprava mutant *B. pertussis* obsahující delece ve vybraných genech z lokusu
- Porovnání růstových vlastností delečních mutant a referenčního laboratorního kmene *B. pertussis* Tohama I (WT - **w**ild **t**ype) v různých podmínkách kultivace.
- Ověření míry exprese genů v různých kultivačních podmínkách pomocí kvantitativního PCR v reálném čase
- **Hypotéza:** Většina genů ze studovaného lokusu, u kterých byla zaznamenána vyšší míra exprese během intracelulárního přežívání v makrofázích byla zařazena mezi transportéry dvojmocných kovů. Vzhledem ke klíčové roli prvků jako je železo nebo mangan v obraně bakterie vůči ROS (**r**eactive **o**xygen **s**pecies) jsme očekávali vyšší potřebu těchto kovů během infekce a tedy i vyšší expresi jejich transportérů. Dále jsme předpokládali, že v přítomnosti toxických koncentrací železa a manganu *in vitro* budou deleční mutantny vykazovat horší růstové vlastnosti v porovnání s WT.

2 Přehled literatury

2.1 Rod *Bordetella* a jeho zástupci

Bakteriální rod *Bordetella* spadá do třídy *Betaproteobacteria* a jejím bezesporu nejznámějším zástupcem je *B. pertussis*. Nejlépe prozkoumané jsou tzv. klasické druhy, kam patří již zmíněná *B. pertussis* a dále *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*. Tyto druhy se řadí k lidským (*B. pertussis*, *B. parapertussis*), respektive savcím (*B. bronchiseptica*) patogenům, nicméně část druhů rodu *Bordetella* je zastoupena environmentálně žijícími bakteriemi vyskytujícími se ve vodě, nebo půdě (Soumana *et al.*, 2017). Mezi typické zástupce této skupiny patří *B. muralis*, *B. tumbae* a *B. tumulicola*, které byly nalezeny na nástěnných malbách v japonské hrobce (Tazato *et al.*, 2015). Dalším zajímavým zástupcem rodu *Bordetella* je *B. petrii*, která byla nalezena v různých prostředích, zahrnujících půdu, mořské houby a překvapivě i imunosuprimované pacienty (Wang *et al.*, 2007, Fry *et al.*, 2005). *B. pertussis* jako striktně lidský patogen postrádá tuto úroveň adaptability a není schopna přežívat environmentálně.

Z fylogenetických studií se ukazuje, že bakterie rodu *Bordetella* původně obývaly půdu, následně se adaptovaly na další prostředí. Klastry vyskytující se blíž k bázi fylogenetického stromu obsahují izoláty převážně žijící v půdě a naopak nejvíce odvozené klastry obsahují již zmiňované klasické druhy rodu *Bordetella* (Soumana *et al.*, 2017). Mezi výhradně lidské patogeny respiračního traktu patří kromě již zmíněných *B. pertussis* a *B. parapertussis* ještě *B. holmesii*. Pro tyto druhy není znám žádný zvířecí nebo přírodní rezervoár a šíří se tak pouze kapénkami v lidské populaci. Naproti tomu ostatní patogenní druhy se orientují převážně na savčí (*B. bronchiseptica*, poddruh *B. parapertussis* adaptovaný na ovce) a ptačí hostitele (*B. avium*, *B. hinzii*), které ale mohou napadat i lidské pacienty s oslabenou imunitou (Mattoo a Cherry, 2005).

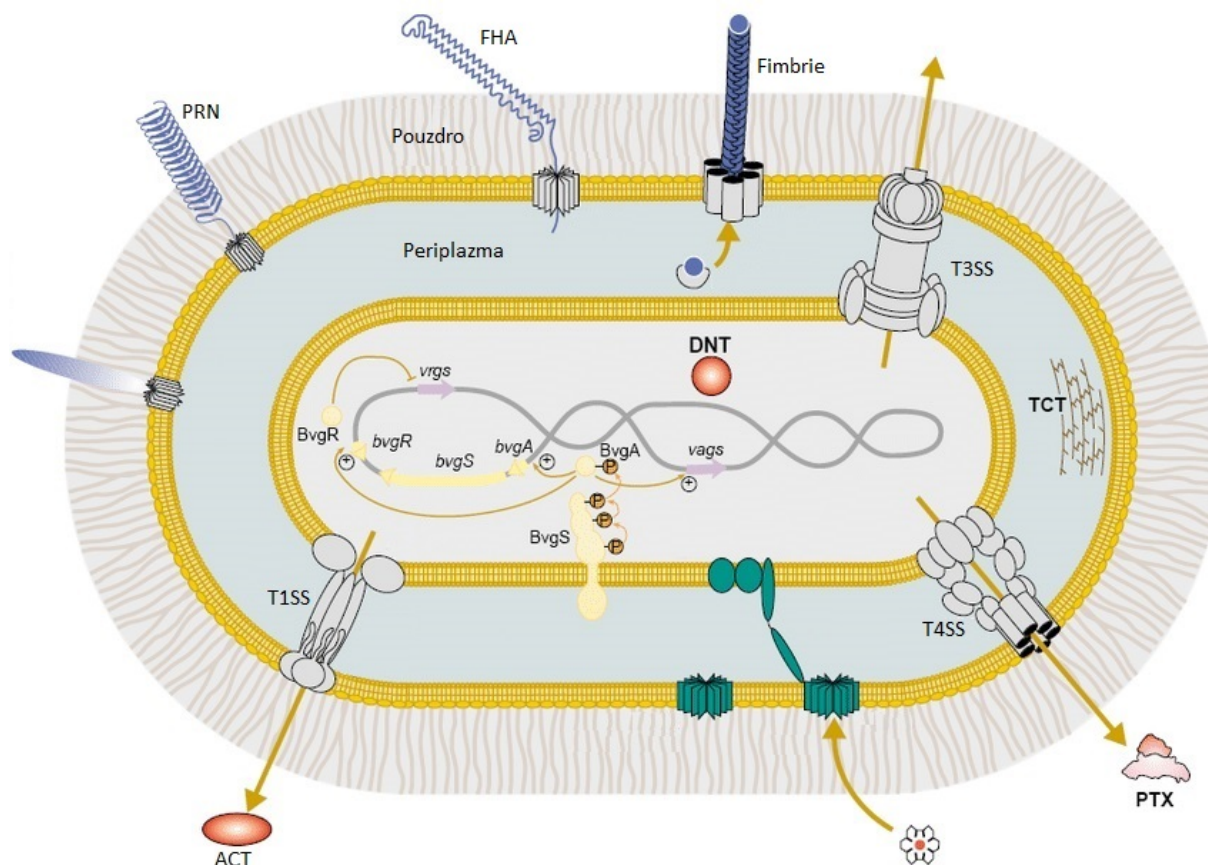


Obrázek 1: Fylogenetický strom rodu *Bordetella* – Na obrázku je schématicky znázorněn fylogenetický strom založený na sekvenaci 16S rRNA daných druhů. Červenou barvou jsou značeny izoláty z půdy, modrou barvou izoláty z vodních zdrojů, zelenou barvou izoláty asociované s rostlinami a černou barvou izoláty ze zvířat a člověka. Rod *Bordetella* se dělí do deseti kladů (značeno římskými číslicemi) ze kterých je nejlépe prozkoumaný první klad obsahující například *B. pertussis* a *B. bronchiseptica*. Bakterie *Burkholderia pseudomallei* a *Ralstonia solanacearum* jsou zde uvedeny jako zástupci příbuzných rodů v rámci *Betaproteobacteria*. Převzato (Soumana *et al.*, 2017).

2.1.1 *Bordetella pertussis*

Nejlépe prozkoumaným a nejvýznamnějším zástupcem rodu je *B. pertussis*. Způsobuje závažné a vysoce nakažlivé onemocnění respiračního traktu člověka zvané černý kašel. Toto onemocnění trvá zhruba šest až osm týdnů a dělí se na 3 stádia. Katarální stádium se vyznačuje rýmou, horečkou a bolestí hlavy a trvá týden až dva. Následuje paroxysmální fáze, pro kterou jsou charakteristické záchvaty dávivého kašle, které může doprovázet apnoe a zvracení, s trváním kolem šesti týdnů. Poté dochází ke snižování záchvatů kašle až k úplné rekonvalescenci pacienta. Onemocnění může být až život ohrožující, především u novorozenců a kojenců ale také pro jedince s oslabenou imunitou a starší lidi. Od padesátých let minulého století je dostupná vakcína proti pertusi, původně celobuněčná, která ovšem vyvolávala nežádoucí účinky. Proto se dnes k očkování využívá bezbuněčná vakcína připravena z jednotlivých bakteriálních antigenů. Dnes běžně využívaná vakcína hexacima proti černému kašli v kombinaci s dalšími onemocněními obsahuje pertusový toxoid, FHA (filamentózní **h**aemagglutinin) a dále difterický toxoid, tetanový toxoid, inaktivovaný virus poliomyelitidis, antigen hepatitidy B a polysacharid *Haemophilus influenzae*. Bohužel se ukazuje, že použití pouze některých antigenů vede k nekomplexní odpovědi imunitního systému a vakcína nemá odpovídající účinnost. Oproti celobuněčné vakcíně netrvá ochrana bezbuněčnou vakcínou tak dlouho a také nejspíše nedokáže zabránit kolonizaci hostitele, takže dochází ke zvyšování počtu bezpříznakových nosičů onemocnění (Warfel *et al.*, 2013, Althouse a Scarpino, 2015).

Za schopnost infekce a invaze hostitele a za projevy onemocnění jsou zodpovědné faktory virulence, kterých *B. pertussis* produkuje celou řadu. Patří sem toxiny, jako ACT (**a**denylát**c**yklázový **t**oxin), PTX (**p**ertusový **t**oxin), DNT (**d**ermonekrotický **t**oxin), TCT (**t**racheální **c**ytotoxin) a LOS (**l**ipooligosacharid). Dále adheziny, mezi které patří PRN (**p**ertaktin), FHA a fimbrie typu 2 a 3. Svojí roli v patogenicitě zastává i sekreční systém typu 3 s efektorovým proteinem BteA.



Obrázek 2: Faktory virulence *B. pertussis* – Obrázek schematicky znázorňuje bakteriální buňku *B. pertussis* s vyznačenými faktory virulence, transportními systémy a regulačním dvoukomponentovým systémem BvgAS. Z levého horního okraje po obvodu jsou to PRN, FHA, fimbrie, transportní systém typu 3, TCT, PTX a jeho transportní systém typu 4, ACT a jeho transportní systém typu 1 a v cytoplazmě buňky DNT. Dále je v cytoplazmě znázorněna kontrola genové exprese tzv. *vags* (virulence activated genes), nebo *vrgs* (virulence repressed genes) pomocí systému BvgAS. Převzato a upraveno (Locht *et al.*, 2001).

Kontrolu exprese faktorů virulence zajišťuje dvoukomponentový systém signální transdukce BvgAS, kde protein BvgS plní funkci senzorové transmembránové kinázy a BvgA zastává funkci transkripčního regulátoru. Na jaké signály z vnějšího prostředí systém reaguje *in vivo* není doposud známo, nicméně k inhibici BvgAS se v laboratorních podmínkách využívá síran hořečnatý nebo kyselina nikotinová (Melton a Weiss, 1989). Bakterie díky tomuto systému může přepínat mezi *Bvg*⁺ (virulentní), *Bvg*ⁱ (přechodnou) a *Bvg*⁻ (avirulentní) fází, přičemž každá z nich má pravděpodobně důležité místo v průběhu infekce. Pro časnou fázi infekce, která se vyznačuje produkcí adhezinů, dále pro modulaci imunitní odpovědi a nakonec k destrukci buněk epitelu plic, pro které je nezbytná sekrece toxinů, je charakteristická fáze *Bvg*⁺ (Cotter a Miller, 1994). Při přenosu patogenu z člověka na člověka prostřednictvím kapének je bakterie v *Bvg*ⁱ fázi, která napomáhá přežití v nepříznivých podmínkách (Cotter a Miller, 1997). Význam *Bvg*⁻ fáze, při které nejsou produkovány faktory virulence není zcela jasná, nicméně se zdá, že hraje roli v intracelulárním přežívání ve fagozomu makrofágů (Friedman *et al.*, 1992, Farman *et al.*, 2023).

2.1.2 *Bordetella bronchiseptica*

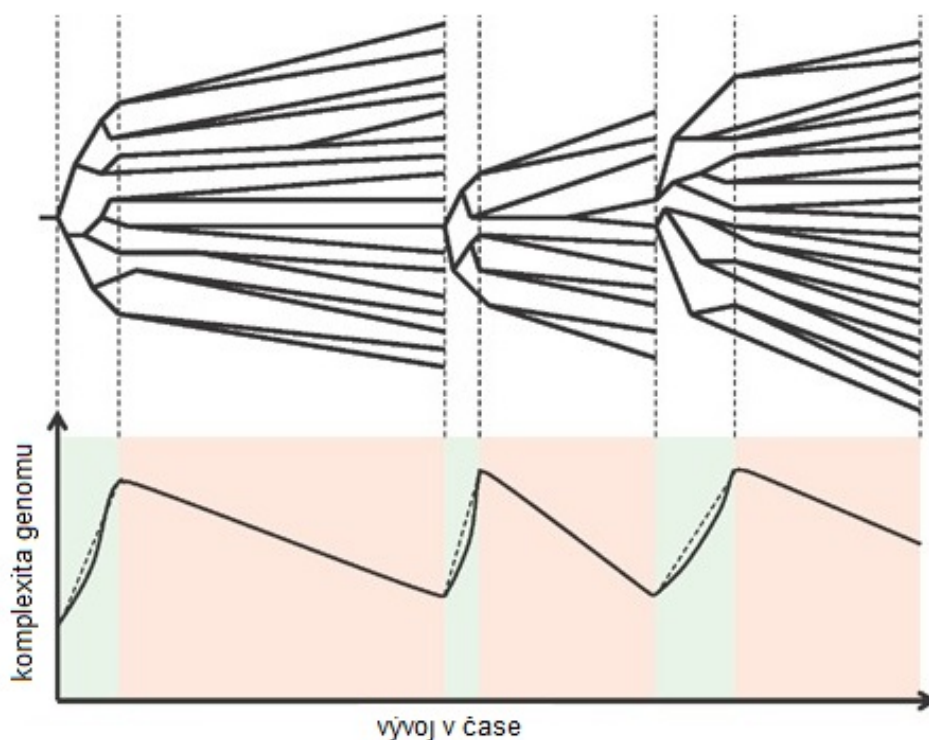
Nejblíže příbuzná bakterie *B. pertussis*, která je významným savčím patogenem a zároveň přežívá mimo hostitele v prostředí je *B. bronchiseptica*. Na začátku dvacátého století byla izolována ze psů trpících tzv. psincovým kašlem, vysoce nakažlivým onemocněním dýchacího ústrojí a dostala název *Bacillus bronchicanis* (Ferry, 1912). Později se ukázalo, že dokáže způsobovat respirační onemocnění u celé řady savců a kolonizovat dýchací cesty imunosuprimovaných lidí (Woolfrey a Moody, 1991). Stejně jako *B. pertussis* disponuje širokou paletou faktorů virulence, mezi které patří adheziny jako FHA, PRN a fimbrie, dále produkuje ACT a na rozdíl od *B. pertussis* je motilní a tvoří funkční bičík. Další vlastnost, kterou sdílí s *B. pertussis* je regulace virulence pomocí dvoukomponentového systému BvgAS, díky kterému může přepínat mezi virulentní (*Bvg*⁺), přechodnou (*Bvg*ⁱ) a avirulentní (*Bvg*⁻) fází na základě vnějších podnětů (Mattoo a Cherry, 2005).

2.2 Adaptace na patogenní způsob života u rodu *Bordetella*

Předpokládá se, že *B. pertussis* se vyvinula z předka velice podobného *B. bronchiseptica*, nicméně se později zcela adaptovala na lidského hostitele, zatímco *B. bronchiseptica* si zachovala poměrně široké hostitelské spektrum a schopnost přežívat i mimo savčí or-

ganizmus (Diavatopoulos *et al.*, 2005). Původně byli patogenní zástupci rodu *Bordetella* považovány za striktně extracelulární bakterie, které kolonizují epitel respiračního traktu. V posledních několika dekádách se však ukazuje stále víc důkazů o tom, že tyto bakterie mohou využít intracelulární prostředí imunitních buněk hostitele jako svoji niku (Friedman *et al.*, 1992, Y. Lamberti *et al.*, 2008).

Wolf a Koonin navrhli pro evoluci bakteriálních patogenů tzv. bizafický model evoluce, kdy se střídá fáze získání genů s fází kdy se bakteriální genom redukuje (Wolf a Koonin, 2013). Zisk nové genetické výbavy prostřednictvím horizontálního genového přenosu může bakterii poskytnout důležitou vlastnost, která umožní přizpůsobení se novému prostředí. U patogenů to může být nabytí faktorů virulence, které napomohou k infekci hostitele, dále obranné mechanismy vůči imunitnímu systému, ale také rezistence na antibiotika. S obsazením nové niky se dále upravuje životní strategie bakterie dle okolních podmínek. S postupující specializací na svého hostitele dochází u patogenů ke ztrátě významu mnoha genů, které byly dříve nezbytné pro environmentální přežívání. V důsledku tohoto procesu dochází k redukcí genomu často skrze rekombinace mezi inserčními sekvencemi. Zbylé nevyužívané geny akumulují mutace a nakonec pseudogenizují. Je zajímavé, že u některých genů, je jejich pseudogenizace nezbytná, aby došlo k adaptaci na daného hostitele. Funkčnost takovýchto genů je pod negativní selekcí a nazývají se antivirulenční geny.



Obrázek 3: Bizafický model evoluce – Schéma znázorňuje vývoj komplexity genomu v čase. V horní polovině jsou naznačeny fáze speciace v čase střídající se s fázemi bez speciace. V dolní polovině grafu jsou pak patrné střídající se doby zvyšující (značeno zelenou barvou) a snižující (značeno červenou barvou) komplexitu genomu, přičemž zisk genů koresponduje s fází kladogeneze v horní polovině obrázku a redukce genomu souvisí s obdobím speciační stáze. Převzato a upraveno (Wolf a Koonin, 2013).

Na základě komparativní analýzy genomů *B. pertussis* a *B. parapertussis*, jako zástupců striktně lidských patogenů a *B. bronchiseptica* jakožto bakterie schopné přežívání jak v prostředí celé řady savčích hostitelů, tak i mimo ně, byla zaznamenána celá řada inaktivovaných genů u bakterií asociovaných pouze s lidským hostitelem. Stejně jako u *B. pertussis* se i u *B. parapertussis* předpokládá vývoj ze stejného předka podobnému *B. bronchiseptica*, takže tyto tři druhy sdílejí až 98% sekvenční shody v DNA. Hlavním důvodem ztráty funkce genů a delece a přestavby regionů v genomu bylo enormní rozšíření inzerční sekvenční IS481 u *B. pertussis*. Konkrétně došlo k pseudogenizaci celkem 358 genů a přestavbě genomu zapříčiněnou homologní rekombinací u *B. pertussis* a 200 genů u *B. parapertussis* způsobené inzercí IS481, zatímco u *B. bronchiseptica* bylo nalezeno pouze 19 takto poškozených genů. *B. pertussis* ztratila schopnost některých funkcí, převážně transportu, metabolismu malých molekul (jako například syntetizovat *de novo* cystein), produkovat některé autotransportéry a další membránové proteiny. Kromě zisku faktorů virulence, které tyto bakterie sdílí je zde patrný velký efekt inaktivace genů, který naopak určuje užší hostitelské spektrum vyvážené větší patogenitou (Parkhill *et al.*, 2003).

Podobný jev, kdy se vlivem ztráty genů bakterie více specializuje z oportunistického patogena na hostitele lze sledovat i u bakterie *Yersinia pestis*, původce moru. Oproti předkovi *Y. pseudotuberculosis* došlo ke ztrátě genů odpovědných za enteropatogenicitu (např. *invasin* a *YadA*), adhezi, motilitu a další funkce, přesto došlo ke zlepšení transmise bakterie z vektoru do hostitele a k větší míře invazivity a patogenity (Parkhill *et al.*, 2001).

V posledních letech se také ukazuje význam vakcín v evoluci *B. pertussis*. Následkem očkování acelulární vakcínou se objevují kmeny, které vykazují různé mutace v genech kódujících určité antigeny. Naopak v zemích využívajících celobuněčné vakcíny tendence ke vzniku takových kmenů chybí. Jedním z antigenů, který je pod selekčním tlakem acelulárních vakcín je adhezin PRN, který napomáhá přežití bakterie při zánětlivé odpovědi organismu a zároveň indukuje tvorbu protilátek, díky kterým vzniká imunologická paměť (King *et al.*, 2001, Inatsuka *et al.*, 2010). V zemích, kde je využívána acelulární vakcína roste počet klinických izolátů, které mají různým způsobem poškozený gen pro PRN. Překvapivě nedochází ke snížení fitness patogena, nejspíš tedy dochází ke kompenzaci funkce PRN jinými adheziny (Ma *et al.*, 2021). Který antigen ale nelze kompenzovat a u něhož též došlo k delecí celého operonu kvůli inzerci IS481 elementu je PTX. Klinický izolát neprodukující PTX nebyl schopen v myším modelu dosáhnout efektivní kolonizace plic a nedocházelo k letálnímu průběhu onemocnění ani při vysokých infekčních dávkách, přestože byl kmen stále schopný indukovat apoptózu u makrofágů a napadat epitelální buňky (Bouchez *et al.*, 2009).

Způsob, jakým se environmentální bakterie mohou adaptovat na životní strategii asociovanou s intracelulárním prostředím a který byl několikrát popsán u řady bakterií je soužití s volně žijícími prvky. Modelovým organismem pro výzkum takovéto interakce se stala bakterie *Legionella pneumophila*, původce takzvané legionářské nemoci, projevující se zápallem plic, v lehčích případech horečkou a bolestí hlavy. Je to zástupce intracelulárně přežívajících bakterií a právě schopnost přežít uvnitř hostitelské buňky se u ní nejspíš vyvinula jako ochrana před jednobuněčnými organismy. Genetická výbava, která je zapotřebí pro přežití po pohlcení prvokem se ukazuje jako dobrý předpoklad pro intracelulární přežívání v imunitních buňkách hostitele. *L. pneumophila* je nejčastěji asociována s rodem *Acanthamoeba* (Fields, 1996). Stejný trend můžeme pozorovat i u dalších intracelulárních patogenů, jakou jsou bakterie rodů *Chlamydia*, *Rickettsia* a *Francisella* (Amann *et al.*, 1997, Fritsche *et al.*, 1999, Beier *et al.*, 2002).

U environmentálně žijící *B. bronchiseptica* byla pozorována adaptace na intracelulární prostředí hlenky *Dictyostelium discoideum*. Předpokládá se, že původní strategií bylo

předejít predaci jednobuněčnými organizmy a teprve následně se bakterie přizpůsobila a začala využívat *Dictyostelium* jako svůj rezervoár, popřípadě vektor k šíření ve sporách hlenky. Nejenom, že vnitřní prostředí buňky chrání bakterie před vnějšími vlivy, zároveň může poskytovat strategickou výhodu oproti ostatním druhům bakterií bez intracelulární niky. Bakterie pro udržení se ve vnitrobuněčném prostředí setrvává v *Bvg*⁻ fázi, kdy nedochází k produkci faktorů virulence nebo k tvorbě dalších zbytných struktur. *B. bronchiseptica* však nevyužívá hlenku pouze pro bezpečné útočiště, bylo ukázáno, že bakterie nejenom přežívají ale také se i množí (Taylor-Mulneix *et al.*, 2017).

2.2.1 Intracelularita u *B. pertussis*

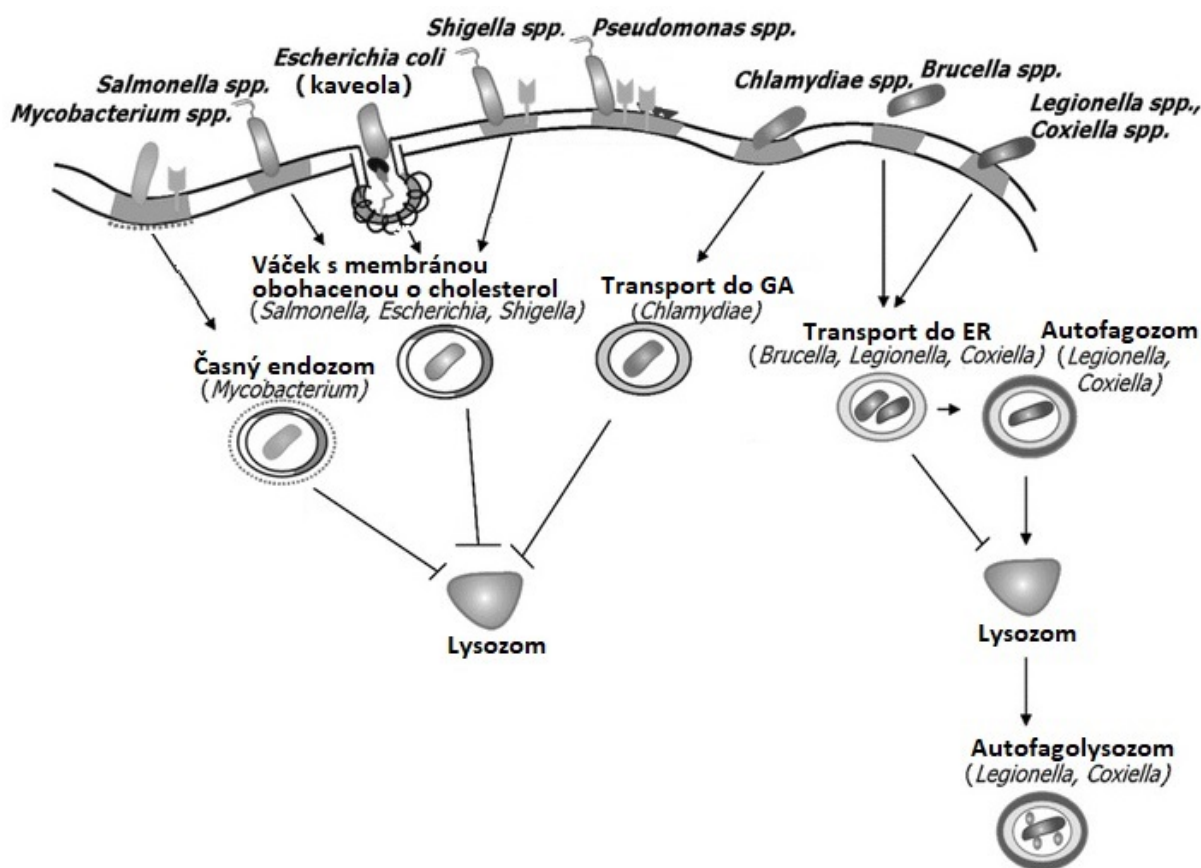
Původní představa o *B. pertussis* byla taková, že se jedná o extracelulární patogen kolonizující řasinkový epitel plic. Nicméně už na konci minulého století bylo prokázáno, že tyto bakterie lze nalézt v intracelulárním prostředí imunitních buněk, konkrétně makrofágů *in vivo* a dalších buněčných typů *in vitro*, což bylo prokázáno na ledvinách makaka (Friedman *et al.*, 1992, Hellwig *et al.*, 1999, Crawford a Fishel, 1959). Jako další zástupci z rodu *Bordetella*, u kterých byla prokázána schopnost přežití v intracelulárním prostředí makrofágů jsou *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis* (Guzman *et al.*, 1994, Gorgojo *et al.*, 2012).

Makrofágy patří mezi antigen prezentující buňky a zároveň mají schopnost fagocytózy. Mají esenciální roli v buněčné imunitě proti mikrobiálním patogenům. Po pohlcení bakterie makrofágem dochází k maturaci fagozomu, produkci ROS a k fúzi s kyselými kompartmenty buňky – lysozomy. To má za následek snížení pH a vystavení hydrolázám, čímž jsou bakterie eliminovány. V průběhu evoluce si však různé patogeny vyvinuly obranné mechanismy proti této imunitní odpovědi. Některé bakterie dokáží odolat nehostinnému prostředí fagolysozomu, další před ním nachází útočiště v cytoplazmě, popřípadě dokážou bránit snížení pH časného endozomu. Jaký přesně mechanismus využívá *B. pertussis* ovšem není znám, nicméně většina opsonizovaných a fagocytovaných buněk umírá a přeživší bakterie setrvávají a množí se v endosomech, ve kterých nedošlo ke snížení pH (Y. A. Lamberti *et al.*, 2010). Nízké pH ale zdaleka není překážkou pro *B. bronchiseptica*, která jako někteří zástupci z čeledi *Enterobacteriaceae* dokáže přežít v plně maturovaném fagolysozomu (Schneider *et al.*, 2000).

Poslední zástupce tzv. klasických druhů rodu *Bordetella*, *B. parapertussis* využívá několik dalších ochranných strategií. Zprvu brání opsonizaci protilátkami díky nemodifika-

nému LPS (**L**ipopolysacharid), který na rozdíl od LOS *B. pertussis* nepostrádá O-antigen, což snižuje pravděpodobnost fagocytózy (Preston *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2009). Další využití LPS tkví v jeho kolokalizaci s lipidickými rafty v membráně fagozomu. Endozomy s vyšším obsahem těchto na cholesterol bohatých mikrodomén v membráně mají menší schopnost fúze s dalšími membránovými organelami a nedochází tedy k maturaci fagolysozomu (Gorgojo *et al.*, 2014). Tento mechanismus byl popsán i u *Brucella suis*, nicméně detaily nejsou známy (Porte *et al.*, 2003). Jako poslední ilustrace adaptace na nehostinné prostředí lze zmínit produkci barviva pyomelaninu, který chrání buňku před různými stresory, v kontextu fagozomu například ROS (Hiramatsu *et al.*, 2021).

Bakteriální patogeny jsou schopny aktivní invaze i do buněk, které nejsou profesionálními fagocyty. Využití plicních epiteliálních buněk k úkrytu před imunitním systémem je známým fenoménem u celé řady bakterií. Jedním ze způsobů, jak se bakteriální patogeny dostávají do primárně nefagocytujících buněk je za využití lipidických raftů. Bakterie interagují s molekulami typicky se nacházejícími v těchto membránových doménách, čímž se zahajuje signální kaskáda, která má za následek remodelaci cytoskeletu eukaryotické buňky a dochází k endocytóze patogenu. Bakterie se zneužitím těchto buněčných drah dostanou do buňky a nedochází k fúzi endozomu s lysozomy, jako tomu je u fagocytózy (Hartlova *et al.*, 2009).



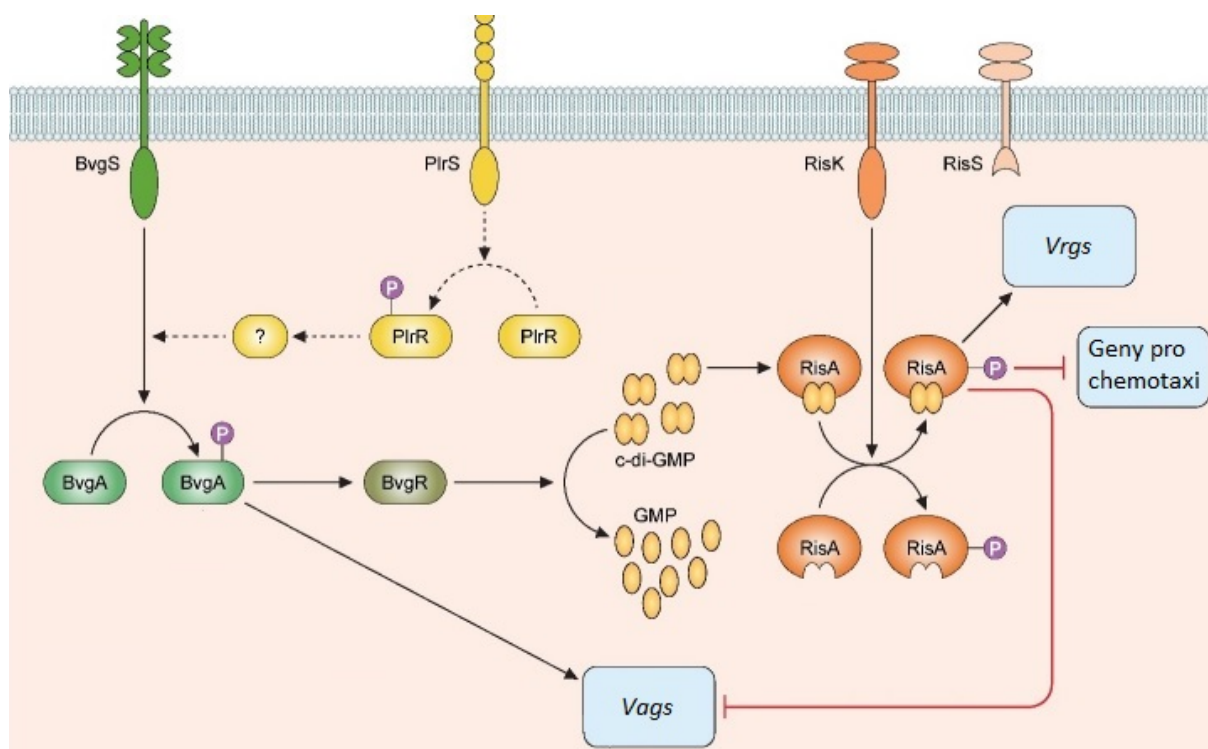
Obrázek 4: Invaze bakteriálních patogenů do hostitelské buňky s využitím lipidických raftů – Ze schématu je patrné, jakým způsobem se určité bakterie dostávají do hostitelských buněk s využitím receptorů typických pro lipidické rafty. Šedě zvýrazněné části membrány jsou lipidické rafty, některé obsahují receptory známé svou interakcí s konkrétními druhy bakterií, dále jsou znázorněny různé cesty váčků obsahujících bakterie, kdy se většina z nich vyhne fúzi s lysozomem, což usnadňuje bakteriím intracelulární přežití. Zkratky využívané pro toto schéma: GA - Golgiho aparát, ER - endoplazmatické retikulum. Převzato a upraveno (Hartlova *et al.*, 2009).

Schopnost *B. pertussis* vnikat do buněk plicního epitelu byla pozorována ve vzorcích plicní tkáně dětí s černým kašlem (Paddock *et al.*, 2008). Jakým způsobem je bakterie internalizována do hostitelské buňky, nebo jak přežívá v endozomu není dosud známo. Nicméně způsob indukce endocytózy je spojován s jedním z faktorů virulence, konkrétně s FHA. U toho byla zjištěna afinita k cholesterolu, který není v membráně eukaryotických buněk zastoupen rovnoměrně, ale tvoří již zmiňované lipidické rafty, uskupení specifických molekul shlukujících se a organizujících různé signální molekuly v rámci membrány (Y. Lamberti *et al.*, 2009). Zdá se, že cholesterol spolu s FHA nejen zprostředkovává adherenci k bakterie k buňce epitelu, ale také samotnou internalizaci bakterie. Jako další klíčoví hráči se ukazují být tyrosinkinázy účastníci se drah spojených s endocytózou za pomoci lipidických raftů. Na rozdíl od fagocytózy, kde z cytoskeletu hraje nejdůležitější roli aktin, se zde uplatňuje především využití mikrotubulů. Stejně jako u makrofágů, i v epiteliálních buňkách se *B. pertussis* vyhýbá fúzi s lysozomem a zůstává v kompartmen-

tech bez sníženého pH. Přestože nebyl zaznamenán nárůst počtu bakterií, což implikuje, že se buňky v intracelulárním prostředí nemnoží, bylo pozorováno, že se bakterie dostávají z hostitelské buňky živé a dokáží repopulovat kultivační médium (Y. Lamberti *et al.*, 2013).

2.2.2 Regulace genové exprese v kontextu intracelulárního přežívání *B. pertussis*

Razantní změna z extracelulárního do intracelulárního prostředí si žádá komplexní odpověď mikroorganismu. Hlavní regulační mechanismy popsané u *B. pertussis* jsou dvoukomponentové systémy BvgAS a RisAK, které jsou nejvíc spojovány s regulací virulence, reakcí na oxidativní stres a perzistenci v prostředí plicního epitelu. Systém RisAK se skládá z RisK senzorové kinázy a RisA transkripčního regulátoru (Jungnitz *et al.*, 1998, Stenson *et al.*, 2005). Spolu se systémem signální transdukce BvgAS se podílí na udržení výše zmíněných fází Bvg^+ , Bvg^- a Bvg^i , ačkoliv je na něm transkripčně nezávislý (Chen *et al.*, 2017). V avirulentní Bvg^- fázi RisA pozitivně reguluje *vrgs* a negativně reguluje některé faktory virulence, zatímco v Bvg^i a Bvg^+ fázi napomáhá expresi genů pro chemotaxi a motilitu. Tato kooperace mezi systémy je zapříčiněna BvgR, který sám patří do skupiny *vags* a je tedy pozitivně regulován aktivním BvgA. Bylo pozorováno, že ovlivňuje aktivitu RisA, na základě štěpení cyklického di-GMP na GMP, na jehož koncentraci je tento transkripční faktor závislý. Snížení hladiny cyklického di-GMP má za následek neaktivní RisA, což zapříčiňuje již zmíněnou represi *vrgs* (Coutte *et al.*, 2016).



Obrázek 5: Regulace genové exprese dvoukomponentovými systémy u *B. pertussis* – Zelenou barvou je znázorněn systém signální transdukce BvgAS. Po fosforylaci BvgA pomocí kinázy BvgS dochází k dimerizaci BvgA a k pozitivní regulaci *vags*, zároveň je podpořena produkce BvgR, který hydrolyzuje cyklický di-GMP na GMP, čímž negativně ovlivňuje aktivitu RisA a nepřímo negativně ovlivňuje expresi *vrgs*. Oranžově je znázorněn systém RisAK, jehož transkripční regulátor RisA po fosforylaci kinázou RisK pozitivně reguluje *vrgs* a zároveň negativně ovlivňuje geny pro chemotaxi a *vags*. Žlutou barvou je pak značen systém PlrSR, který dosud neznámým mechanismem napomáhá udržovat aktivní BvgAS systém a podílí se tak na ustanovení a udržení *Bvg*⁺ fáze (Bone *et al.*, 2017). Převzato a upraveno (Belcher *et al.*, 2021).

Adaptace na intracelulární prostředí makrofágu způsobuje až třetinovou změnu v genové expresi bakterie, na které se podílí celá řada regulačních mechanismů a jejich podrobná identifikace bude jistě předmětem zkoumání. Na základě analýzy transkriptomů *B. pertussis* a makrofágů buněčné linie THP-1 byly určeny skupiny genů, které byly ovlivněny změnou prostředí do několika funkčních skupin.

Jednou z oblastí zájmu je exprese faktorů virulence. V kontextu intracelulárního prostředí nemá pro bakterii význam produkovat adheziny či toxiny, jejichž funkce je vázaná na vnější kontakt s hostitelskou buňkou a nejsou tedy potřebné pro přežívání uvnitř hostitelské buňky. Například ACT, jehož exprese je v intracelulárních buňkách snižena, má za normálních okolností na buňky apoptotický vliv (Khelef *et al.*, 1993), což pro intracelulární přežívání v hostiteli není výhodné. Antiapoptotický vliv byl popsán u celé řady genů, které jsou pozitivně ovlivněny u makrofágů během intracelulárního přežívání *B. pertussis*. Jde například o inhibitory serinových proteáz (tzv. serpins) a inhibitor kaspáz BIRC3. Mezi dalšími negativně regulovanými faktory virulence jsou DNT, PTX, PRN, FHA, fimbrie,

sekreční systém typu 3, LOS a další. Zároveň je potlačena exprese hlavního virulenci regulujícího systému BvgAS, včetně genu pro BvgR a bakterie tak setrvává v *Bvg*⁻ fázi (Petráčková *et al.*, 2020, Farman *et al.*, 2023).

Další důležitou skupinou jsou geny ovlivňující reakci na různé stresory. Ve větší míře lze pozorovat produkci regulátorů genové exprese, například sigma faktory *rpoE* a *rpoH*, nebo také post-transkripční regulátor RNA chaperon Hfq, pod jejichž regulon spadají funkce jako ochrana před vnějšími stresory, ochrana před poškozením proteinů a DNA vlivem teplotního šoku, ochrana před oxidativním stresem a další nezbytné schopnosti umožňující přežívání ve fagozomu (Hayes *et al.*, 2020, Petráčková *et al.*, 2020). Jedno z možných řešení větší odolnosti bakteriální buňky je produkce komponentů pro remodelaci buněčné stěny. Hlavně v pozdějších časových bodech po infekci THP-1 buněk bakteriemi byla pozorována zvýšená exprese genů pro tyto účely, například *BP0769* kódující D-aminoacyl transferázu, lokus *BP0396-0399* zodpovědný za složení LPS a remodelaci lipidu A, již zmíněný *rpoE* a další. Oproti tomu byla zaznamenána snížená produkce některých porinů vnější membrány zajišťujících transport malých molekul. Snížená exprese se týká i genů pro tvorbu peptidoglykanu a LOS, což dohromady ukazuje, že nedochází k syntéze buněčné stěny a jejích dalších komponent, ale k modifikaci již existujících molekul (Farman *et al.*, 2023).

Mezi další stresory, kterým musí *B. pertussis* v intracelulárním prostředí čelit je suboptimální pH. Nástroje, které *B. pertussis* využívá k ochraně před sníženým pH jsou například zvýšená produkce importéru hořčíku (kódovaný genem *BP0414*), či snížená exprese *pha* lokusu, který kóduje draslíkovou efluxní pumpu (Farman *et al.*, 2023). Gen *BP0414* je homologický k *mgtC*, genu kódujícímu importér hořčíku, který je využíván patogenními bakteriemi pro udržení hladiny hořečnatých iontů, což vede k přizpůsobení na mírně kyselé prostředí časného endozomu. Hořčík hraje v buněčných procesech obrovskou roli, je to jeden z nejvíce zastoupených dvouvalných iontů v cytoplasmě. Funguje jako kofaktor mnohých enzymů, dále stabilizuje makromolekulární komplexy, slouží k neutralizaci nukleových kyselin, nukleotidů a fosfolipidových hlaviček. *MgtC* také hraje roli v hospodaření bakterie s ATP, kdy při snížené koncentraci hořečnatých iontů nebo při poklesu pH dochází k inhibici F₁F₀ ATPsyntázu (Cafiero *et al.*, 2018, Lee *et al.*, 2013, Belon a Blanc-Potard, 2016).

Endozom imunitních buněk není prostředí bohaté na živiny. Nutriční stres je tak další z faktorů, proti kterému si musí patogenní bakterie vytvořit obranné mechanismy. Mezi hlavní negativně ovlivněné hráče metabolických drah patří komplexy elektron-

transportního řetězce, jako například sukcinát dehydrogenáza, ATPsyntáza a NADHdehydrogenáza. Z dalších negativně regulovaných komponentů dýchacího řetězce lze vyjmenovat ještě oxidázy ubichinonu a cytochromu cbb3. Zároveň byla potlačena exprese genů glykolýzy, kódující například glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu, fosfoglycerátkinázu, nebo laktátdehydrogenázu. Intracelulární *B. pertussis* však využívá alternativní dráhy pro získávání potřebných živin. Pozitivně regulované jsou geny pro glyoxalátovou dráhu, transport a syntézu větvených aminokyselin a katabolismus mastných kyselin. Pro lepší efektivitu transportu byly modulovány geny pro tzv. bugs, neboli bordetella uptake genes, kódující periplazmatické proteiny vyvazující specifické molekuly, které pak dopravují k jejich transportérům. Během intracelulárního přežívání *B. pertussis* je také ovlivněn metabolismus síry, například jsou negativně regulované geny důležité pro import methioninu. Naopak geny pro export a katabolismus cysteinu jsou regulovány pozitivně (Farman *et al.*, 2023).

Důležité prvky, jejichž přísun je v intracelulárním prostředí značně limitovaný jsou esenciální kovy. Vysoká míra exprese byla pozorována u již zmíněného BP0414, importéru hořčnatých iontů ale také lokusu *BP3082-BP3080* kódující předpokládaný ABC transportér manganu a *BP3078*, hypotetický exportér niklu. Produkty kódované geny *BP3082-BP3080* sdílí homologii s importérem manganu SitABCD využívaným bakterií *Salmonella enterica* sér. *Typhimurium*. Tento protein slouží jako alternativní importér manganu k primárnímu MntH v podmínkách s vyšším pH (Kehres *et al.*, 2002b). Pro intracelulární bakterie je klíčové vyřešit otázku nedostatku železa. Dvojmocné ionty železa jsou esenciální kofaktory v celé řadě enzymů, bez kterých buňka nedokáže fungovat. Během časně infekce *B. pertussis* nedochází k expresi genů pro získávání železa z prostředí a není indukována odpověď na limitaci tímto prvkem. Nicméně v pozdější fázi infekce byly pozitivně regulovány geny pro alkaligin a enterobaktin, které slouží jako siderofory (Farman *et al.*, 2023).

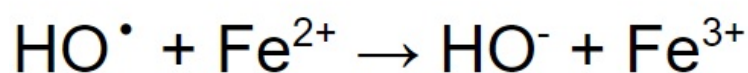
Poslední zmíněnou kategorií genů modulovaných u internalizovaných bakterií jsou geny pro ochranu před ROS. Faktory chránící před oxidativním stresem, které jsou exprimovány ve vyšší míře jsou například Dps, DNA vazebný protein, který zabraňuje poškození peroxidem vodíku, Mn-dependentní superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza, regulační systém SoxSR a další. Kromě přímé deaktivace ROS je třeba opravit již poškozené molekuly. K tomu slouží například pozitivně regulované methionin reduktázy MsrB, MsrP a MsrQ, nebo ABC transportér BP2394-BP2397 importující pravděpodobně glutathion (Farman *et al.*, 2023).

2.3 Důležitost vybraných kovů pro bakterie

V následující kapitole bude kladen důraz na dva důležité kovy, které jsou esenciální nejen pro intracelulárně přežívající bakterie. Těmi prvky jsou železo (Fe) a mangan (Mn). V jednotlivých částech bude představena funkce těchto kovů v rámci bakteriální buňky a jejich přínos pro bakterii internalizovanou ve fagozomu.

2.3.1 Železo

Železo je nejvyužívanějším přechodným prvkem v živých systémech. Ve formě Fe^{2+} respektive Fe^{3+} je hojně využívaným kofaktorem různých proteinů, může být zainkorporován ve formě samotného Fe^{2+} , železo-sirných klastrů, nebo hemových struktur v rámci metaloproteinů. Klíčovou vlastností Fe, díky které je využíváno v mnoha reakcích je jeho redoxní potenciál zajišťující průběh redoxních reakcí v organismu. Namátkově lze zmínit proteiny jako je akonitáza, kataláza, cytochromy, peroxidáza, Fe-dependentní superoxid dismutáza, které by bez železa nemohly plnit svoji funkci. Na železe závislé enzymy katalyzují reakce spadající pod respiraci, centrální energetický metabolismus buněk ale také opravy DNA, ochranu před ROS a další. Volně se vyskytující Fe^{2+} může sice neutralizovat superoxidový radikál, čímž vzniká H_2O_2 , ten však v reakci s Fe^{2+} tvoří hydroxylový aniont a hydroxylový radikál, které jsou velmi reaktivní a vysokou měrou poškozují další molekuly, včetně DNA. Tento jev popisuje tzv. Fentonova reakce, která je znázorněna na následujícím obrázku 6.



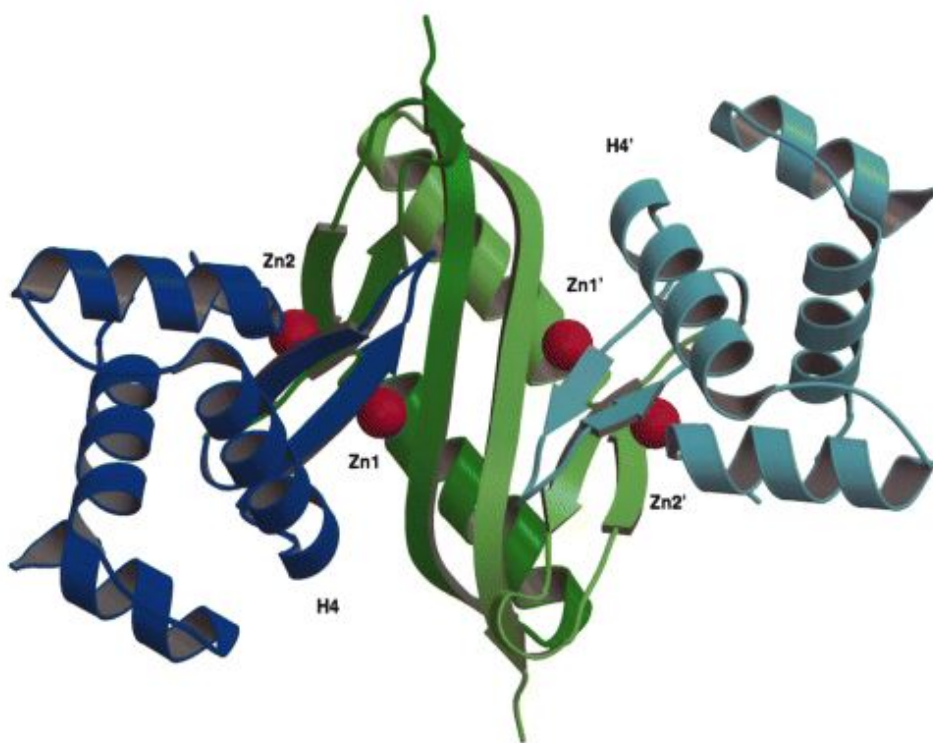
Obrázek 6: Fentonova reakce – Na prvním řádku je znázorněná reakce železnatého kationtu s peroxidem vodíku za vzniku hydroxylového radikálu, hydroxylového aniontu a železnatého kationtu. Druhý řádek pak reprezentuje reakci železnatého kationtu s hydroxylovým radikálem, kdy vzniká hydroxylový aniont a železnatý kationt.

Nejenom že dochází k tvorbě ROS ale také klesá využitelnost železa, neboť Fe^{3+} je oproti Fe^{2+} hůře rozpustný a tedy méně biologicky dostupný. Z tohoto důvodu je především při aerobním metabolismu volné železo ve formě Fe^{2+} vázáno v enzymech a Fe^{3+}

v zásobních proteinech. Skladování železa v oxidované formě Fe^{3+} zajišťují proteinové komplexy z rodiny ferritinů, konkrétně ferritin, bakterioferritin obsahující hemovou skupinu a Dps protein. Jejich funkcí je vyvázat a oxidovat volné kationty Fe^{2+} pomocí kyslíku u ferritinu a bakterioferritinu, nebo peroxidu vodíku u Dps (Ebrahimi *et al.*, 2014).

Pro intracelulární bakterie je velmi důležité optimalizovat využívání zdrojů, protože fagozom není prostředí bohaté na nutrienty. Naopak jako jednu ze strategií k eliminaci bakterií využívají hostitelské buňky zastavení přístupu živin do fagozomu. Malé peptidy využívané pro získání železa z prostředí se nazývají siderofory. Ty jsou sekretovány z bakteriální buňky a s vysokou afinitou vážou Fe^{3+} . Přes vnější membránu gramnegativních bakterií se komplex sideroforu s navázaným Fe^{3+} dostává přes specifický receptor (Stintzi *et al.*, 2000). Energii pro tento transport zajišťuje systém TonB-ExbB-ExbD systém, který využívá elektrochemický gradient cytoplazmatické membrány (Higgs *et al.*, 1998, Postle, 1993). Přes periplazmu až k permeáze je siderofor dopravován pomocí periplazmatických vazebných proteinů a následně je pomocí ABC (**A**TP **b**inding **c**asette) transportéru přenesen do cytoplazmy (Köster, 2001). Zde probíhá redukce Fe^{3+} na Fe^{2+} a disociaci od sideroforu. Bakterie také dokážou využívat hemovou skupinu jako zdroj železa, i zde je využíván systém TonB-dependentní transport přes vnější membránu a ABC transport přes vnitřní membránu.

Vzhledem ke komplexitě využití železa v organismu si bakterie vyvinuly regulační systém založený na proteinu Fur (**f**erric **u**ptake **r**egulator). Jedná se o malý dimerní metalloprotein, který funguje jako cytoplazmatický senzor koncentrace Fe^{2+} v cytoplazmě a na jejím základě reguluje genovou expresi. Regulon proteinu Fur je opravdu široký, aktivní regulátor s navázaným Fe^{2+} se váže na specifickou sekvenci, tzv. Fur box, nicméně celá řada regulovaných genů postrádá tuto sekvenci a jejich regulace probíhá nepřímo. Při dostatečném množství železa funguje jako represor genů pro získávání železa z prostředí nebo Mn-dependentní superoxid dismutázu a nepřímo se podílí na pozitivní regulaci genů pro ferritin, bakterioferritin, akonitázu, Fe-dependentní superoxid dismutázu a další. Aktivace genů pomocí Fur je tedy nepřímá a je založená na represí negativního regulátoru, malé RNA RyhB (Massé a Gottesman, 2002, Andrews *et al.*, 2003). Fur je první objevený regulátor z Fur rodiny proteinů, ale patří sem další regulátory závislé na kovech, jako jsou zinek (Zur, PerR), mangan (Mur) a nikl (Nur) (Fillat, 2014). V genomu *B. pertussis* se nacházejí dva homologní geny kódující proteiny patřící do rodiny Fur, konkrétně *BP2055* a *BP3083*.



Obrázek 7: Struktura Fur represoru – Na obrázku je zobrazena struktura proteinu Fur ve formě homodimeru, kde jsou modře znázorněny helixové struktury zodpovědné za vazbu k DNA a zeleně části proteinu zajišťující interakci jednotek. Červeně jsou značené strukturní atomy zinku. Převzato (Pohl *et al.*, 2003).

K udržování optimální koncentrace kovů v buňce se podílí další zmíněný regulátor, malá RNA RyhB. Regulace zde neprobíhá na úrovni regulace transkripce, kdežto v rámci posttranskripční kontroly genové exprese. Mechanismus fungování nekódujících RNA se dělí na dvě skupiny dle jejich působení. RNA elementy přepisované z opačného řetězce cílového genu, nebo jsou jeho součástí působí tzv. *in cis* a elementy přepisované z oblasti vzdálené od regulovaného genu působí tzv. *in trans*. *Cis* elementy se buď nacházejí v 5' nepřekládané oblasti a jejich klíčová funkce je změna sekundární struktury v reakci na různé podmínky, nebo se mohou přepisovat z *antisense* vlákna DNA a regulace probíhá na základě komplementární vazby k cílové mRNA. *Trans*-kódované RNA elementy působí jako *antisense* regulátory a díky jejich nižší míře komplementarity s cílovým genem mají daleko širší spektrum působení. Vzhledem k jejich velikosti (50-300 bp) se označují jako malé RNA, neboli sRNA. Ve většině popsáných případů fungují sRNA jako negativní regulátory, které nepříznivě ovlivňují stabilitu mRNA nebo přístupnost ribozomálního vazebného místa (Papenfort a Vogel, 2010). Regulační sRNA RyhB byla poprvé popsána u *E.coli* a její funkce je negativní kontrola genů kódujících proteiny spojené s metabolismem železa. Zároveň je její transkripce reprimována Fur proteinem s navázaným Fe^{2+} . To vysvětluje pozitivní regulaci některých genů z Fur regulonu, jinak kanonického represoru,

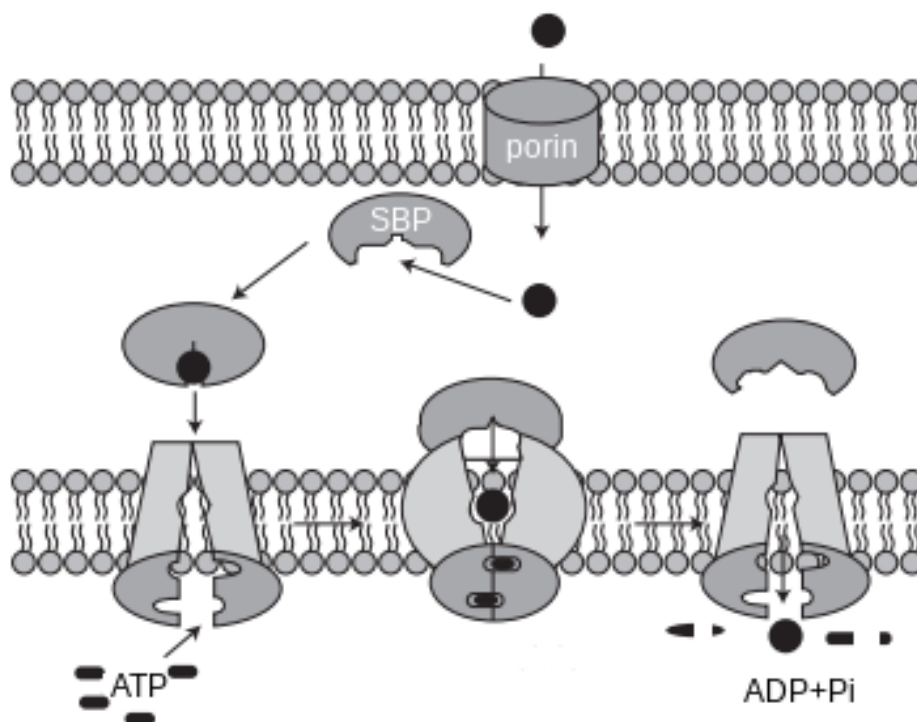
protože negativní regulací represoru umožní expresi. Při nízké hladině cytozolického železa RyhB negativně ovlivňuje expresi genů pro Fe-dependentní superoxid dismutázu, akonitázu, ferritin a bakterioferritin. Tento regulační mechanismus tedy přepíná mezi stavem buňky postrádající železo, kdy Fur nereprimuje ani geny pro proteiny důležité pro akvizici Fe z prostředí, ani RyhB reprimující geny pro ukládání volného Fe a naopak při dostatku Fe Fur potlačuje aktivní získávání železa a dereprimuje zásobní proteiny vyvazující potenciálně toxické volné Fe. Jako mnohé další sRNA i RyhB pro svou funkci využívá RNA chaperon Hfq, který zprostředkovává vazbu sRNA na cílovou mRNA (Massé a Gottesman, 2002).

2.3.2 Mangan

Dalším zde diskutovaným prvkem je mangan. Stejně jako Fe patří Mn do skupiny přechodných kovů a primárně se v organizmech nachází jako dvojmocný kationt. Díky svým vlastnostem dokáže zprostředkovat redoxní reakce na základě přenosu elektronů. Jako svůj kofaktor využívají Mn například tyto enzymy: fosfoenolpyruvátsyntáza, pyruvátkarboxyláza, glutaminsyntetáza, ribonukleáza HII, Mn-dependentní kataláza, ribonukleotidreduktáza a superoxiddismutáza a mnohé další (Jakubovics a Jenkinson, 2001). Z těchto několika příkladů je patrné, že Mn hraje roli v metabolismu cukrů, aminokyselin, nukleových kyselin a při ochraně před oxidativním stresem. Narozdíl od Fe^{2+} je Mn^{2+} mnohem méně náchylný k oxidaci a také je méně kompetitivní, jak ukazuje Irwing Williamsova řada stability komplexů přechodných prvků, která řadí dvojmocné kovy podle jejich schopnosti setrvat ve stabilní formě. Prvky jsou zde řazeny od manganu až po nejstabilnější meď v následujícím pořadí: $\text{Mn}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+}$ (Irving a Williams, 1953). Nicméně i když dokáže nahradit Fe v enzymu, taková změna pak většinou vede ke ztrátě funkce (Beyer a Fridovich, 1991). Tento jev může nastat zejména při snížené hladině cytoplazmatického volného Fe^{2+} . Tento problém se týká hlavně enzymů umožňujících redoxní reakce, protože Mn má vyšší redoxní potenciál a není tak vhodnou náhradou za Fe. V ostatních enzymech je substituce Fe za Mn možná (Čapek a Večerek, 2023). Nespornou výhodou Mn je jeho stabilita i při oxidativním stresu, kdy nedochází k oxidaci Mn^{2+} na Mn^{3+} a nejsou tak vyřazeny z funkce enzymy, které jej využívají jako kofaktor. Preference v utilizaci Fe a Mn dělí bakterie do několika skupin. Většina gramnegativních bakterií spadá do Fe-centrické skupiny, která jak již název vypovídá využívá většinou Fe jako kofaktor v enzymech a Mn tak není životně důležitý prvek. Tyto bakterie, mezi které patří *E. coli*, *S. enterica* ale i *B. pertussis* využijí se stopovým množstvím manganu při standardních růstových podmínkách a zvýšenou potřebu tohoto prvku mají například při vypořádávání se s oxidativním stresem. Druhou skupinou jsou naopak bakterie s Mn-centrickým metabolismem, které naopak téměř nevyužívají Fe ve svých enzymech. Sem patří rod *Lactobacillus*, nebo původce boreliózy *Borrelia burgdorferi*. Jistý střed mezi těmito skupinami zastávají například bakterie rodu *Bacillus*, nebo *Streptococcus*, u kterých mangan plní další funkce, jako tvorba biofilmu, sporulace nebo virulence (Bosma *et al.*, 2021). Odlišné strategie mají nejspíš původ v době před tzv. velkou kyslíkovou katastrofou (2,4-2 mld let), kdy došlo k navýšení koncentrace kyslíku v mořích, což bylo způsobeno fotosyntetizujícími cyanobakteriemi. Železo ve formě Fe^{2+} bylo

snadno dostupné a organizmy hojně využívané, což se ale změnilo s rostoucím obohacením prostředí kyslíkem. Pro tehdejší bakterie vyvstaly dva problémy, oxidovaný Fe^{3+} je hůř dostupný a Fe^{2+} spolu s ROS narušují důležité pochody v buňkách. Některé druhy si vyvinuly obranné mechanismy proti oxidativnímu stresu a zefektivnily import a skladování železa v buňce (Fe-centrické) a některé založily redoxní enzymatické funkce na manganovém kofaktoru, což odpovídá anaerobnímu způsobu života již zmíněných bakterií rodu *lactobacillus* (Mn-centrické) (Khademian a Imlay, 2021).

Transport Mn do buněk většinou zajišťují dva systémy. Jedním z nich je vysoce konzervovaný transportér MntH (**m**anganese **t**ransporter **H**⁺-dependent) využívající proton-motivní sílu. Spadá do rodiny Nramp (**n**atural **r**esistance-**a**ssociated **m**acrophage **p**rotein) proteinů, které lze nalézt napříč organizmy (Makui *et al.*, 2000). Například lidský Nramp1 je využíván k odstranění dvojmocných kovů z prostředí fagozomu, čímž vytváří limitující prostředí pro internalizované bakterie (Jabado *et al.*, 2000). MntH spadá pod regulon transkripčních regulátorů Fur, OxyR a MntR. OxyR je globální regulátor exprese během oxidativního stresu, pozitivně reguluje například Dps a právě MntH. Tím, že je indukována tvorba Dps a tím pádem dochází ke snižování hladiny Fe^{2+} v cytoplazmě dochází k útlumu aktivity Fur a k derepresi MntH tímto regulátorem. MntR váže Mn^{2+} a reprimuje MntH, tím nedochází k nadbytečnému hromadění Mn^{2+} v cytoplazmě (Kehres *et al.*, 2002a, Anjem *et al.*, 2009). Dalším způsobem importu Mn je využití ABC transportéru MntABC (Bartsevich a Pakrasi, 1995).



Obrázek 8: Mechanismus fungování ABC transportéru – Schéma znázorňuje zjednodušený průběh importu skrz ABC transportér. Látka projde přes porin ve vnější membráně a je navázána SBP (solute binding protein). Ten pak interaguje s transmembránovou permeázou, ta mění konformaci na základě vazby a následné hydrolýzy ATP na ADP a Pi na ABC podjednotkách v cytoplasmě. Převzato a upraveno (Kim, 2008).

Toxicita Mn není pro bakteriální patogeny takovým problémem, jako je tomu u Fe, nedochází ke tvorbě ROS, nicméně Mn^{2+} může inaktivovat Fe-dependentní enzymy tím, že nahradí Fe v enzymu. U *B. pertussis* byl popsán nefunkční Mn exportér BP3410 patřící do rodiny Ca^{2+} antiportérů. Za standardních kultivačních podmínek je tento protein neaktivní, nicméně při vystavení WT *B. pertussis* toxické koncentraci Mn v médiu se objevují v inhibiční zóně rezistentní kolonie. Porovnáním sekvence WT a rezistentních kolonií k Mn bylo zjištěno, že došlo k odstranění duplikace o délce 30 nukleotidů, která je konzervovaná u *B. pertussis*. V příbuzné *B. bronchiseptica* se tento gen nachází funkční (tj. bez duplikace) a důvod proč došlo k inaktivaci proteinu u *B. pertussis* není znám, nicméně zabránění exportu Mn z buňky může být odpověď na limitaci tímto prvkem ve fagozomu. Gen *BP3410* je pod regulací riboswitch struktury, která mění konformaci na základě navázání Mn^{2+} (Čapek *et al.*, 2021).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriální kmeny

Bordetella pertussis

Tohama I (Kasuga *et al.*, 1954) - referenční kmen, dále jen WP (**w**ild **t**ype).

Escherichia coli

Sm10 λpir (Biomedal) - kmen nese rezistenci pro kanamycin, dále obsahuje chromozomálně kódované *Tra* geny, které umožňují mezidruhovou konjugaci s recipientní buňkou. Tato strategie byla využita pro přenos plazmidových vektorů z *E. coli* do *B. pertussis*.

XL1-Blue (Stratagene) - používán pro transformaci a replikaci plazmidů. Kmen je rezistentní vůči tetracyklinu.

Bakteriální kmeny byly uchovávány v roztoku 20% glycerolu při teplotě -80°C, kmeny *E. coli* byly udržovány ve stavu navozené kompetence.

3.1.2 Plazmidy

Plazmid **pBBR** byl využíván pro konstrukci komplementačních vektorů v *B. pertussis*. Je odvozen od plazmidu izolovaného z *B. bronchiseptica* (Antoine a Loch, 1992), obsahuje MCS (**m**ultiple **c**loning **s**ite - klonovací oblast) a nese gen pro rezistenci vůči chloramfenikolu. Lze jej transformovat do *E. coli* následně přenést konjugací do *B. pertussis*, čehož bylo využíváno při komplementaci deletovaných genů. Plazmid se v buňkách udržuje ve vysokém počtu, dokáže tedy zesílit sledovaný fenotyp pomocí zvýšené genové dóze.

Plazmid **pSS4245** (Inatsuka *et al.*, 2010) o velikosti 8,286 kbp byl využíván pro tvorbu delečních mutant *B. pertussis*. Nese několik genů pro antibiotikové rezistence, například vůči ampicilinu, tetracyklinu a kanamycinu. Zároveň obsahuje MCS, což umožňuje štěpení celou řadou RE (**r**estrikčních **e**ndonukleáz), čehož bylo využito pro konstrukci vektoru. Plazmid též kóduje specifickou RE I-SceI a odpovídající cílové místo enzymu, které jsou řízeny regulačním systémem BvgAS, jehož aktivita je ovlivněna obsahem síranových aniontů v médiu. Na tomto je založen systém klonování, při kterém dochází k homologní rekombinaci mezi vektorem a gDNA (**g**enomová **DNA**) *B. pertussis* a následnému vyštěpení vektoru (Stibitz, 1994).

3.1.3 Kultivační média

Pro kultivaci *B. pertussis* bylo využito komplexní agarová médium BG (**B**ordet - **G**engou, Difco) s přidanou beraní krví (Lab Media Servis) a tekuté médium SS (**S**tainer - **S**cholte) v neupravené, či chelatované formě. Pro růst *E. coli* bylo využíváno LB (**L**uria - **B**ertani) médium v tekuté a po přidání agarózy i v pevné podobě. Voda použita pro přípravu médií a roztoků byla ošetřena deionizačním zařízením Ultrapur (Wartex).

Agarové médium pro růst *B. pertussis* bylo připraveno navážením 30 g BG agaru a 10 g glycerolu a doplněno do 1 l ddH₂O (dvojitě destilovaná H₂O). Výsledný roztok byl sterilizován pomocí autoklávu (0,12 Mpa, 20 min) a po ztuhnutí byl agar skladován ve 4°C. Před použitím byl agar rozvařen a následně temperován na 50°C. Předem temperovaná (37°C) beraní krev byla přidána do média ve výsledné koncentraci 15% (v/v), médium bylo promícháno a rozléváno do Petriho misek (Ø9 mm) po 20 ml. Misky byly uchovávány v 4°C po dobu ≈2 týdnů.

Tekuté médium SS pro kultivaci *B. pertussis* bylo připraveno smísením dvou zásobních roztoků - frakce A a 100x koncentrované frakce B. Roztok frakce A byl připravován čerstvý a následně byl krátkodobě uchováván v 4°C a frakce B byla uchovávána v -25°C.

Obě frakce byly připraveny smísením chemikálií uvedených v tabulce (odkaz na tab), bylo upraveno pH = 7-7,3 pomocí HCl (VWR), nebo NaOH (Lach ner) a následně byl roztok sterilizován filtrací (0,22 μm). Kompletace média před použitím byla provedena smísením koncentrovaných frakcí A a B v požadovaném objemu.

Tabulka 1: Složení frakce A tekutého SS média.

Složení	Hmotnost [g]
Tris-HCl (VWR)	6,36
Tris-báze (VWR)	1,18
L-glutamát sodný (Sigma)	10,72
L-prolin (Sigma)	0,24
NaCl (Lach Ner)	2,5
KH ₂ PO ₄ (Lach Ner)	0,5
KCl (Sigma)	0,2
MgCl ₂ · 6H ₂ O (Sigma)	0,1
CaCl ₂ · 2H ₂ O (Penta)	0,02
ddH ₂ O	do 1 l

Pro specifické účely bylo připravováno chelatované SS médium. Stejně jako u standardního SS média byly připraveny dvě frakce dle složení uvedeného v tabulce 1 a 2, nicméně u frakce A nebyly do roztoku naváženy MgCl₂ a CaCl₂, obdobně u frakce B nebyl navážen FeSO₄. Takto připravené roztoky byly ošetřeny přípravkem Chelex 100 Resin (Bio Rad),

Tabulka 2: Složení 100× koncentrované frakce B tekutého SS média.-

Složení	Hmotnost [g]
L-cystein (Sigma)	0,4
FeSO ₄ · 7H ₂ O (Sigma)	0,1
L-kyselina askorbová (Sigma)	0,2
Kyselina nikotinová (Sigma)	0,04
L-glutathion (Sigma)	1
ddH ₂ O	do 1 l

který je určen pro chelataci dvojmocných iontů. Frakce byly zbaveny chelatačního činidla dekantováním a následnou filtrací (0,22 μ m), dále bylo upraveno pH = 7-7,3 a roztoky byly sterilizovány filtrací (0,22 μ m). Před použitím bylo médium zkompletováno smísením obou frakcí v požadovaném objemu, dále byly přidány roztoky kovů ve výsledných koncentracích 1M pro MgCl₂, 1M pro CaCl₂ a 1 μ M pro FeSO₄.

Živné LB médium pro kultivaci E. coli bylo připraveno jako roztok 1% (w/v) baktotryptonu (Oxoid), 0,5% (w/v) kvasničného autolyzátu (Oxoid) a 171 mM NaCl (Lachner) v ddH₂O. Po smísení chemikálií byla upravena hodnota pH = $\approx$ 7 pomocí NaOH nebo HCl. Pro přípravu pevného LB média byl přidán bakteriologický agar (Oxoid) v množství 18 g na 1 l. Tekuté i pevné médium bylo sterilizováno autoklávováním (0,12 Mpa, 20 min) a následně uchováváno v 4°C. Před použitím byl agar rozvařen a temperován na 50°C, následně byl rozlíván po 20 ml do Petriho misek ($\varnothing$ 9 mm). Tekuté LB médium bylo před použitím temperováno na 37°C.

Pro specifické účely byla média obohacována o látky v následující tabulce číslo 3. Tyto látky byly přidány do pevných médií před rozlíváním do misek a do tekutých médií těsně před jeho použitím.

Tabulka 3: Látky pro přípravu obohacených médií.

Látka	Koncentrace
Ampicilin	100 μ g
Chloramfenikol	10 μ g
Kanamycin	50 μ g
Streptomycin	500 μ g
CoCl ₂	různá
CuSO ₄	různá
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	50 mM
MnCl ₂	různá
ZnCl ₂	různá

3.1.4 Roztoky

V následující kapitole je popsáno složení a příprava různých pufrů a roztoků nezbytných pro vypracování této práce. Hodnota pH byla upravena pomocí 1M HCl, nebo 5M NaOH. Pro přípravu všech roztoků byla použita ddH₂O, která byla ošetřena systémem Ultrapur (Watrex).

Tabulka 4: Složení EDTA v PBS pufru.

Složení	Koncentrace
Na ₂ HPO ₄ (Lach Ner)	12 mM
KH ₂ PO ₄ (Lach Ner)	22 mM
NaCl (Lach Ner)	138 mM
KCl (Sigma)	3 mM
EDTA (Sigma)	10 mM

Tabulka 5: Složení TAE pufru.

Složení	Koncentrace
Tris-báze(VWR)	40 mM
Kyselina octová (Lach Ner)	20 mM
EDTA (Sigma)	1 mM

Tabulka 6: Složení TE pufru – Lysozym byl vždy přidán těsně před použitím pufru.

Složení	Koncentrace
Tris-HCl (VWR)	10 mM
EDTA	1 mM
Lysozym (Sigma)	$\approx 1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

3.1.5 Enzymy a jejich pufrы

Tabulka 7: Použité RE enzymy – pro všechny RE je využit stejný pufr CutSmart, vše od výrobce New England Bio Labs, všechny enzymy jsou v kvalitě HF (high fidelity) a koncentraci $2000 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Restrikční endonukleáza	Cílové místo
EcoRI	5' ě $G^{\nabla} AATTC$ ě 3' 3' ě $CTTAA_{\blacktriangle} G$ ě 5'
NheI	5' ě $G^{\nabla} CTAGC$ ě 3' 3' ě $CGATC_{\blacktriangle} G$ ě 5'
PstI	5' ě $CTGCA^{\nabla} G$ ě 3' 3' ě $G_{\blacktriangle} ACGTC$ ě 5'
SacI	5' ě $GAGCT^{\nabla} C$ ě 3' 3' ě $C_{\blacktriangle} TCGAG$ ě 5'
SpeI	5' ě $A^{\nabla} CTAGT$ ě 3' 3' ě $TGATC_{\blacktriangle} A$ ě 5'

Tabulka 8: Ostatní enzymy a jejich pufrы.

Enzym (Výrobce)	Pufr (Výrobce)	Reakční teplota	Počet jednotek
DNáza I (Sigma Aldrich)	10x Pufr pro DNázu I (Sigma Aldrich)	RT	$1 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
Herculase II (Agilent Technologies)	10x Pufr pro Herculase II (Agilent Technologies)	72°C	
M-MLV reverzní transkriptáza (Promega)	5x Pufr pro M-MLV reverzní transkriptázu (Promega)	37°C	$200 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
RNasin (Promega)			$25 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$
T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific)	10x Pufr pro T4 DNA ligázu (Thermo Fisher Scientific)	RT	$5 \text{ U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

3.1.6 Syntetické oligonukleotidy

Tabulka 9: Seznam syntetických oligonukleotidů pro PCR (Sigma Aldrich).

Název	Sekvence	Místo pro RE
BP3082-80 fw1	5'-TATACTAGTACATCGCGACCTGCCCCGAAC-3'	SpeI
BP3082-80 rev1	5'-ATAGCTAGCTGACGGCGCTGGGCGC-3'	NheI
BP3082-80 fw2	5'-ATAGCTAGCCATGCCCCCAGGGCC-3'	NheI
BP3082-80 rev2	5'-ATAGAATTTCGTGCGAAGCCGGTGCGGG-3'	EcoRI
BP3082-77 fw1	5'-ATTACTAGTGCGGCTTCTATCAATGGTGGG-3'	SpeI
BP3082-77 rev1	5'-ATAGCTAGCTGACCGCAGCCGGGTTC-3'	NheI
BP3082-77 rev2	5'-ATAGAATTGCGCCGGCTCATGTGCGGGATC-3'	EcoRI
BP3083 fw1	5'-ATAGAGCTCGGCCTCCCGACAGG-3'	SacI
BP3083 rev1	5'-ATAGCTAGCCAAAAGGCGTAGTAAGTGGCCA-3'	NheI
BP3083 fw2	5'-ATAGCTAGCTGAAAACACGGCGACGACAA-3'	NheI
BP3083 rev2	5'-ATAGAGCTCCACCTGCTTCTGGG-3'	SacI
BP3078 fw1	5'-ATAGCTAGCCACGGCCAGCGCGCCT-3'	NheI
BP3078 rev1	5'-ATAGAATTCCGTGGTGGAGTTCGATGC-3'	EcoRI
BP3078 fw2	5'-TATACTAGTGGATCTTGCGGTCCAGCAGCAC-3'	SpeI
BP3078 rev2	5'-ATAGCTAGCTGAGGCCGGCGGCAA-3'	NheI
BP3083-80 fw1	5'-TATACTAGTGCCATGCCCCCAGGGCC-3'	SpeI
BP3083-80 rev2	5'-CCCGAATTCGTTTTCGATCACC-3'	EcoRI
pSS4245 fw	5'-CTTACCTGATCTTCTACAACC-3'	
pSS4245 rev	5'-TGGCGAAGATCGAAGAGAAG-3'	

Tabulka 10: Seznam syntetických oligonukleotidů pro RT-qPCR (Sigma Aldrich).

Název	Sekvence
qBP3082 fw	5'-CAGGTCGAGATCGTGCAG-3'
qBP3082 rev	5'-CTGTTGCTGCTGCTGGACGAG-3'
qBP3081 fw	5'-ACCACCAGGCCCATGAA-3'
qBP3081 rev	5'-CCACCCTGTGCATCCTG-3'
qBP3080 fw	5'-GGGTCGGCTCGTATTCGT-3'
qBP3080 rev	5'-GTCGTCGCCAGCTTTTCC-3'
qBP3079 fw	5'-CATGGTGGCCCAATCCAG-3'
qBP3079 rev	5'-GCCTATGCCTTCGACGAG-3'
qBP3078 fw	5'-GTCGCAXGGTTCATCGC-3'
qBP3078 rev	5'-GTGGCTCGCCCTGTTGT-3'
qBP3077 fw	5'-GCAGGTCGGTACGGTTG-3'
qBP3077 rev	5'-GCAGGTCGGTACGGTTG-3'
qRpoB fw	5'-CGCCAATGTAGACGATGCC-3'
qRpoB rev	5'-GCTGGGACCCGAGGAAAT-3'
qPpsA fw	5'-CGGAAACGGTGAAATCGC-3'
qPpsA rev	5'-CGATCTTCTGGCCGATGG-3'

3.2 Metody

3.2.1 Kultivační metody

Veškeré metody v této kapitole jsou náchylné k bakteriálním kontaminacím, proto byly vykonávány ve sterilním prostoru boxu s laminárním prouděním, veškeré plochy byly dekontaminovány pomocí 75% ethanolu a UV zářením po dobu 15 min, veškeré kovové a skleněné nástroje byly před a po práci vysterylizovány nad plamenem kahanu. Všechna živná média byla temperována na kultivační teplotu 37°C pro zamezení teplotního šoku při inokulaci.

3.2.1.1 Kultivace Bakterie *B. pertussis* byly pěstovány na pevném BG médiu s přídavkem beraní krvi při teplotě 37°C, v obohacené atmosféře o CO₂ (5%) se standardní dobou růstu 3 dny. Kultivace *B. pertussis* v tekutém médiu byla uskutečněna ve standardním, popřípadě chelatovaném SS médiu při teplotě 37°C a aerace kultury byla zajištěna třepáním o rychlosti 160 rpm. Do erlenmayerovy baňky byla zaočkovávána kultura tak, aby počáteční OD₆₀₀ = 0,05-0,1.

Kultivace bakterií *E. coli* probíhala na pevném LB agaru při teplotě 37°C s dobou růstu do 24 h. Pro kultivaci v tekutém médiu bylo použito LB médium, kultura byla pěstována ve 37°C a vzdušnění bylo zajištěno třepáním o rychlosti 160 rpm.

3.2.1.2 Růstová křivka Sledování optické denzity bakteriální kultury bylo prováděno souběžně pomocí kontinuálního měření spektrofotometru Epoch 2 (BioTek), kde byla kultura kultivována v mikrotitrační destičce (Thermo Fisher Scientific) a zároveň odebíráním kultury pěstované v erlenmayerově baňce a měřením spektrofotometrem Ultrospec 10 (Biochrom).

Bakterie *B. pertussis* byly prekultivovány na BG agaru po dobu ≈3 dnů, poté byly přeneseny do SS média, aby výchozí OD₆₀₀ kultury bylo 0,1. Následující den po ≈24 h byly kultury přeočkovány do čerstvého SS média s výchozím OD₆₀₀ = 0,05. V tomto bodě byly také navozeny specifické kultivační podmínky (přidání roztoku kovů do média, etc.) a zároveň byly odebrány 2 ml kultury do mikrotitrační destičky pro měření OD v přístroji Epoch 2, který zajišťoval kontinuální měření OD po 20 min krocích. Bakteriální kultury pěstované v erlenmayerových baňkách byly měřeny po kultivaci ≈22 h, následně pak 2x denně do doby, dokud se kultura nedostala do stacionární fáze, poté byl experiment ukončen, zpravidla po 3 dnech.

Naměřené hodnoty z obou přístrojů byly vyhodnoceny v programu Excel 2016 (Microsoft Office), následně byly zaneseny do grafů pomocí knihovny Matplotlib jazyku Python.

3.2.2 Stanovení genové exprese

Vzhledem k náchylnosti vzorků s RNA ke kontaminacím a degradaci a povaze chemických látek používaných k izolaci nukleové kyseliny byly dodržovány následující zásady práce. Izolace RNA a manipulace se vzorky byla prováděna v dekontaminačním boxu pro práci s organickými rozpouštědly (ErlabR CaptairR FlexR M321); všechny nástroje a plochy byly ošetřeny dekontaminačním prostředkem proti RNázám RNase Zap (Sigma Aldrich); jednorázové plasty, nástroje a chemikálie byly používány výhradně pro práci s RNA; voda byla používána pouze komerčně dodávaná destilovaná bez obsahu nukleáz (Sigma Aldrich); pro manipulaci se vzorky bez obsahu organických rozpouštědel byl používán PCR box (Telstar Mini-V/PCR), k dekontaminaci ploch a nástrojů bylo používáno UV záření po dobu 10 min.

3.2.2.1 Izolace celkové RNA Kultury *B. pertussis* pro izolaci celkové RNA byly zaočkovány na BG agar, po 3 dnech byly přeneseny do tekutého SS média tak, aby $OD_{600}=0,1$. Pro experimenty s chelatovaným médiem kvůli limitaci železem byly využity plastové jednorázové kličky a plastové erlenmayerovy baňky pro kultivaci. Po 24 h kultivaci byly kultury rozděleny do menších erlenmayerových baněk a podle potřeby bylo upraveno médium přidávkem roztoku kovů k vyvolání indukčních podmínek. V určitých časových bodech byla odebírána kultura pro tvorbu buněčných pelet. Pro přípravu buněčného peletu k izolaci RNA bylo využito 1400 μl bakteriální kultury ($OD \approx 1$) ke které bylo přidáno 350 μl stop solution (5% roztok fenolu v ethanolu). Takto připravený vzorek byl centrifugován (4°C, 10 min, 16100 g), zbaven supernatantu a uchován v -80°C.

Pelet s obsahem bakteriálních buněk byl pipetováním resuspendován ve 100 μl TE pufru s přidávkem lysozymu. Následně bylo přidáno 1400 μl roztoku TRI Reagent (Thermo Fisher Scientific) a vzorek byl protřepán a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 5 min pro separaci RNA od ribonukleoproteinů. Vzorek byl centrifugován (4°C, 10 min, 16 100 g) a poté byl všechn supernatant převeden do nové mikrozkušavky s 300 μl chloroformu. Po promíchání a ustanovení fáze byla směs opět centrifugována (4°C, 15 min, 16 100 g) a do nových zkumavek bylo přidáno 600 μl isopropanolu a 600 μl svrchní fáze vzorku. Vzorek byl ponechán po dobu 60 min ve 4°C, poté byl centrifugován (4°C, 60 min, 16100 g), byl odstraněn supernatant a k peletu nukleových kyselin bylo přidáno 900 μl

75% ethanolu. Vzorek byl centrifugován (4°C, 15 min, 16 100 g) a následně byl odstraněn ethanol, pelet nukleových kyselin byl vysušen a resuspendován do 50 μ l (pro vzorky ze standardního SS média), respektive 40 μ l (pro vzorky s využitím chelatovaného SS média) vody bez obsahu nukleáz.

Pro vzorky vycházející z chelatovaného SS média byl přidán krok, a to přechištění přes komerčně dodávanou soupravu Total RNA Mini Kit (Geneaid). Bylo použito 40 μ l vzorku, 400 μ l RB pufru a 400 μ l 70% ethanolu. Tato směs byla převedena na RB kolonku a následnou centrifugací (RT, 1 min, 14000 g) došlo k navázání nukleových kyselin na matrix kolonky. Na RB kolonku bylo přidáno 400 μ l W1 pufru, vzorek byl centrifugován (RT, 30 s, 14000 g) a následně byla kolonka dvakrát promyta 600 μ l Wash pufrům s přidáním ethanolu, který byl odstředěn centrifugací (RT, 30 s, 14000 g). Kolonka byla zbavena zbytku tekutiny centrifugací (RT, 3 min, 14000 g) a následně na ní bylo přidáno 50 μ l vody a došlo k eluaci nukleových kyselin pomocí centrifugace (RT, 1 min, 14000 g). V dalších krocích izolace bylo počítáno se ztrátou objemu vzorku ≈ 2 μ l.

V tomto bodě izolace vzorek obsahoval mimo RNA také molekuly DNA, které bylo potřeba enzymaticky odstranit, k čemuž byla využita DNáza I. Ke vzorku bylo přidáno 5 μ l DNázy a 5 μ l reakčního pufru (pro vzorky ze standardního SS média), popřípadě 6 μ l DNázy a 6 μ l reakčního pufru (pro vzorky přechištěné přes kolonku). Reakční směs byla inkubována při RT po dobu 15 min. Do phase lock zkumavek s gelem pro separaci fází bylo přidáno 300 μ l PCI (phenol, chloroform a isoamylalkohol), 250 μ l vody a 50 μ l reakčního mixu s DNázou (pro vzorky ze standardního SS média), respektive 400 μ l PCI, 340 μ l vody a 60 μ l reakčního mixu (pro vzorky přechištěné přes kolonku). Fenol v PCI v tomto kroku zastavuje DNázovou reakci a zároveň zbavuje vzorek proteinu. Směs ve zkumavce byla protřepána a centrifugována (4°C, 10 min, 16100 g), následně bylo odebráno 300 μ l svrchní fáze do nové zkumavky s 300 μ l chloroformu. Po protřepání byl vzorek centrifugován (4°C, 10 min, 16100 g), poté bylo odebráno 300 μ l svrchní fáze do nové zkumavky s 30 μ l NaAC a 990 μ l 100% ethanolu. RNA byla srážena při 4°C přes noc.

Následující den byl vzorek centrifugován (4°C, 60 min, 14000 g), supernatant byl odstraněn a pelet RNA byl omyt 75% ethanolu, poté následoval další centrifugace (4°C, 15 min, 14000 g) a odstranění ethanolu ze vzorku. Pelet byl ≈ 2 min vysušen a následně byl rozpuštěn v 50 μ l vody.

Kvalita vyizolované RNA byla ověřena pomocí horizontální agarózové elektroforézy, kde byly ke 4 μ l vzorku přidány 4 μ l nanášecí barvy (93% formamid; 10 mM EDTA pH 8;

1,5 M bromfenolová modř). Dál byla změřena koncentrace a ověřena čistota RNA pomocí spektroskopie (DeNovix DS-11 FX), kdy byly sledovány poměry absorbancí, přičemž pro další použití byly vybrány vzorky s poměrem A_{260}/A_{280} a $A_{260}/A_{230} \approx 2$.

3.2.2.2 Reverzní transkripce RNA Stejně jako při izolaci RNA, i zde byly dodrženy totožné zásady práce aby došlo k zamezení kontaminace vzorku nukleázami. Zároveň byly vzorky při všech pipetovacích krocích umístěny ve zmrazovacím stojánku.

Prvním krokem přepisu RNA do cDNA bylo smísení 1000 ng RNA s 1 μl primerů ($250 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ náhodné hexamery), doplněné do 30 μl vodou. Celkový objem vzorků byl rozdělen na poloviny a poté byla provedena hybridizace po dobu 5 min při 70°C a následně byly vzorky umístěny do zmrazovacího stojánku.

Ke vzorkům o objemu 15 μl bylo přidáno 5 μl reakčního pufru, 2 μl dNTPs (800 μM od každého nukleotidu, Sigma Aldrich), 2 μl inhibitoru RNáz RNAsin a 1 μl M-MLV reverzní transkriptázy, pro negativní kontrolu pro RT-qPCR (real time quantitative PCR) byl enzym v polovině vzorků nahrazen dH_2O . Takto připravená reakční směs o výsledném objemu 25 μl byla inkubována po dobu 1h při 37°C . Vzorky byly uchovávány v -80°C , nebo byly 10x naředěny vodou a krátkodobě uchovávány při -20°C .

3.2.2.3 RT-qPCR Ke zjištění relativního množství transkribované mRNA v buňkách byla využita enzymatická polymerázová řetězová reakce v reálném čase. Míra amplifikace požadovaných úseků vymezených specifickými syntetickými oligonukleotidy (primery) byla určena detekcí fluorescenčního signálu.

Reakční směs byla připravena ve větším objemu a do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky byla distribuována pomocí elektronické pipety Multipette E3 (Eppendorf). Každá jamka destičky Hard shell PCR plate 96-wells (Bio-Rad) obsahovala 10 μl vody, 2 μl od každého z páru primerů, 2 μl 10x ředěné cDNA a 4 μl 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR master mix (Solis BioDyne), celkem tedy 20 μl reakční směsi. Jednotlivé vzorky byly pipetovány v triplicátu a jako kontrola sloužil vzorek RNA bez přidání reverzní transkriptázy (viz 3.2.2.2). Reakce byla uskutečněna pomocí přístroje CFX96 Touch RT PCR (Bio-Rad) dle následujícího schématu. Počáteční denaturace templátové cDNA a aktivace hot start polymerázy probíhala po dobu 12 min při 95°C , dále následovalo 40 opakování denaturační fáze po dobu 15 s při 95°C , nasedání primerů po dobu 30 s při 60°C , fáze polymerace po dobu 30 s při 72°C . Po ukončení 40 cyklů následoval krok po dobu 0,05 s při 65°C a 0,5 s při 95°C pro určení křivek tání produktu amplifikace. Fluorescence byla

snímána ve všech bodech polymerace a v posledním kroku při 95°C.

Pro určení relativní úrovně exprese genů byla použita metoda $2^{-\Delta\Delta C_t}$, přičemž efektivita použitých primerů byla experimentálně ověřena a byla zohledněna při výpočtu. Hodnota C_q - která vyjadřuje časový bod, kdy amplifikace cDNA začíná narůstat exponenciálně a je zaznamenán nárůst fluorescence - byla použita pro srovnání mnou sledovaných genů oproti referenci. Jako kontrolní geny byly využity sekvence kódující RpoB, PpsA, a 16SrRNA (viz tabulka číslo 10, které byly vybrány na základě jejich konstitutivní exprese ve velkém množství, tím pádem dosahují hodnot C_q zpravidla dříve, než experimentální geny. Kvalita PCR produktu byla posouzena pomocí křivek tání, kde je možné pozorovat, zda-li vzniká jeden nebo více amplikonů. Vzorky u kterých se vyskytlo více produktů amplifikace byly z dalších analýz vyřazeny.

Vyhodnocení dat získaných z triplikátu pro každý sledovaný gen a kultivační podmínku bylo uskutečněno v programu Excel 2016 (Microsoft Office) a jejich grafické znázornění bylo provedeno v prostřednictvím knihovny Matplotlib jazyku Python.

3.2.3 Molekulárně-biologické metody

V této kapitole budou představeny metody využitě k tvorbě mutant, které byly dále využívány k experimentům. Jedná se o základní molekulárně genetické metody, zčásti i o metody mikrobiologické. Veškerá manipulace s bakteriálními kmeny byla uskutečněna v prostředí boxů s laminárním prouděním, kvůli zamezení kontaminace kultur. Sterilizace ploch a použitého náčiní byla zajištěna 75% ethanolem a UV zářením po dobu 15 min. K práci byly využívány hlavně jednorázové plasty, které byly následně likvidovány dle zásad práce s geneticky modifikovanými organizmy, kovové a skleněné nástroje byly vždy před a po použití vysterilizovány plamenem kahanu. Veškerá manipulace s enzymy byla uskutečněna ve zmrazovacím stojánku, nebo na ledu, pro zamezení ztráty aktivity proteinu.

3.2.3.1 PCR Polymerázová řetězová reakce (PCR), která slouží k amplifikaci požadovaného úseku DNA ohraničeného párem primerů byla využita pro následující účely. Pro ověření obsahu určité sekvence v bakteriálních koloniích (colony PCR) nebo pro tvorbu DNA fragmentů k budoucímu klonování do plazmidového vektoru.

Templátová DNA pro colony PCR byla získána z jednotlivých bakteriálních kolonií, které byly odebrány sterilní pipetovací špičkou a přeneseny do 50 μ l dH₂O, následně byly inkubovány při teplotě 95°C po dobu 10 min. Poté byl buněčný debris odstraněn po-

mocí centrifugace (4°C, 10 min, 21130 g) a supernatant byl odebrán do nových sterilních zkumavek. Takto připravená DNA pro colony PCR byla uchovávána v -20°C. Jako další templát sloužila genomová DNA (gDNA), nebo plazmidová DNA (pDNA), které byly připraveny izolací a purifikací z bakteriální kultury, popřípadě různé purifikované fragmenty DNA, které byly získány pomocí předcházející reakce PCR.

Reakční směs pro amplifikaci DNA obsahovala 4 μ l 5 $\times$ koncentrovaného Herculase II pufru, 0,5 μ l od každého páru primerů (ve výsledné koncentraci 0,25 μ M pro jeden pár primerů), 0,5 μ l dNTPs (ve výsledné koncentraci 0,25mM pro každý deoxynukleotid, Agilent Technologies), 0,1 μ l polymerázy Herculase II, 1 μ l templátu, 0,8 μ l DMSO (dimethylsulfoxid, Agilent Technologies), výsledná směs byla doplněna do 20 μ l dH₂O.

Reakce probíhala v přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-rad), dle následujícího protokolu. Reakční směs byla nejprve zahřáta na 98°C po dobu 2 min pro počáteční denaturaci DNA, následovalo 35 cyklů, kdy byla směs zahřívána na 98°C na 20 s (denaturace), ochlazována na teplotu 50-65°C po dobu 30 s (teplota nasedání primerů doporučená výrobcem, následně experimentálně zjištěna optimální teplota), opětovně zahřáta na 72°C (polymerace, čas určen podle délky fragmentu DNA dle rychlosti enzymu 1 kbp na 30 s). Po ukončení 35 cyklu byla směs udržována při teplotě 72°C po dobu 5 min, aby došlo k dokončení polymerace a následně došlo ke zchlazení směsi na RT.

Po proběhnutí reakce byla ověřena délka fragmentů pomocí horizontální elektroforézy v agarózovém gelu. Následně byly vzorky purifikovány pomocí komerčně dodávané soupravy QIAquick PCR purification kit (Qiagen), dle návodu dodaného výrobcem. Reakční směs byla nejprve smíchána s pětinasobným množstvím PB pufru, výsledný objem byl přenesen na kolonku a centrifugací (RT, 1 min, 17900 g) byla DNA zachycena na matrix kolonky. Následně byla kolonka promyta 700 μ l pufru PE s přidaným ethanolem, který byl odstraněn odstředěním (RT, 1 min, 17900 g). Kolonka se zbytkem tekutiny byla opětovně centrifugována (RT, 1 min, 17900 g). Přidáním 40 μ l dH₂O a odstředěním (RT, 1 min, 17900 g) došlo k uvolnění DNA z matrix kolonky a k jejímu jímání do sterilní zkumavky. Koncentrace DNA byla změřena na přístroji DS-11 FX (DeNovix), kde byla zároveň určena čistota molekuly pomocí sledovaných poměrů A260/A280 a A260/A230.

3.2.3.2 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu Metoda elektroforetického dělení molekul byla použita ke zjištění velikosti fragmentů nukleových kyselin. Především byla využívána pro kontrolní colony PCR pro zjištění obsahu zaklonovaného vektoru s insertem, pro určení velikosti PCR ampliconů, pro kontrolu úspěšnosti RNA izolace,

atd.

Gel pro elektroforézu byl připraven jako roztok agarózy (Electran pro detekci, Sigma pro extrakci) v TEA pufru v hmotnostních koncentracích 0,8 - 1%, popřípadě 3% pro velmi malé fragmenty DNA (≈ 200 bp). Agaróza byla v pufru rozpuštěna povařením a po vychladnutí roztoku na $\approx 70^\circ\text{C}$ byl přidán 1 μl barvy Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe) pro detekci nukleových kyselin a celá směs byla nalita do aparatury pro elektroforézu (Bio-rad). Po ≈ 30 min tuhnutí gelu byl odstraněn hřeben pro tvorbu jamek a gel byl přemístěn do aparatury (Bio-Rad) s TAE pufrem. Vzorky DNA byly do jamek nanášeny spolu s vzorkovacím pufrem 6 $\times$ purple Gel Loading Dye (New England BioLabs) v poměru 6:1. RNA byla nanášena spolu s vzorkovacím pufrem (93% formamid; 10 mM EDTA pH 8; 1,5 M bromfenolová modř) v poměru 1:1. Pro porovnání velikosti fragmentů byla využita λ -DNA naštěpena pomocí PstI restriční endonukleázy (New England BioLabs). Elektroforetické dělení bylo uskutečněno při napětí 100 V po dobu ≈ 30 min a následně byla DNA i RNA detekována pod UV světlem pomocí přístroje G:BOX Syngene (Biocon) a programu GeneSnap (Syngene).

3.2.3.3 Konstrukce vektoru pro klonování Delece genu v *B. pertussis* byla uskutečněna pomocí klonovacího vektoru pSS4245, do kterého byly vloženy fragmenty DNA kódující navazující sekvence deletovaného genu, aby mohlo dojít k rekombinaci na základě homologie sekvencí v plazmidu a gDNA.

První krok při klonování sestával z vytvoření insertu, který byl syntetizován pomocí PCR. Při navrhování primerů bylo do sekvence vloženo cílové místo pro RE (restriční endonukleázy), na stranách orientovaných k deletovanému genu NheI a na vnějších okrajích SpeI a EcoRI. Nejprve byly připraveny dva amplikony, které sekvenčně obklopují vybraný gen. Po amplifikaci byly přečištěny pomocí soupravy QIAquick PCR purification kit (Qiagen) a následně byly naštěpeny pomocí RE NheI, která vytváří kohezní konce na obou fragmentech. Reakční směs se skládala z 5 μl 10 $\times$ koncentrovaného pufru CutSmart (New England BioLabs), 1 μl RE NheI (50 U, New England BioLabs), ≈ 3 μg DNA a byla doplněna dH₂O do výsledného objemu 50 μl . Směs byla inkubována ve 37°C po dobu 3 h.

Následovala purifikace (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) a poté byly oba fragmenty enzymaticky spojeny pomocí T4 DNA ligázy. Ligační směs obsahovala 2 μl reakčního pufru pro T4 DNA ligázu, 1 μl T4 DNA ligázy, ≈ 300 ng od obou naštěpených fragmentů a byla doplněna do objemu 20 μl dH₂O. Reakce probíhala při RT po dobu 4 h.

Takto připravený zligovaný úsek DNA byl přečištěn pomocí soupravy QIAquick PCR purification kit (Qiagen) a následně byl amplifikován pomocí PCR. Vzorek byl opět purifikován a poté byl ošetřen RE pro tvorbu kohezních konců, k čemuž byly použity enzymy EcoRI a SpeI (New England Biolabs) podle schématu popsaného výše. Stejným způsobem byl připraven i vektor, plazmid pSS4245, který byl linearizován stejnými enzymy, množství DNA použitého pro reakci bylo $\approx 1 \mu\text{g}$. Po purifikaci všech reakčních směsí soupravou QIAquick PCR purification kit (Qiagen) byla uskutečněna ligace insertu a plazmidu. Množství vložené DNA do reakce bylo $\approx 300 \text{ ng}$ pro insert a $\approx 50 \text{ ng}$ pro plazmid.

Ligační směs byla po uplynutí inkubační doby přenesena do zkumavky obsahující kompetentní buňky *E. coli* XhoI v 50% glycerolu pro transformaci metodou teplotního šoku. Směs byla ponechána na ledu po dobu 40 min, následně byla zahřáta na 42°C po dobu 1 min a následně zchlazena na ledu po dobu $\approx 2 \text{ min}$. Po přidání LB média (temperovaného na 37°C) do zkumavky proběhla inkubace ve 37°C po dobu 1 h při třepání 300 RPM. Buňky byly přeočkovány na LB agar, kde byl zajištěn selekční tlak pro netransformované buňky antibiotikem ampicilin. Po 24 hod kultivaci ve 37°C byly vzniklé kolonie přeočkovány na nové misky stejného typu a zároveň byla provedena kontrolní reakce PCR pro ověření přítomnosti insertu. Kolonie s transformovaným vektorem obsahujícím insert byly následně přeneseny do tekutého LB média s přidáním ampicilinu. Po $\approx 12 \text{ hod}$ kultivaci ve 37°C při zajištěné aeraci třepáním (160 RPM) byl z kultury vyizolován plazmid pomocí soupravy GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific).

Nejprve došlo k centrifugaci kultury (RT, 2 min, 6800 g), poté bylo médium odstraněno dekantováním. Následně bylo k buněčnému peletu přidáno $250 \mu\text{l}$ resuspendačního roztoku a směs byla promíchána pipetováním. Poté bylo přidáno $250 \mu\text{l}$ lyzačního pufru, směs byla promíchána převrácením zkumavky, dokud nebyla čirá. Ihned poté bylo přidáno $350 \mu\text{l}$ neutralizačního roztoku a celá směs byla opět promíchána invertováním zkumavky a následně byla centrifugována (RT, 5 min, 15000 g). Veškerý supernatant byl přenesen na kolonku, na jejíž matrix se po centrifugaci (RT, 1 min, 15000 g) zachytila pDNA. Následovalo dvojí přečištění vzorku pomocí $500 \mu\text{l}$ promývacího pufru s přidáním ethanolu (RT, 1 min, 15000 g) a poté byla prázdná kolonka zbavena zbytkem tekutin centrifugací (RT, 1 min, 15000 g). Nakonec bylo přidáno $50 \mu\text{l}$ dH_2O temperované na 50°C , čímž došlo k uvolnění pDNA z matrix kolonky a ta byla jímána do nové zkumavky pomocí centrifugace (RT, 1 min, 15000 g).

Pro klonování do komplementačního vektoru pBBR byl využit obdobný postup, pouze použité RE pro štěpení insertu i plazmidu byly využívány PstI a SacI namísto EcoRI.

3.2.3.4 Konjugace a homologní rekombinace vektoru pSS4245 do *B. pertussis*

Pro konjugaci *B. pertussis* byl využit kmen *E. coli* SM10 λ pir, do kterého byl díky tepelnému šoku transformován plazmid pSS4245 s vloženým požadovaným insertem. Objem vložené DNA byl 1 μ l purifikovaného plazmidu nezávisle na koncentraci. Po selekci pozitivních transformant pomocí ampicilinu a ověření PCR a sekvenací ampikonů byly vybrané kolonie přeočkovány do tekutého LB média pro ≈ 12 h kultivaci ve 37°C a třepání 160 RPM. Poté bylo smícháno 600 μ l kultury s 600 μ l glycerolu pro uchovávání v -80°C.

Před samotnou konjugací byly na agarové misky vyneseny bakterie *E. coli* SM10 λ pir obsahující vektor pSS4245 na LB médium obohacené o ampicilin a zároveň *B. pertussis* WP (v případě tvorby mnohonásobných delecí byl použit příslušný kmen s předem deletovanými geny) na BG médium s MgSO_4 pro zamezení rozštěpení vektoru v recipientní buňce před homologní rekombinací. Na tzv. konjugační misku s BG agarem obsahující MgSO_4 a MgCl_2 byla přenesena veškerá biomasa ze 3 misek s *B. pertussis* do jednoho bodu. Poté bylo přidáno několik kolonií *E. coli* SM10 λ pir a směs buněk byla promíchána bakteriologickou kličkou. Konjugace probíhala po dobu 4 h ve 37°C v atmosféře obohacené o 5% CO_2 . Směs byla po kultivaci rozetřena na BG agar s přidáním MgSO_4 , ampicilinem a streptomycinem, kde díky selekčnímu tlaku rostly pouze kolonie *B. pertussis* se začleněným vektorem v genomu. Pro odstranění vektoru z genomu byly kolonie po ≈ 3 dnech kultivace ve 37°C v atmosféře obohacené o 5% CO_2 přeočkovány na standardní BG agar, kde nízká koncentrace síranových iontů vede k aktivaci RE I-SceI, která vyštěpí plazmid z gDNA. Tímto postupem vznikají kolonie *B. pertussis* ve kterých došlo k opravě poškozené gDNA pomocí homologní rekombinace, kdy v polovině případů došlo k deleci požadovaného genu a v druhé polovině k návratu k výchozímu genotypu. Přítomnost či nepřítomnost genu byla ověřena pomocí PCR a následně sekvenace DNA.

Stejný postup lišící se pouze v použitém selekčním tlaku byl využit i pro konjugaci plazmidu pBBR. Tento vektor je využíván pouze ke komplementaci genu na plazmidu, nedochází u něj tedy k homologní rekombinaci s gDNA a není potřeba tlumit aktivitu BvgAS systému, proto není před a po konjugaci nutné vysévat bakterie na misky s MgSO_4 . Namísto ampicilinu bylo využito antibiotikum chloramfenikol, na který nese vektor rezistenci.

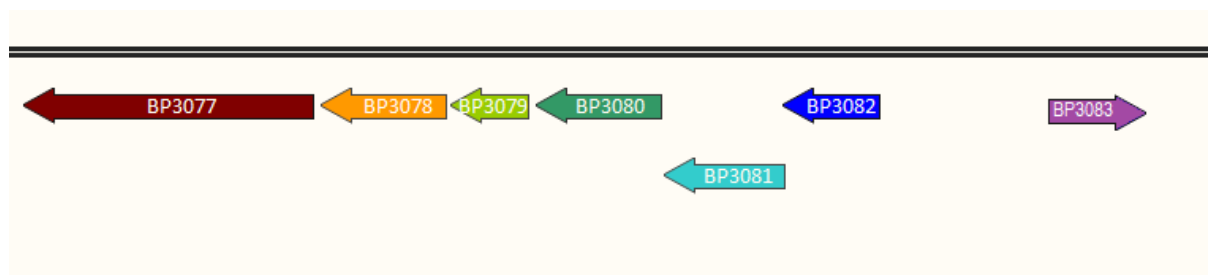
3.2.3.5 Sekvenace DNA

Ověření sekvence plazmidů a PCR fragmentů bylo zajištěno společností GATC biotech. Směs pro sekvenaci se skládala z příslušného sekvenačního primeru (o výsledné koncentraci 2,5 μM), DNA (o výsledné koncentraci 50-80 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro

pDNA; 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro PCR amplikon o délce 150-300bp; 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro PCR amplikon o délce 300-1000bp; 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ pro PCR amplikon o délce >1 kbp) a byla doplněna do výsledného objemu 10 μl dH₂O. Pro vyhodnocení sekvenačních dat byl využit program SnapGene Viewer (verze 5.0.7; GSL Biotech).

4 Výsledky

Výsledkovou část této práce lze rozdělit do tří částí, a to na experimenty zabývající se rolí manganu, kobaltu a dalších přechodných kovů první řady (železo, nikl, měď a zinek). Ve všech případech byla využita metoda RT-qPCR pro testování míry exprese vybraných genů v určitých podmínkách a růstové křivky pro sledování růstových vlastností v závislosti na použitých kmenech, na složení média a genetickém kontextu. Testovaný operon *BP3082-BP3077* byl vybrán na základě analýzy transkriptomu fagocytovaných buněk *B. pertussis* THP-1 makrofágy, u nichž byla sledována zvýšená exprese (Farman *et al.*, 2023). Na základě aminokyselinové sekvenční homologie (viz tabulka 11) je možné odhadovat, že proteiny BP3082-BP3080 tvoří ABC transportér pro přechodný kov, BP3079 je hypotetický protein obsahující doménu s neznámou funkcí, *BP3078* je homolog vysokoafinitního transportéru Ni anebo Co a *BP3077* je TonB receptor. Před tímto operonem se nachází opačně orientovaný gen *BP3083* kódující regulátor z rodiny Fur. Tato práce je zejména zaměřena na geny kódující transportéry, tedy *BP3082-BP3080* a *BP3078* spolu s regulátorem *BP3083*.



Obrázek 9: Schéma lokusu *BP3083-BP3077* – Obrázek znázorňuje uspořádání genů ve zkoumaném lokusu. Geny *BP3082-BP3077* jsou uspořádány v operonu a v opačném směru je přepisován represor BP3083. U genů *BP3082-BP3080* je patrný překryv koncových oblastí genů a nejedná se o přepis z komplementárního vlákna. Schéma bylo vytvořeno pomocí programu SnapGene Viewer.

Tabulka 11: Aminokyselinová sekvenční homologie proteinů BP3083-BP3077

Protein v <i>B. pertussis</i>	Organismus s nejbližším homologem (vyjma rodu <i>Bordetella</i>)	Název homologu	Pokrytí	% identity	E-hodnota
BP3083	<i>Mycobacteroides abscessus</i>	Fur protein	97%	99.40%	5e-117
BP3082	<i>M. abscessus</i>	Protein podobný ABC transportéru	98%	94.54%	2e-126
BP3081	<i>M. abscessus</i>	ABC-3 protein	99%	97.65%	7e-97
BP3080	<i>M. abscessus</i>	SBP	99%	96.14%	2e-176
BP3079	<i>M. abscessus</i>	Necharakterizovaný ABC transportní systém	99%	96.37%	8e-129
BP3078	<i>M. abscessus</i>	Nikl/kobalt efluxní protein RcnA	86%	94.49%	1e-101
BP3077	<i>M. abscessus</i>	Předpokládaný TonB receptor	97%	95.10%	0.0
Protein v <i>B. pertussis</i>	Nejbližší homolog v <i>Salmonella enterica</i> <i>ser. typhimurium</i>	Název homologu	Pokrytí	% identity	E-hodnota
BP3083	<i>S. enterica</i>	Zur protein	85%	38.16%	6e-29
BP3082	<i>S. enterica</i>	ABC transportér manganu, ATP-vazebný protein SitB	98%	35.92%	5e-29
BP3081	<i>S. enterica</i>	Permeáza ABC transportéru	84%	56.30%	3e-25
BP3080	<i>S. enterica</i>	ABC transportér manganu, SBP SitA	90%	29.08%	2e-45
BP3079	<i>S. enterica</i>	Nenalezena žádná signifikantní podobnost	-	-	-
BP3078	<i>S. enterica</i>	Transportér niklu	63%	37.75%	9e-12
BP3077	<i>S. enterica</i>	TonB receptor mědi	18%*	32.12%	6e-08
Protein v <i>B. pertussis</i>	Nejbližší homolog v <i>Escherichia coli</i>	Název homologu	Pokrytí	% identity	E-hodnota
BP3083	<i>E. coli</i>	Zur protein	79%	41.61%	1e-32
BP3082	<i>E. coli</i>	ABC transportér zinku, ATP-vazebný protein AztA	91%	52.49%	3e-57
BP3081	<i>E. coli</i>	ABC transportér zinku, permeáza AztB	89%	56.51%	8e-40
BP3080	<i>E. coli</i>	ABC transportér zinku, SBP	90%	42.55%	2e-80
BP3079	<i>E. coli</i>	Protein s doménou DUF1007	70%	32.35%	4e-14
BP3078	<i>E. coli</i>	Nikl/kobalt transportér	67%	34.51%	7e-12
BP3077	<i>E. coli</i>	TonB receptor	91%	40.96%	1e-177

* Homolog se pravděpodobně nevyskytuje kvůli nízkému pokrytí

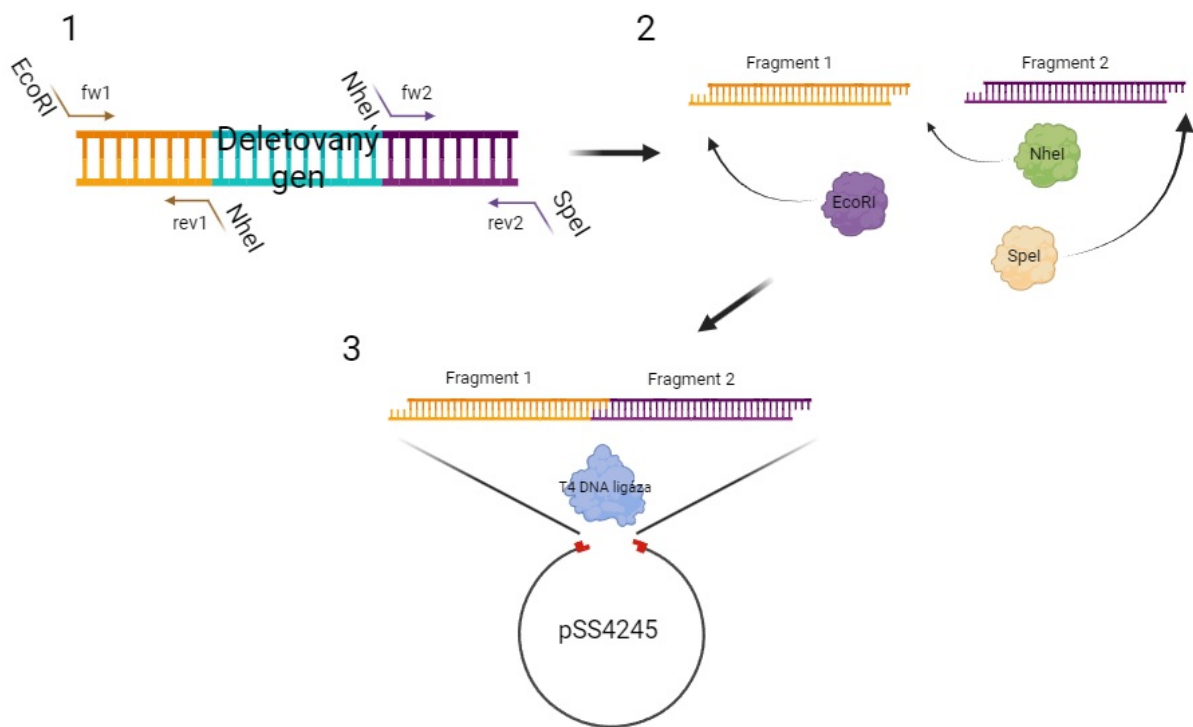
4.1 Mutantní kmeny *B. pertussis*

Pro účely porovnání vlastností vybraných genů oproti WT byly vytvořeny následující deleční mutanty (viz tabulka číslo 12) podle postupu popsaného v kapitole 3.2.3.3, znázorněném na schématu číslo 10.

Nejprve byly vytvořeny kmeny s jednotlivými deletovanými geny, následovaly více-genové mutace a poté byly tvořeny kombinace mutací. Pro konstrukci vektorů byly vytvořeny inserty pomocí primerů z tabulky 9. Insert pro delecí genu *BP3083* byl syntetizován pomocí primerů BP3083 fw1, BP3083 rev1, BP3083 fw2 a BP3083 rev1. Pro delecí tří genů *BP3082-BP3080* byly využity konstrukty uvozené primery BP3082-80 fw1, BP3082-80 rev1, BP3082-80 fw2 a BP3082-80 rev2, dále pro prodloužení delecí o další tři geny *BP3079-BP3077* byl klonovací vektor s insertem amplifikovaným pomocí primerů BP3082-77 fw1, BP3082-77 rev1, BP3082-77 rev2 a BP3082-80 fw2 následně zaklonován do kmene $\Delta BP3082-80$, čímž vznikla delecí celého úseku *BP3082-BP3077*. Obdobným způsobem, jako byl insert tvořený pomocí primerů BP3083-80 fw1, BP3083 fw1, BP3083 rev2 a BP3083-80 rev2 za pomoci vektoru vložen do kmene s genetickým požadím $\Delta BP3082-80$ a $\Delta BP3082-77$, vznikly kmeny s dvojitou delecí *BP3083* a úseku *BP3082-BP3080*, nebo *BP3083* a *BP3082-BP3077*. Posledním vytvořeným kmenem byl $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$, který byl zkonstruován zaklonováním vektoru s insertem amplifikovaným pomocí primerů BP3078 fw1, BP3078 rev1, BP3078 fw2 a BP3078 rev2 do delečního kmene $\Delta BP3083$. Všechny amplifikační kroky byly ověřovány pomocí elektroforézy (viz kapitola 3.2.3.2) a výsledné produkty byly ověřeny pomocí sekvenace DNA sekvenačními primery pSS4245 fw a pSS4245 rev (viz kapitola 3.2.3.5).

Tabulka 12: Deleční mutanty *B. pertussis*.

Název	Deletované geny
$\Delta BP3083$	<i>BP3083</i>
$\Delta BP3082-BP3077$	<i>BP3082-BP3077</i>
$\Delta BP3082-BP3080$	<i>BP3082-BP3080</i>
$\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3077$	<i>BP3083-BP3077</i>
$\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$	<i>BP3083-BP3080</i>
$\Delta BP3083 + \Delta BP3078$	<i>BP3083 a BP3078</i>



Obrázek 10: Zjednodušené schéma tvorby delečních mutant – Ve schématu je zjednodušeně znázorněn postup tvorby deleční kazety a její zaklonování do vektoru pSS4245. V prvním kroku je modře zobrazen deletovaný gen, okolo kterého jsou žlutě a fialově vyznačeny oblasti, které jsou slouží pro homologní rekombinaci a jsou amplifikovány zvlášť pomocí primerů nesoucí sekvenci rozpoznávanou RE NheI (rev1 a fw2), EcoRI (fw1) a SpeI (rev2). V následujícím kroku 2 je naznačeno restrikční štěpení fragmentů vzniklých PCR amplifikací, nejprve zevnitř RE NheI (následuje ligace obou fragmentů k sobě a reamplifikace vnějšími primery fw1 a rev2 - není uvedena ve schématu) a poté zevnitř RE EcoRI a SpeI. Poslední krok 3 zahrnuje ligaci spojeného fragmentu 1 a 2 s předem naštěpeným vektorem pomocí RE EcoRI a SpeI. Další kroky zahrnující vnesení vektoru do organismu a přenesení insertu pomocí homologní rekombinace jsou detailně popsány v kapitole 3.2.3.4. Schéma bylo vytvořeno pomocí editoru Biorender.

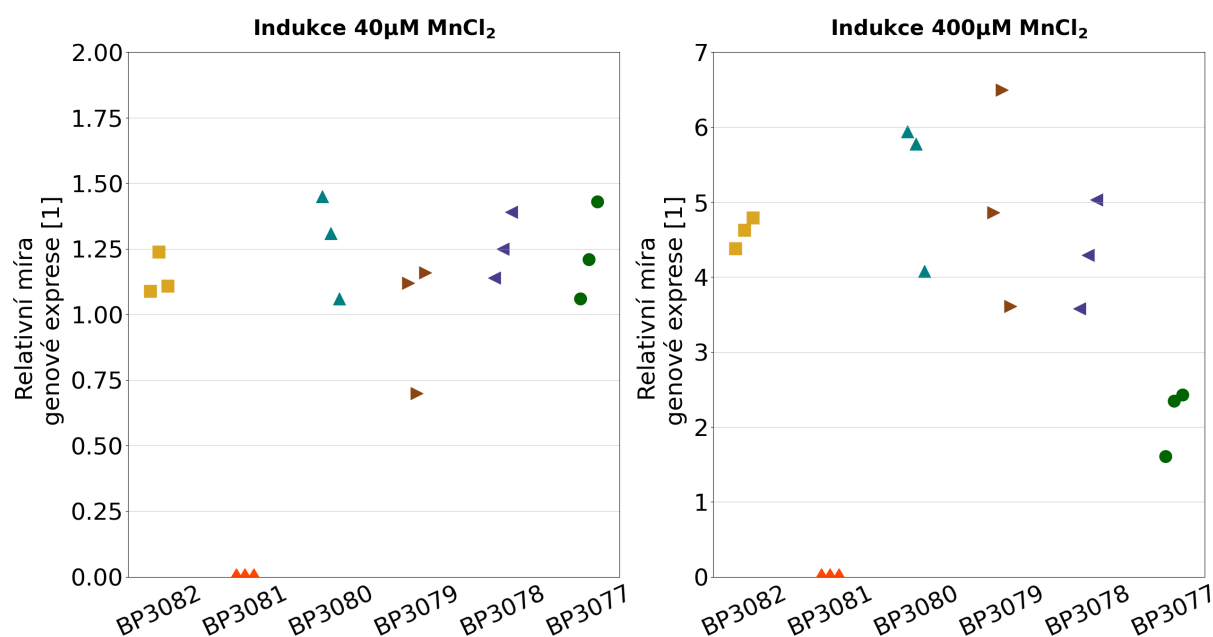
4.2 Vliv média obohaceného o mangan na růstové vlastnosti a genovou expresi u *B. pertussis*

Pro ověření vlastností vybraných genů byla využita metoda RT-qPCR a na základě $\Delta\Delta C_t$ výpočtu byla stanovena míra genové exprese u daných bakteriálních kmenů v různých podmínkách. Kmeny *B. pertussis* využívané v této kapitole jsou převážně WT a $\Delta BP3083$, které po srovnání poskytují náhled do problematiky lokusu *BP3082-BP3077*. Kultivace bakterií a veškerá příprava vzorků až po získání dat je popsána v kapitole číslo 3.2.1.1, respektive 3.2.2. Při kultivaci bylo využíváno nejprve standardní SS médium, ale vzhledem k tomu, že standardní SS médium obsahuje poměrně velké množství železa, bylo pro pozdější experimenty využíváno chelatované SS médium s přidaným $FeSO_4$ tak, aby výsledná koncentrace byla $1\mu M$ (v kontrastu se standardním SS médiem, kde je výsledná koncentrace $36\mu M$).

Pro zjištění růstových vlastností delečních mutant byla nejprve provedena měření růstu těchto kmenů v různě obohacených médiích v porovnání s WT. Na základě měření byly sestaveny grafy znázorňující získaná data. Pro většinu experimentů bylo použito chelatované SS médium, do kterého byly přidávány roztoky kovů, viz tabulka 3.

Z grafu číslo 11 je patrné, že při $40\mu M$ koncentraci $MnCl_2$ ve standardním SS médiu dochází k nepatrně zvýšené expresi oproti podmínkám bez přidaného $MnCl_2$ pro geny *BP3082* a dále *BP3080-BP3077*. Při indukci vyšší koncentrací $MnCl_2$ je změna genové exprese více zřetelná s výjimkou genu *BP3081*. I přes opakovanou snahu s využitím více sad primerů nebyl zaznamenán žádný RT-qPCR produkt pocházející z *BP3081* mRNA a to jak v případě indukce manganem, tak i v kontrolních podmínkách. To je extrémě překvapivé, neboť začátek genu *BP3081* se překrývá se STOP kodonem genu *BP3082* a podobně STOP kodon *BP3081* se překrývá se START kodonem *BP3080*, tzn. typické uspořádání pro operon ABC transportéru (viz schéma lokusu 9). Cílem pro další experimenty bylo navrhnout médium, ve kterém bude gen *BP3081* exprimován.

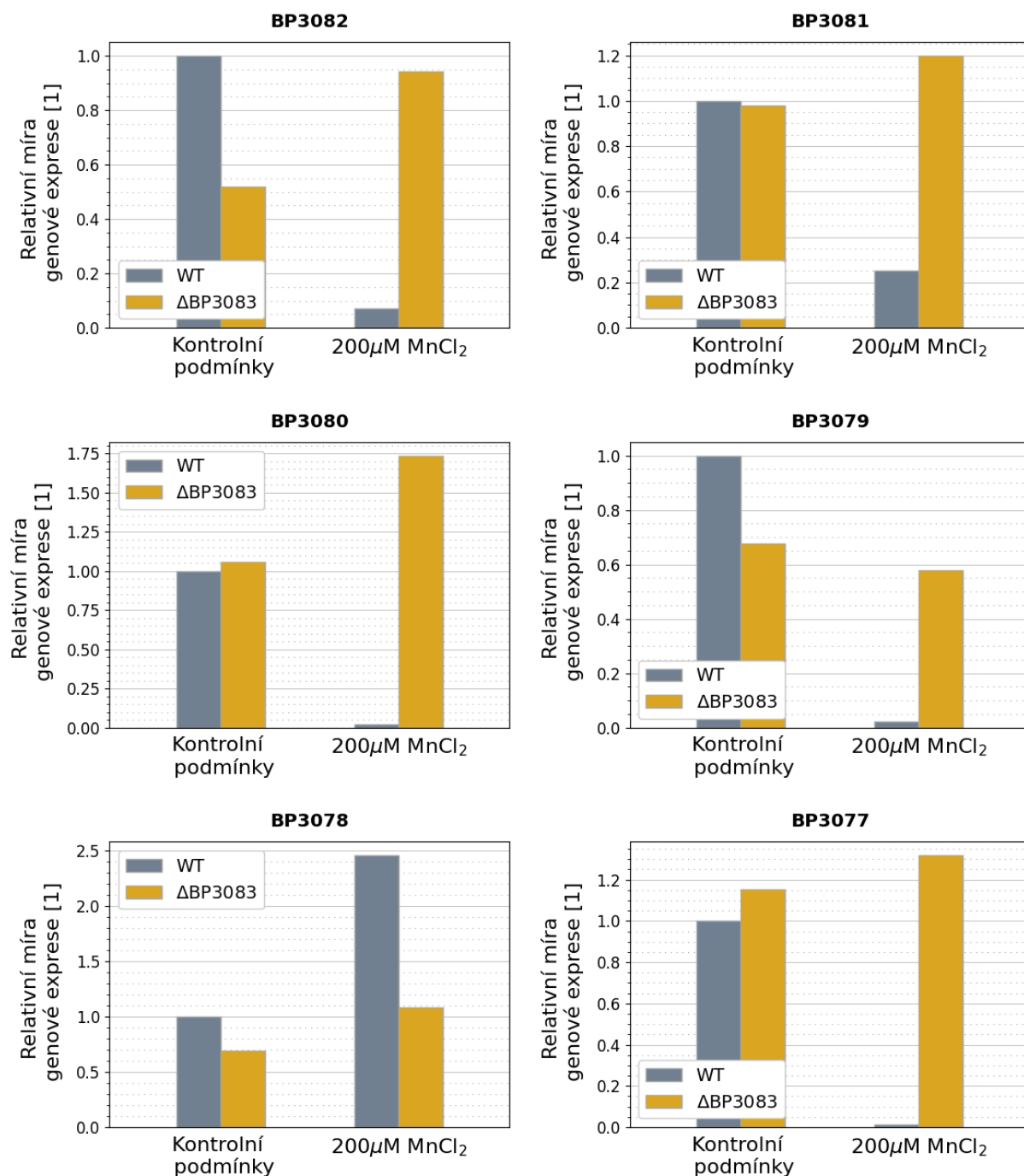
V dalším experimentu bylo využito chelatované SS médium namísto standardního, kde byla kontrolována hladina železa (výsledná koncentrace $1\mu M$) a zároveň byl sledován efekt přidání $MnCl_2$ o výsledné koncentraci $200\mu M$. U většiny genů bylo pozorováno, že u kmene WT po přidání $MnCl_2$ docházelo ke snížení míry exprese a naopak u kmenu $\Delta BP3083$ se represe neprojevila. Opačný trend nastal u genu *BP3078*, kdy naopak došlo ke zvýšené míře exprese po přidání manganu v případě WT. Oproti předchozímu experimentu znázorněnému na grafu číslo 11 zde došlo k expresi genu *BP3081*, nicméně oproti



Obrázek 11: Indukce lokusu *BP3082-BP3077* 40 μM a 400 μM MnCl₂ – Na obrázku je grafické znázornění výsledků relativní změny exprese jednotlivých genů v lokusu pro dvě různé koncentrace MnCl₂ (40 μM a 400 μM). Jako kontrolní vzorek byl použit kmen *B. pertussis* WT kultivován ve standardním SS médiu bez přidaného MnCl₂. Experiment byl proveden v biologickém triplicátu a každý bod odpovídá jednomu nezávislému experimentu. Buněčný pelet pro izolaci RNA pro tento experiment byl zhotoven v čase 1 h po indukci MnCl₂.

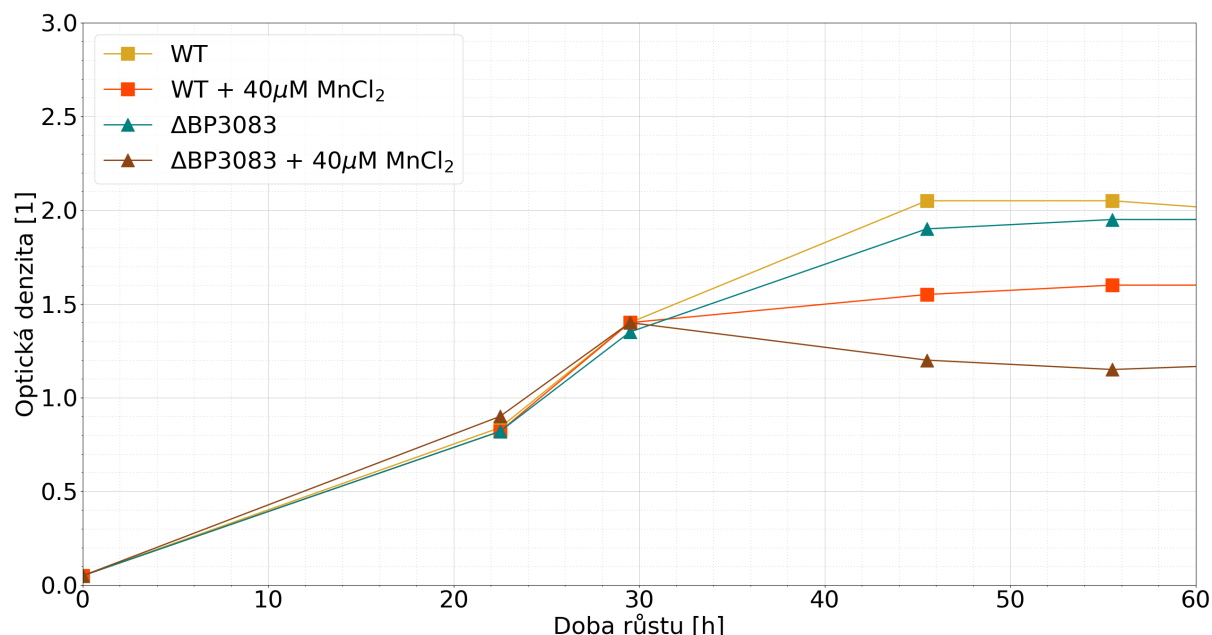
zbylým genům pro ABC transportér (*BP3082* a *BP3080*) byla jeho míra exprese výrazně nižší, tzn. nebyla ve stechiometrickém poměru (na základě zde neprezentovaných dat).

Z obrázku 12 vyplývá, že *BP3083* je represor operonu *BP3082-BP3077* a tudíž v médiu obsahující vysoké dávky manganu by mohla delece tohoto genu způsobit zpomalení růstu oproti WT. Nicméně je známo, že *B. pertussis* obsahuje nefunkční exportér manganu, který je ovšem opraven již po vystavení buněk vyšším dávkám manganu (Čapek *et al.*, 2021). Z tohoto důvodu je potřeba vliv delece *BP3083* zkoumat v genetickém kontextu jak divokého, tak i rezistentního kmene na mangan (tzv. Mn-rezister). Aby nedocházelo k opravě manganového exportéru a zároveň aby divoký kmen proliferoval je nejvyšší přípustná koncentrace manganu v médiu 40 μM. Naopak v případě Mn-rezisterového kmene je limitace stanovena rozpustností manganu v daném médiu a to je 1 mM. Na následujícím grafu číslo 13 je znázorněn růst kmenů v genetickém kontextu WT a na obrázku číslo 14 je znázorněn růst v genetickém kontextu Mn-rezisterového kmene. V obou případech nedochází ke zpomalení růstu z důvodu delece *BP3083*.



Obrázek 12: Represe lokusu *BP3082-BP3077* pomocí 200 μM $MnCl_2$ – V grafech jsou znázorněny relativní změny genové exprese vztažené ke kontrole *B. pertussis* WT, kultivované v chelatovaném SS médiu. V experimentu byly použity bakteriální kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ a k indukci byl využit $MnCl_2$ s výslednou koncentrací 200 μM v médiu. Kultura pro následnou izolaci RNA byla odebrána 6 h po začátku represe. Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmenu WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.

Jak je patrné z grafu na obrázku číslo 13, tak kmeny *B. pertussis* v chelatovaném médiu bez přidaného MnCl_2 nevykazují rozdíl v růstových vlastnostech. Přidání MnCl_2 do média způsobilo u obou kmenů nepatrné zhoršení růstu.

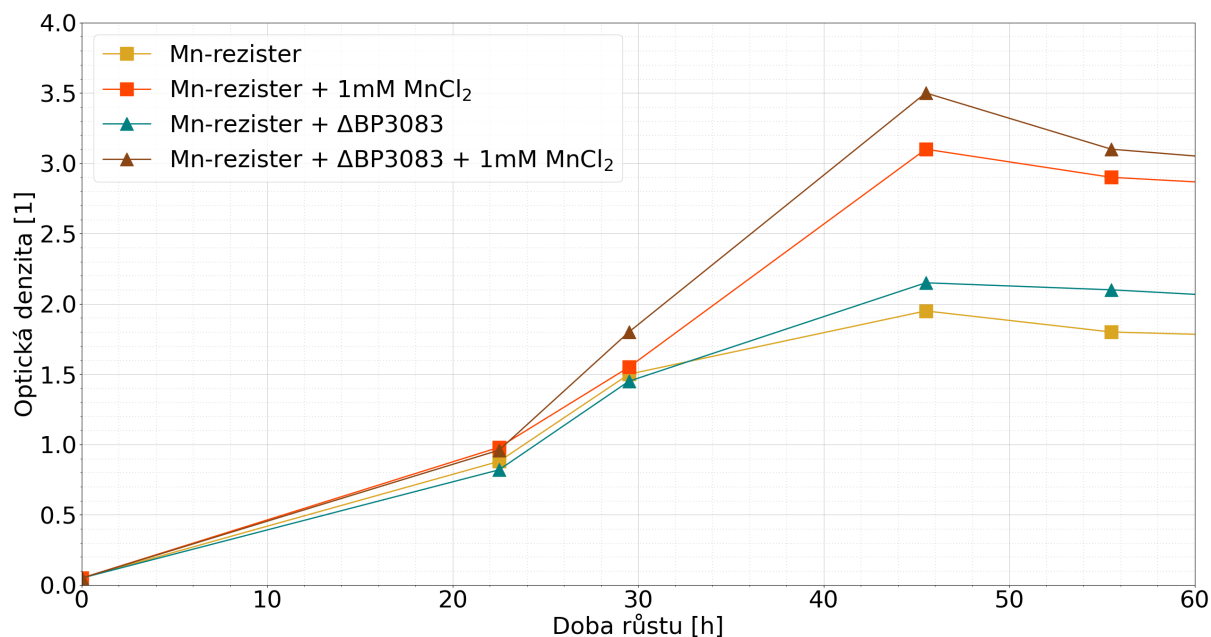


Obrázek 13: Růstová křivka v přítomnosti 40 μM MnCl_2 – Graf zachycuje optickou densitu bakteriální kultury v závislosti na čase pro vybrané kmeny *B. pertussis* WT a ΔBP3083 v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o MnCl_2 .

Aby bylo možné dosáhnout vyšší koncentrace MnCl_2 , bylo zapotřebí využít kmen Mn-rezister, který má funkční gen *BP3410*, který kóduje exportér manganu a to pro genetické pozadí WT i kmenu ΔBP3083 .

V grafu číslo 14 je zachycen vliv 1mM MnCl_2 na růst Mn-rezisterových kmenů s regulovaným i deregulovaným (ΔBP3083) operonem *BP3082-BP3077*. Ani v kontrolních ani v experimentálních podmínkách oba porovnávané kmeny nevykazují rozdíly růstových vlastností. Je zde ale patrný zlepšený růst u obou kmenů v médiu s přidaným MnCl_2 a to i přes jeho vysokou koncentraci.

Zkoumání vlivu média s přidaným MnCl_2 přineslo řadu dílčích výsledků. V RT-qPCR experimentech byla v kmenu WT pozorována nejprve indukce celého operonu s výjimkou genu *BP3081* vysokou koncentrací MnCl_2 ve standardním SS médiu. Následně po využití chelatovaného SS média s přidaným MnCl_2 byl pozorován opačný efekt a zároveň se podařilo najít podmínky pro expresi genu *BP3081*. Pro deleční kmen ΔBP3083 s deregulovaným operonem nebyla pozorována změna exprese u žádných genů v kontrolních i experimentálních podmínkách. Další ověření vlastností lokusu *BP3083-BP3077* bylo provedeno pomocí měření optické denzity bakteriální kultury a následném vynesení hodnot do růstové křivky. Byly zde porovnávány kmeny WT a ΔBP3083 s nižší koncent-



Obrázek 14: Růstová křivka v přítomnosti 1mM MnCl₂ – Graf zachycuje optickou denzitu bakteriální kultury v závislosti na čase pro vybrané kmeny *B. pertussis* Mn-rezister a Mn-rezister s delecí genu *BP3083* v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o MnCl₂.

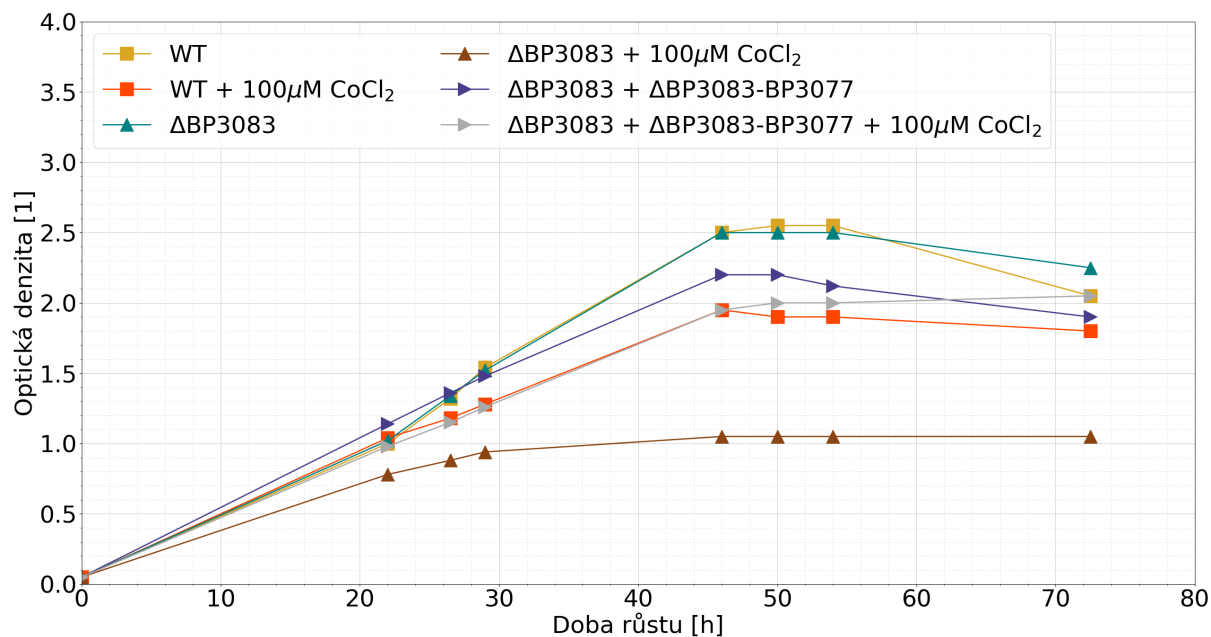
rací MnCl₂ (40μM), která je ale vzhledem k nefunkčnímu exportéru manganu BP3410 pro *B. pertussis* již mírně toxická. Aby bylo možné buňky vystavit vyšší koncentraci MnCl₂, byl použit kmen Mn-rezister, který má narozdíl od WT funkční gen *BP3410* a dokáže exportovat mangan. Růstové vlastnosti tohoto kmene byly porovnávány s kmenem Mn-rezister v kombinaci s delecí genu *BP3083*. Mezi těmito dvěma kmeny nebyly pozorovány odchylky v růstu v chelatovaném SS médiu bez i s 1mM MnCl₂. Zdá se, že vzhledem k absenci rozdílu v růstu delečního kmene *ΔBP3083* s deregulovaným operonem *BP3082-BP3077* oproti WT, respektive Mn-rezister není ani jeden z transportérů v operonu zodpovědný za import manganu. Výsledky z RT-qPCR dle grafu číslo 12 ale naznačují, že BP3083 reaguje na změnu koncentrace Mn v médiu.

4.3 Vliv média obohaceného o kobalt na růstové vlastnosti a genovou expresi u *B. pertussis*

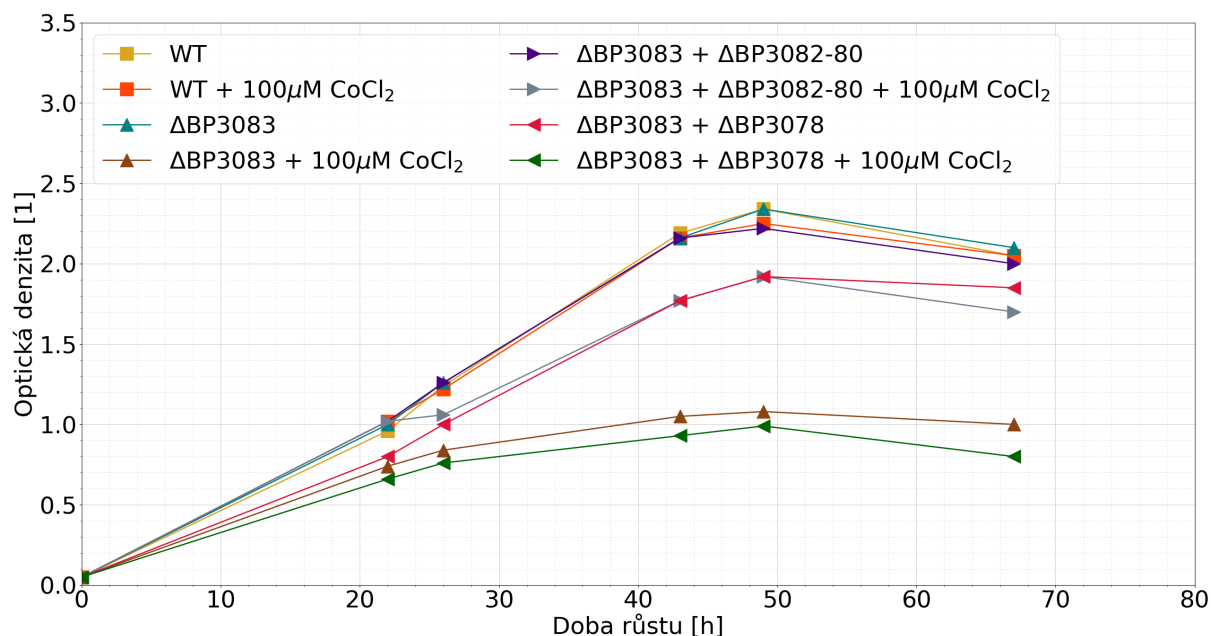
Mezi další přechodné kovy, jejichž vliv na vybrané kmeny *B. pertussis* byl zkoumán, patřil kobalt. Ověření růstových vlastností bylo provedeno pro kmeny *B. pertussis* WT a pro deleční kmeny $\Delta BP3083$, $\Delta BP3083 + \Delta BP3082-77$, $\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$. Stejně jako u růstové křivky s $MnCl_2$ (viz obrázek 13) byl použit kmen s deregulovaným lokusem a pro rozlišení růstových vlastností kmenů s deletovanými transportéry byly vybrány kmeny s kombinovanou delecí regulátoru *BP3083* a *BP3082-BP3080* nebo *BP3078*. Zde již bylo využíváno pouze chelatované SS médium s přidáními esenciálními kovy ($FeSO_4$, $MgCl_2$ a $CaCl_2$) dle kapitoly 3.1.3 obohacené o $CoCl_2$.

Nejprve byly zkoumány růstové vlastnosti kmenů s regulovaným, deregulovaným a deletovaným operonem v přítomnosti kobaltu. Narozdíl od manganu (viz obrázek číslo 13) se tentokrát projevil rozdílný růst v testovaných podmínkách. Jak lze vidět na obrázku číslo 15, kmen s konstitutivně přepisovanými transportéry vykazoval výrazně nižší růst a naopak kmen jak s deletovaným regulátorem tak i celým operonem vykazoval podobný růst jako WT. Aby bylo možné určit, který z transportérů je odpovědný za intoxikaci buňky kobaltem, byly v následujícím experimentu využity kmeny s kombinovanou delecí regulátoru a transportérů ($\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$). Z obrázku 16 je patrné, že kmeny $\Delta BP3083$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$ dosahovaly nižší optické denzity oproti zbylým kmenům v přítomnosti kobaltu. Je důležité si všimnout, že kombinací delece genů pro ABC transportér (*BP3082-BP3080*) s delecí genu *BP3083* došlo k návratu růstu srovnatelného s WT oproti kmenu $\Delta BP3083$. Bez přítomnosti kobaltu vykazovaly všechny kmeny podobný růst.

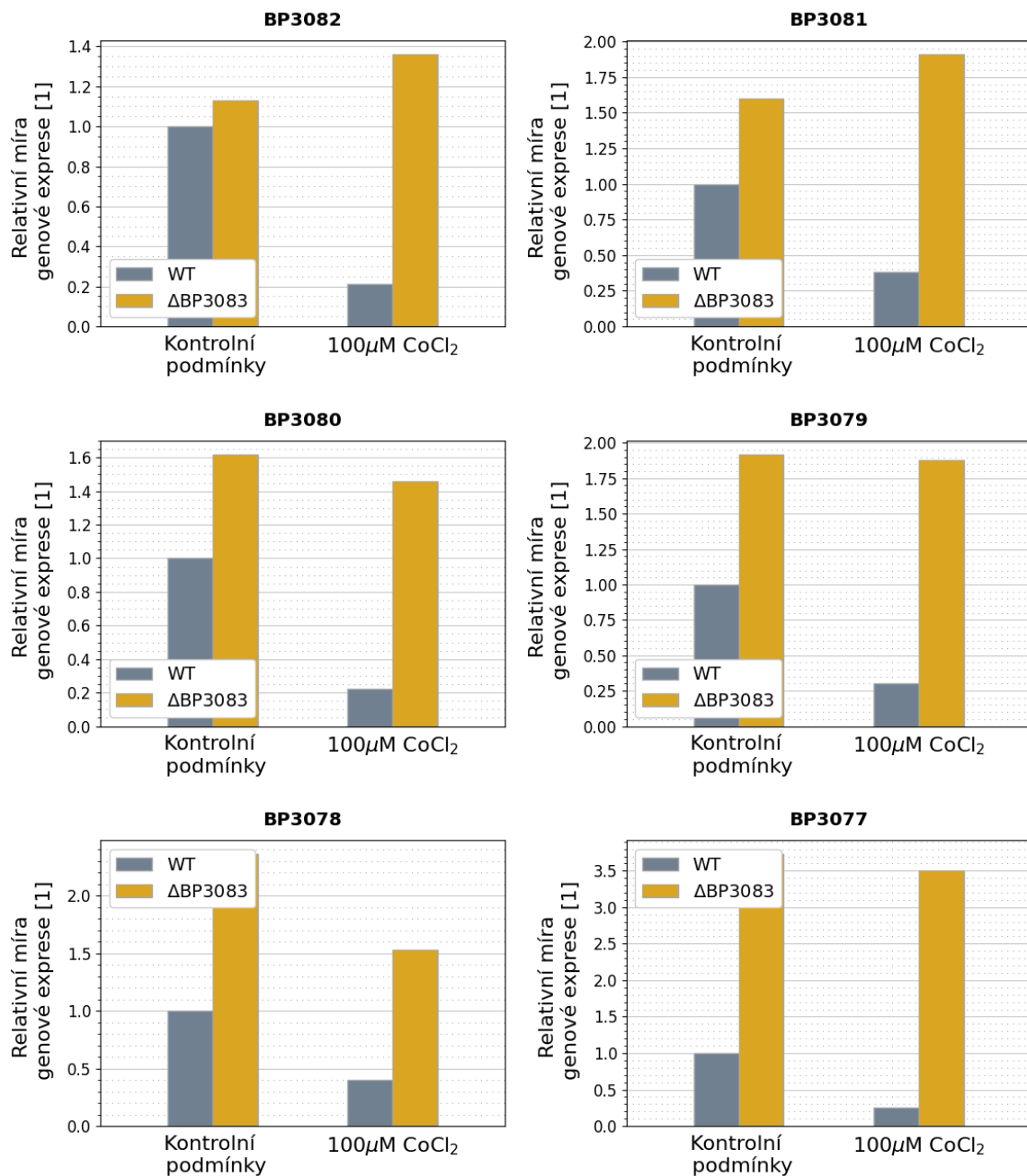
V experimentu znázorněném v grafu číslo 17 byl sledován vliv na genovou expresi po přidání $CoCl_2$ do média $CoCl_2$. Pro WT byla u všech sledovaných genů pozorována snížená míra exprese po vystavení bakterií $CoCl_2$. V případě kmene $\Delta BP3083$ byla po vystavení kobaltu míra exprese všech genů v operonu nezměněna, což znamená, že došlo k deregulaci sledovaného operonu.



Obrázek 15: Růstová křivka v přítomnosti 100 μM CoCl₂ – V grafu je patrná závislost optické denzity kultury na čase pro kmeny *B. pertussis* WT, $\Delta BP3083$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3077$ v podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média s přidáním kobaltem o výsledné koncentraci 100 μM v médiu.



Obrázek 16: Růstová křivka v přítomnosti 100 μM CoCl₂ – V grafu je znázorněna závislost měřené optické denzity bakteriální kultury na čase pro kmeny *B. pertussis* WT, $\Delta BP3083$, $\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$ v růstových podmínkách chelatovaného SS média a obohaceného chelatovaného SS média o CoCl₂ o výsledné koncentraci 100 μM v médiu.



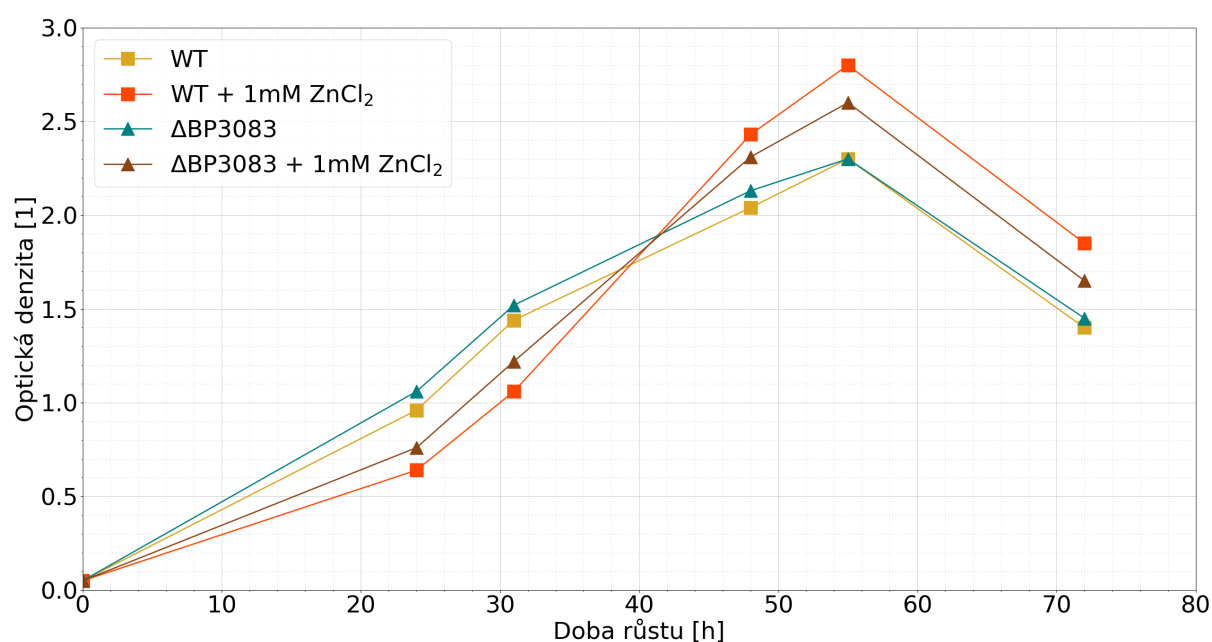
Obrázek 17: Represe lokusu *BP3082-BP3077* 100μM CoCl₂ – Grafy zobrazují relativní změny genové exprese vztažených ke kontrole *B. pertussis* WT, kultivované v chelatovaném SS médiu. V experimentu byly použity bakteriální kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ a k indukci byl využit CoCl₂, jehož výsledná koncentrace v médiu byla 100μM. Kultura pro následnou izolaci RNA byla odebrána 1 h po přidání CoCl₂. Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmenu WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.

Narozdíl od manganu byl u kobaltu hned v prvním experimentu (graf číslo 16) pozorovaný toxický vliv kovu na buňky u kmene $\Delta BP3083$ s deregulovaným operonem. Pro odlišení dvou transportérů byly využity deleční kmeny $\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$, které kromě odstraněných transportérů neobsahují ani gen pro represor $BP3083$, takže je v těchto kmenech exprimován vždy jen jeden z transportérů konstitutivně. Zde se podařilo ukázat, že u kmenu s deregulovanou expresí genů $BP3082-BP3080$ kódujících ABC transportér (kmen $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$) docházelo při vystavení toxické koncentraci CoCl_2 ke zhoršení růstu, stejně jako u kmene $\Delta BP3083$ s deregulovaným celým operonem. Zdá se tedy, že je za import kobaltu do buněk zodpovědný ABC transportér, homolog SitABCD, který využívá *S. enterica* k importu manganu. U RT-qPCR výsledků byl pozorován stejný vliv kobaltu na bakteriální kmeny WT a $\Delta BP3083$, jako tomu bylo u manganu (viz graf číslo 12 a 17), kdy u WT dochází ke snížení exprese u pozorovaných genů a v případě delečního kmene není patrný rozdíl v expresi. Není tedy jasné, který z kovů je pro BP3083 vlastní.

4.4 Vliv média obohaceného o další vybrané kovy na růstové vlastnosti a genovou expresi u *B. pertussis*

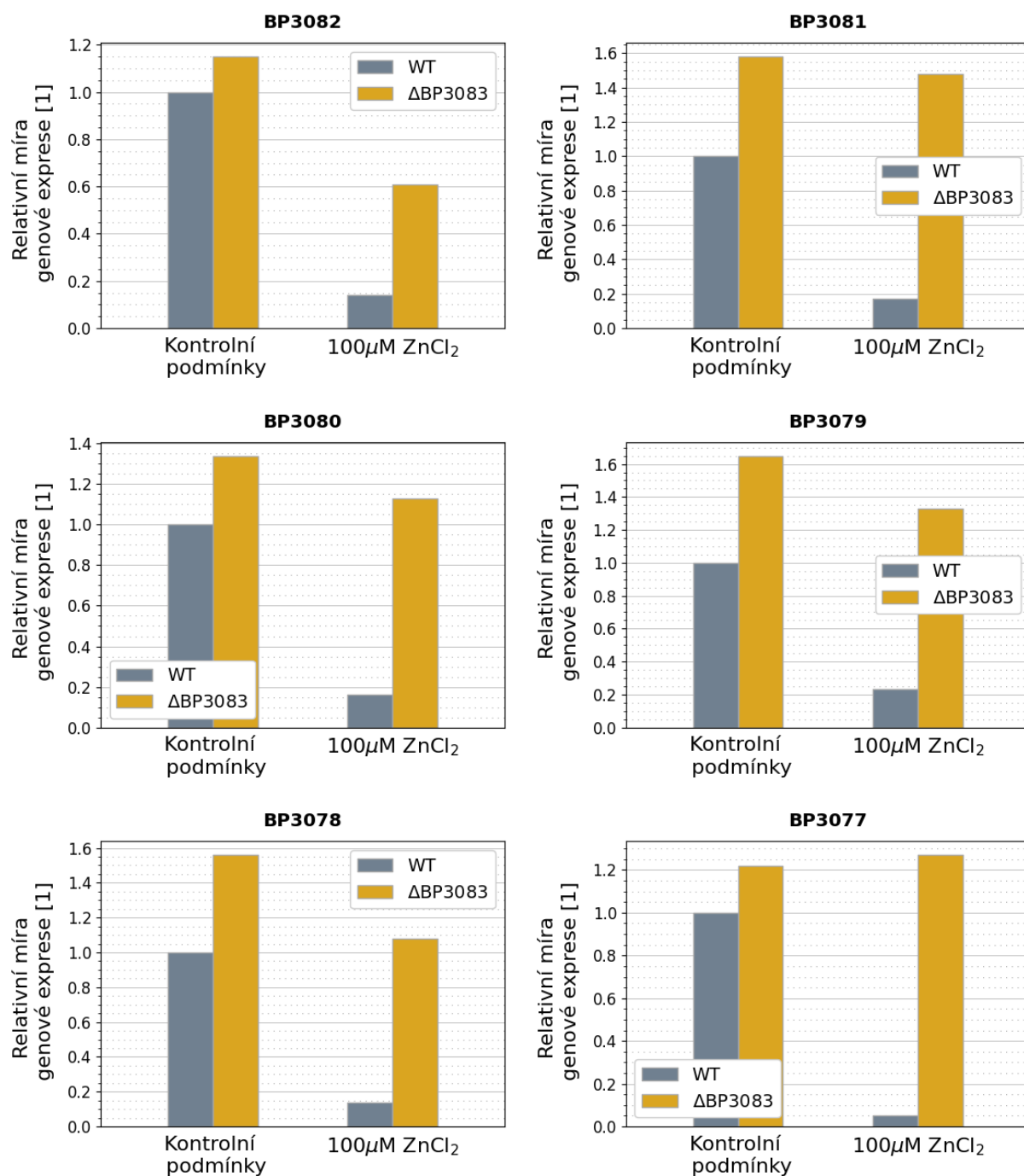
Dalším zkoumaným faktorem bylo obohacení chelatovaného SS média o další přechodné kovy, konkrétně zinek, nikl, měď a železo. V této kapitole jsou stejně jako v předchozí využívány kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ kultivované v chelatovaném SS médiu s přidáním esenciálních kovů (FeSO_4 , CaCl_2 , MgCl_2) a obohacené o přechodné kovy.

Bakteriální kmeny v tomto případě, dle grafu číslo 18, nevykazují signifikantní pokles v růstu, který by způsoboval vliv suplementace média ZnCl_2 na regulovaný, či v případě $\Delta BP3083$ deregulovaný operon *BP3082-BP3077*.



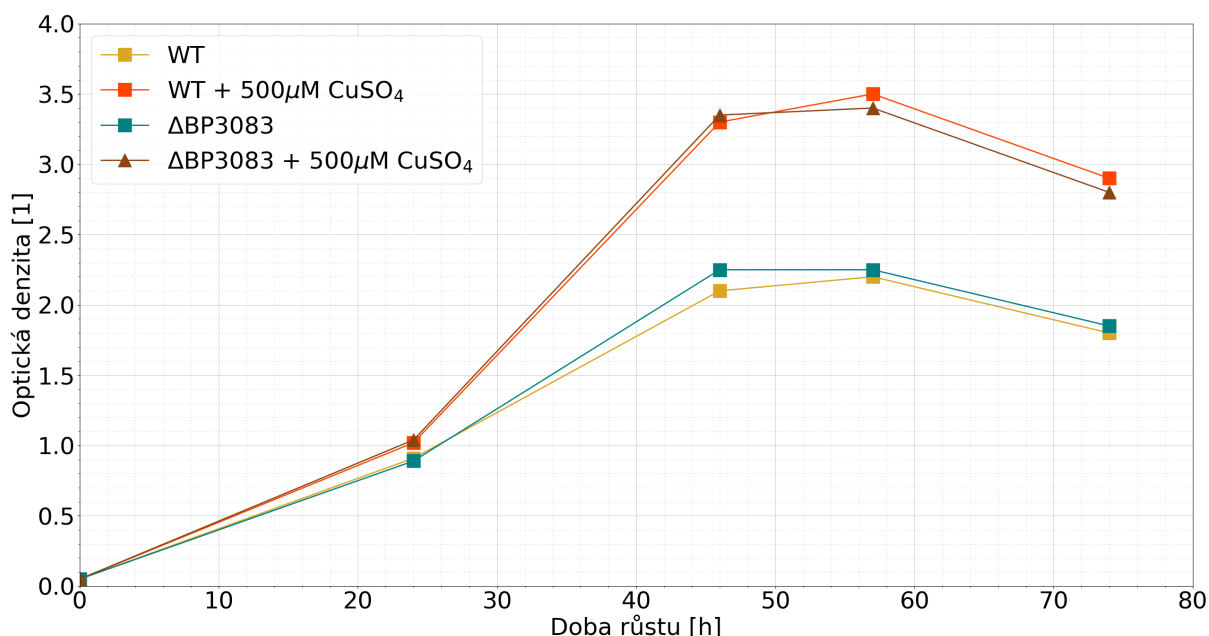
Obrázek 18: Růstová křivka v přítomnosti 1mM ZnCl_2 – Graf znázorňuje závislost měřené optické hustoty bakteriální kultury na čase pro vybrané kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o ZnCl_2 , jehož výsledná koncentrace v médiu byla 1mM.

Graf číslo 19 znázorňuje vliv ZnCl_2 na genovou expresi lokusu *BP3082-BP3080* pro kmeny WT a $\Delta BP3083$. Pro kmen WT má Zn inhibiční účinek, zatímco u kmenu $\Delta BP3083$ není patrná změna genové exprese.

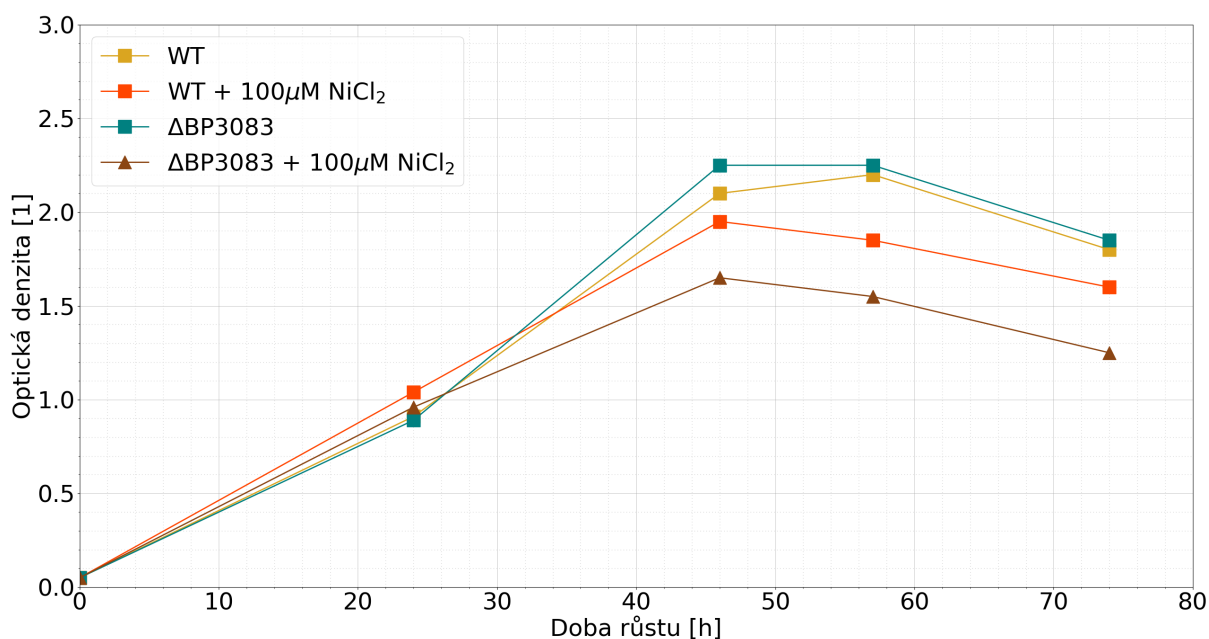


Obrázek 19: Represe lokusu *BP3082-BP3077* 100 μM $ZnCl_2$ – Graf znázorňuje relativní míru genové exprese pro vybrané kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o $ZnCl_2$. Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmenu WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.

Mezi další testované přechodné kovy patřily měď a nikl. Dle aminokyselinové sekvenční homologie pro BP3078 vyplývá, že by se mohlo jednat o vysokoafinitní transportér niklu. U obou kmenů byl pozorován zvýšený růst v médiu obohaceném o měď (viz graf číslo 20). Naopak nepatrně snížený růst vykazovaly kmeny rostoucí v médiu s NiCl_2 (graf číslo 21). Nicméně delece genu *BP3083* neměla vliv na růst v přítomnosti ani jednoho z kovů.

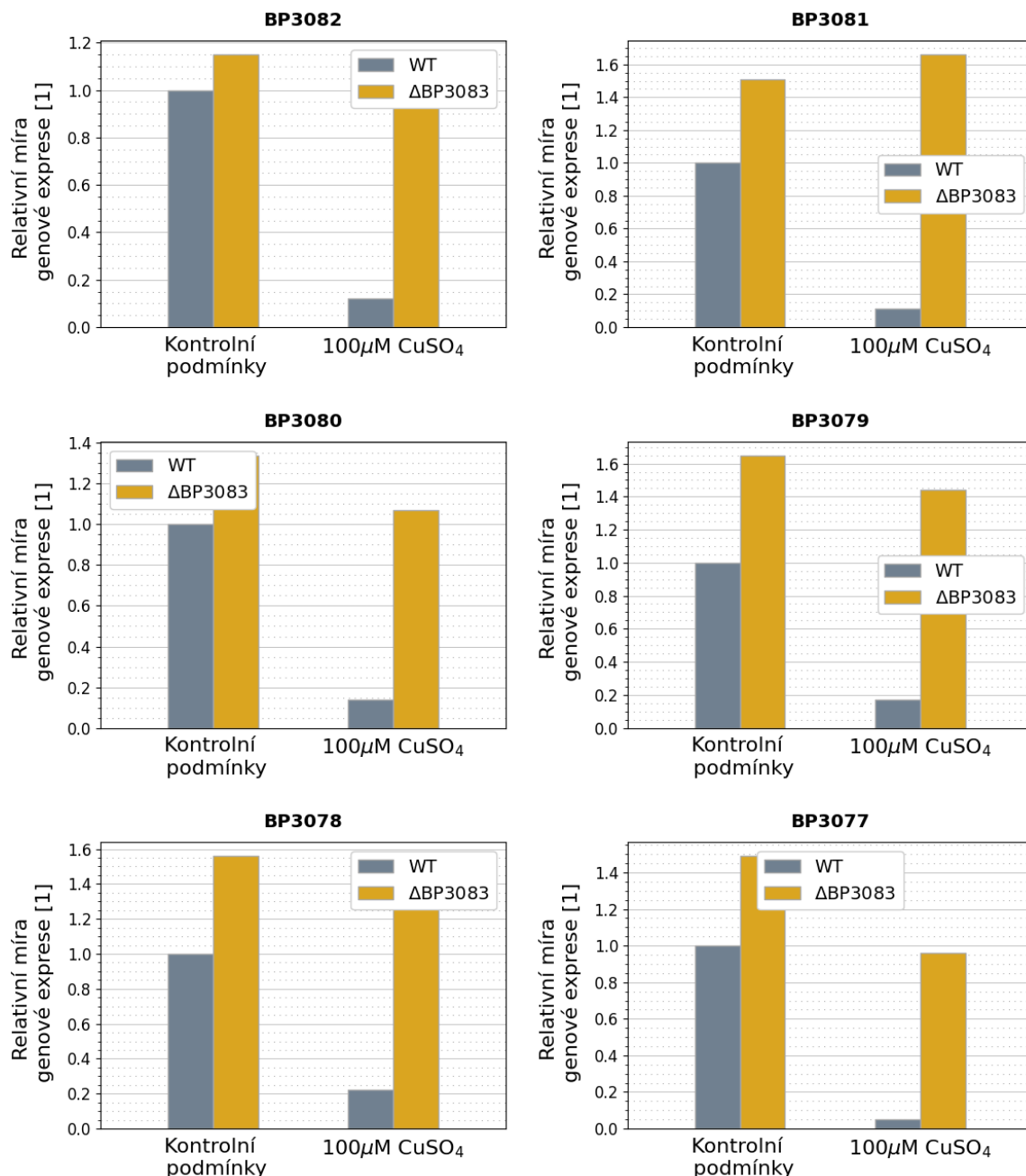


Obrázek 20: Růstová křivka v přítomnosti 500 μM CuSO_4 – Z grafu lze vyčíst závislost měřené optické hustoty bakteriální kultury na čase pro kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o CuSO_4 .

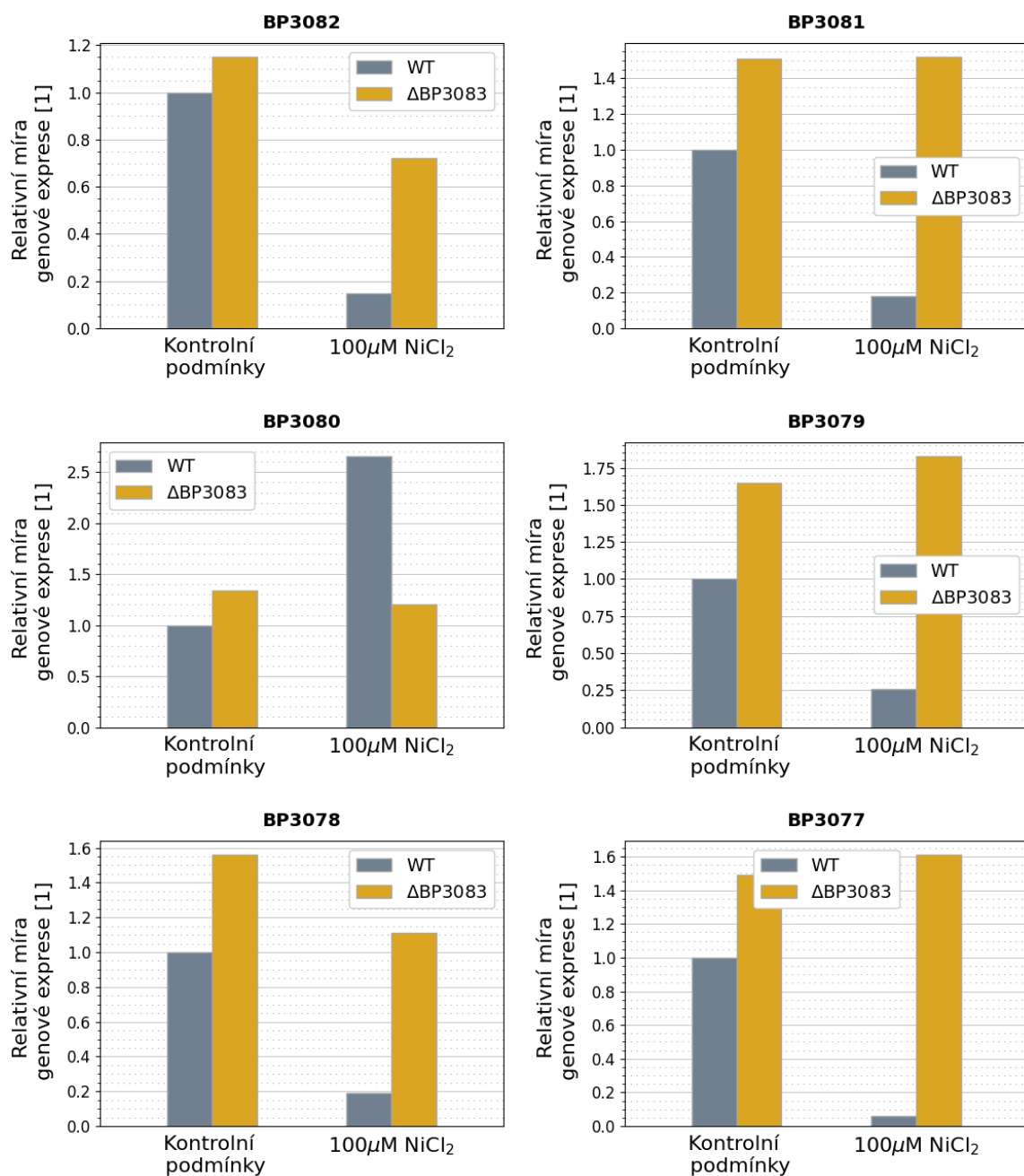


Obrázek 21: Růstová křivka v přítomnosti 100 μM NiCl_2 – Z grafu lze vyčíst závislost měřené optické hustoty bakteriální kultury na čase pro kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ v růstových podmínkách chelatovaného SS média a chelatovaného SS média obohaceného o NiCl_2 .

V experimentu znázorněném na obrázku číslo 22 a 23 byla sledována snížená exprese pro všechny geny, s výjimkou *BP3080* v kontextu vyšší koncentrace NiCl_2 , v experimentálních podmínkách pro kmen *B. pertussis* WT. U kmene ΔBP3083 byla exprese genů *BP3082-BP3077* podobná bez ohledu na přidané kovy, došlo opět k deregulaci operonu.



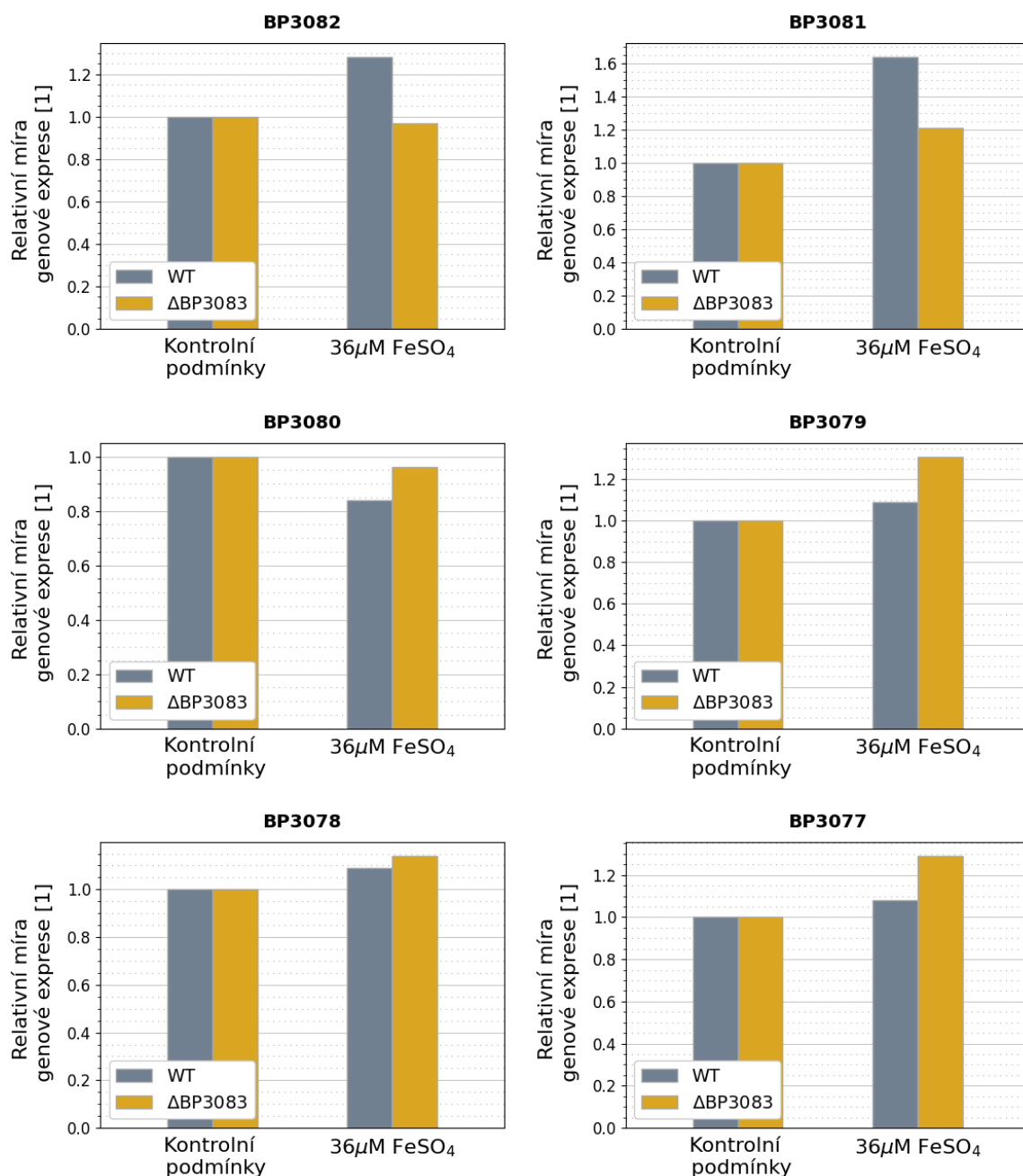
Obrázek 22: Represe lokusu *BP3082-BP3077* 100 μM CuSO_4 – Na obrázku je grafické znázornění výsledků relativní změny genové exprese vztažených ke kontrole *B. pertussis* WT, kultivované v chelatovaném SS médiu. Pro experiment byly využity kmeny WT a ΔBP3083 . Roztok kovu byly přidán do média, aby jeho výsledná koncentrace byla 100 μM. Pelet pro izolaci RNA pro tento experiment byl zhotoven v čase 1 h po přidání CuSO_4 . Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmene WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.



Obrázek 23: Represe lokusu *BP3082-BP3077* 100 μM NiCl_2 – Na obrázku je grafické znázornění výsledků relativní změny genové exprese vztažených ke kontrole *B. pertussis* WT, kultivované v chelovaném SS médiu. Pro experiment byly využity kmeny WT a $\Delta BP3083$. Buněčný pelet pro izolaci RNA byl zhotoven v čase 1 h po přidání NiCl_2 . Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmenu WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.

V *B. pertussis* se nachází dva paralogy regulátorů z Fur rodiny, jedním z nich je samotný Fur, který reaguje na železo, a druhým je studovaný BP3083. Z tohoto pohledu je velmi nepravděpodobné, že by BP3083 byl také zodpovědný za homeostázu železa, tzn. byl by druhý Fur. Nicméně i přesto byl zkoumán vliv železa na expresi operonu *BP3082-BP3077*. Pro RT-qPCR experiment byla zvolena indukce $36\mu\text{M}$ FeSO_4 . Tato koncentrace odpovídá standardnímu SS médiu, chelatací je zde odstíněna kontaminace dvojmocnými kovy z použitých chemikálií. V grafu číslo 24 není patrná žádná změna míry genové exprese v závislosti na použitý kmen, nebo médium. Nicméně je překvapivé, že byla pozorována exprese genu *BP3081*, která nebyla detekována v úvodních experimentech ve standardním SS médiu (viz graf číslo 11).

Byl prozkoumán také vliv dalších biologicky významných přechodných kovů na regulaci operonu *BP3082-BP3077* a buněčný růst, za přítomnosti nebo absence represoru BP3083. Stejně jako v případě MnCl_2 a CoCl_2 (viz kapitoly 4.2 a 4.3) i další kovy ZnCl_2 , NiCl_2 a CuSO_4 vyvolaly represi operonu *BP3082-BP3077* pokud nebyl regulátor BP3083 deletován. Naopak suplementace železa o vyšší koncentraci ($36\mu\text{M}$) do média neměla vliv na expresi operonu bez ohledu na delecí *BP3083*. Suplementace žádného z dalších kovů nevyvolala zhoršení růstu z důvodu absence *BP3083*, jako tomu bylo v případě kobaltu.



Obrázek 24: Indukce lokusu *BP3082-BP3077* 36 μM FeSO₄ – Na obrázku je grafické znázornění výsledků relativní změny genové exprese vztažených ke kontrole *B. pertussis* WT, kultivované v chelovaném SS médiu a v chelovaném SS médiu obohaceném o FeSO₄. Pro experiment byly využity kmeny WT a $\Delta BP3083$. Buněčný pelet pro izolaci RNA byl zhotoven v čase 1 h po přidání FeSO₄. Na obrázku je exprese každého genu prezentována zvlášť, proto není možné srovnávat expresi mezi různými geny. Expresi v případě kmenu WT bez přidaného kovu (kontrolní podmínky) je nastavena jako 1. Experiment byl proveden jednou.

5 Diskuze

Adaptace bakteriálních patogenů na intracelulární prostředí imunitních buněk je komplexní proces. Makrofágy jsou na invazi a eliminaci patogena vybaveny účinnými mechanismy, pomocí kterých vystavují bakteriální buňky různým stresům s účelem jejich eliminace. Rozsáhlá analýza transkriptomu hostitelské buňky a bakterie nabízí ucelený pohled toho, k jakým procesům v obou organizmech dochází. Výčet metabolických drah *B. pertussis* ovlivněných fagocytózou a působením makrofágů je uveden v kapitole 2.2.2. Na základě studie provedené ve spolupráci naší a vídeňské laboratoře (Farman *et al.*, 2023 a Petráčková *et al.*, 2020) bylo vybráno několik skupin genů pro další výzkum.

Jeden z nich byl lokus *BP3083-BP3077*, který je předmětem této práce. Tento lokus obsahuje paralog Fur regulátoru kódovaný genem *BP3083*, u kterého bylo experimentálně prokázáno, že se podílí na represi operonu *BP3082-BP3077* v přítomnosti přechodných kovů. Další geny v operonu kódují hypotetické transportéry přechodných kovů, ABC transportér kódovaný geny *BP3082-BP3080* a vysokoafinní transportér pro nikl anebo kobalt kódovaný genem *BP3078*. Zbývající dva geny kódují hypotetický protein BP3079 s neznámou funkcí a BP3077, který zastává funkci TonB receptoru. Na základě homologie s transportérem SitABCD u *S. Enterica* jsme předpokládali, že by BP3082-80 mohl importovat mangan, který bakterii napomáhá k odolnosti vůči oxidativnímu stresu (Kehres *et al.*, 2002b). Druhý transportér BP3078 svoji sekvenční homologií spadá do rodiny transportérů niklu a kobaltu. Překvapivá je vysoká míra homologie genů v lokusu s geny z *Mycobacteroides abscessus* (viz tabulka číslo 11), která patří mezi gram pozitivní bakterie. Především shoda s geny pro proteiny asociované s vnější membránou (Ton-B receptor) a periplazmatickými proteiny spojené s transportérem typu ABC je vzhledem k rozdílné stavbě těchto struktur u mykobakterií zvláštní.

První testovaná hypotéza byla zaměřena na vliv zvýšených koncentrací manganu na vybraný lokus. Předpokládali jsme, že pokud by ABC transportér BP3082-BP3080 importoval mangan a došlo k jeho deregulaci pomocí delece *BP3083*, bude docházet k otravě buněk manganem a tím pádem ke zhoršení růstových vlastností v přítomnosti manganu oproti kontrolním podmínkám. Z předchozí práce v naší laboratoři zaměřené na exportér manganu BP3410 jsme měli dobrou představu o tom, jak *B. pertussis* reaguje na různé koncentrace $MnCl_2$.

Znalost jediného exportéru manganu je důležitá pro porozumění jakým způsobem se *B. pertussis* chrání před toxickou koncentrací tohoto prvku. V genomu *B. pertussis* je za-

stoupen pseudogen pro exportér manganu BP3410 obsahující 30nukleotidovou inhibiční duplikaci, díky níž dochází k syntéze nefunkčního transportéru. Zároveň je gen *BP3410* pod negativní regulací riboswitch elementu a ke změně jeho konformace vedoucí k expresi genu je potřeba právě mangan. Zajímavé je, že po vystavení *B. pertussis* toxické koncentraci dochází k odstranění inhibiční duplikace a exprese genu *BP3410* má za následek produkci funkčního exportéru. Tyto bakterie se označují jako Mn-rezister a v rámci této práce byly využívány díky jejich vyšší odolnosti vůči MnCl_2 oproti kmenu *B. pertussis* WT (Čapek *et al.*, 2021).

Nejprve jsme stanovili relativní míru genové exprese genů v operonu a růstové vlastnosti vybraných kmenů v přítomnosti MnCl_2 . Pro RT-qPCR experiment bylo nejprve zvoleno standardní SS médium a k indukci operonu byl využit MnCl_2 o výsledné koncentraci 40 a 400 μM . Tento experiment přinesl velice překvapivé výsledky, neboť naproti hypotéze, že při toxické koncentraci MnCl_2 (400 μM) bude operon méně exprimován došlo k pravému opaku. Zároveň nedocházelo k žádné expresi genu *BP3081*, který kóduje permeázu ABC transportéru BP3082-BP3080, jehož sekvence se v místě START a STOP kodonu překrývá se sekvencemi vedlejších genů. Jakým způsobem dochází k eliminaci mRNA pro *BP3081* není známo, ale předpokládáme, že se tak děje na post-transkripční úrovni, vzhledem k uspořádání genů a k absenci vlastního promotoru. Nicméně pokud by skutečně permeáza BP3081 byla zodpovědná za import manganu, jednalo by se o unikátní mechanismus ochrany buňky před intoxikací manganem pomocí degradace vnitřního genu operonové mRNA. Proč není mRNA degradována celá a korespondující operon je naopak indukován může svědčit o nezbytnosti exprese například dalšího transportéru BP3078 za daných podmínek. Celkově by se mohlo jednat o elegantní mechanismus jak kontrolovat expresi dvou různých transportérů kódovaných v jednom operonu.

Na základě těchto výsledků jsme se rozhodli nadále využívat chelatované SS médium, do kterého jsou po chelataci přidány esenciální dvojmocné kovy CaCl_2 , MgCl_2 (dle standardního SS média, viz tabulka číslo 1 a 2) a FeSO_4 ve výsledné koncentraci 1 μM . Po změně média jsme již naměřili data v souladu s naší hypotézou, že zvýšená koncentrace manganu bude mít negativní vliv na expresi genů v operonu a také že deregulace operonu odstraněním regulátoru BP3083 bude vést k podobné expresi nezávisle na koncentraci manganu v médiu. Zároveň již byla detekována exprese genu *BP3081*, ačkoliv nedosahovala takové míry exprese, jako ostatní geny a nelze tedy mluvit o stechiometrickém poměru produktů genů pro ABC transportér (*BP3082-BP3080*). Druhá testovaná hypotéza v experimentech zahrnujících mangan byla založena na homologii ABC transportéru

BP3082-3080 s importérem manganu SitABCD u *S. enterica*. Nicméně nebyl pozorován rozdíl v růstu kmene s deregulovaným operonem ($\Delta BP3083$) ve srovnání s WT a kmenem Mn-rezister za toxických koncentrací manganu, což naznačuje, že operon *BP3082-BP3077* nepřispívá k otravě bakterií tímto kovem. Nepodařilo se nám potvrdit, že geny *BP3082-BP3080* kódují importér manganu a zdá se, že ani druhý transportér v operonu BP3078 pravděpodobně neimportuje mangan.

Dále jsme zkoumali vliv zvýšeného množství kobaltu v médiu na kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$. Kobalt patří mezi mikronutrienty a zdaleka není tak hojně využíván jako kofaktor v enzymech, jako další přechodné kovy diskutované v této práci. Svoji roli má především v enzymech využívající kobalamin (vit. B12). Vzácnější jsou mononukleární enzymy, ve kterých se na vazbě kovu podílí přímo postranní řetězce aminokyselinových zbytků a nikoliv korinový heterocyklus. Některé z nich shrnují Kobayashi a Shimizu v přehledovém článku z roku 1999, například methioninaminopeptidáza, nitrilhydratáza methylmalonyl-CoA-karboxytransferáza a další (Kobayashi a Shimizu, 1999). Na druhou stranu je kobalt ve vyšších koncentracích toxický. Může například nahrazovat jiné kovy, a to především železo, v aktivních místech a tím znemožnit jejich funkci. Bylo popsáno, že kobalt může nahradit, podobně jako zinek, železo v porfyriu a tím pádem zpomalit tvorbu funkčního hemu, nebo také kobalt může narušovat tvorbu Fe-S klastrů vytěsňováním železa. Především tedy postihuje elektron transferový systém dýchacího řetězce a tím pádem zhoršuje respiraci (Majtan *et al.*, 2010, Ranquet *et al.*, 2007). Import kobaltu do bakteriálních buněk zajišťují proteiny z rodiny NiCoT, vysokoafinní permeázy pro nikl, nebo kobalt (Komeda *et al.*, 1997, Wolfram a Bauerfeind, 2002), nebo ABC transportéry (Borths *et al.*, 2002, Cheng *et al.*, 2011). Naopak na detoxikaci buněk od kobaltu a niklu se podílí efluxní systém RcnA, který byl popsán u *E. coli* a jako zdroj energie pro transport využívá protonmotivní sílu (Rodrigue *et al.*, 2005). V rámci operonu, který je hlavním zájmem této práce, jsou kódovány jak ABC transportér (*BP3082-3080*), tak homolog RcnA *BP3078*.

Nejprve byly pozorovány růstové vlastnosti kmenů *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ v médiu obohaceném o vysokou koncentraci CoCl_2 , po vzoru experimentů s manganem. Zde se však objevil očekávaný fenotyp, kdy přítomnost kovu u kmene s deregulovanými a tím pádem konstitutivně exprimovanými oběma transportéry BP3082-BP3077 a BP3078 vykazoval zhoršení růstu oproti WT (viz obrázek 15). Abychom dokázali rozlišit, který ze dvou transportérů v operonu importuje kobalt, využili jsme několika delečních mutantů a testovali jsme jejich vlastnosti v přítomnosti toxické koncentraci CoCl_2 . Intoxikace

B. pertussis kobaltem doložená zhoršením růstu oproti kontrole byla pozorována v případě dvou mutantních kmenů, $\Delta BP3083$ s deregulovaným celým operonem a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$ s konstitutivně přepisovaným ABC transportérem BP3082-BP3080. Z toho vyplývá, že *B. pertussis* zřejmě využívá k importu kobaltu právě ABC transportér.

Dle homologie transportéru BP3078 s transportérem niklu nebo kobaltu jsme předpokládali, že po vyloučení kobaltu, jako transportovaného kovu, budou bakterie s deregulovaným represorem BP3083 reagovat rozdílně než WT na vysokou koncentraci niklu. Ten je využíván v bakteriích pro specializované enzymy související většinou s anaerobním metabolismem, jako alternativa častěji se vyskytujících kovů, převážně železa a manganu. Jde například o Ni-dependentní superoxiddismutázu (u mořských bakterií a některých streptomycét), NiFe hydrogenázu, Acetyl-CoA-syntázu (u některých metanogenních, sulfát-redukujících a acetogenních bakterií) a další, mimo to se po vazbě na regulátory podílí i na kontrole genové exprese, jako je tomu například u proteinu NikR u *E. coli* (Mulrooney a Hausinger, 2003). Prvním objeveným enzymem využívající nikl jako kofaktor byla ureáza, jejíž aktivitu vykazují mnohé patogeny, například některé kmeny *E. coli*, *Staphylococcus aureus* a *Helicobacter pylori* (Ha *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2019). Vzhledem k tomu, že je *B. pertussis* striktně aerobní a nevykazuje ureolytickou aktivitu (ačkoliv disponuje *ure* lokusem), tak je využití niklu v enzymech spíše nepravděpodobné, přesto jsme kvůli homologii genu *BP3078* s transportérem niklu testovali vliv tohoto kovu na vybrané kmeny *B. pertussis*. Stejně jako další kovy diskutované v této práci prokazuje nikl toxické účinky především prostřednictvím mismetalace proteinů využívajících kovové kofaktory (hlavně nahrazení železa nebo zinku), blokováním aktivních míst některých enzymů, nebo poškozením makromolekul při oxidativním stresu (Macomber a Hausinger, 2011). Tato hypotéza se však nepotvrdila a deregulace operonu neměla vliv na toxicitu niklu. Homologie s ABC transportérem zinku AztABC u *E. coli* (viz tabulka číslo 11) naznačovala možnou roli ABC transportéru BP3082-BP3080 v homeostáze zinku a proto jsme také testovali reakce kmenů WT a $\Delta BP3083$ na zvýšenou koncentraci tohoto kovu. Nicméně po přidání zinku do média nebyla pozorována změna v růstu kmene s deregulovaným operonem proti WT. Pro úplnost byla testována také reakce kmenů *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ na zvýšenou koncentraci mědi v médiu, zde byl u obou kultivovaných kmenů pozorován zvýšený růst v přítomnosti 500 μ M CuSO₄. Jakou výhodu poskytuje měď v médiu oběma kmenům nevíme, nicméně deregulace operonu *BP3082-BP3077* nemá na tento efekt vliv.

Je známo, že *B. pertussis* obsahuje dva geny pro represory z rodiny Fur. Jeden z nich je klasický Fur, který váže železo (*BP2507*), charakterizovaný v devadesátých letech a druhý

je námi zkoumaný *BP3083* (Beall a Sanden, 1995). Dlouho se předpokládalo, že je *BP2507* esenciální gen, protože se nedařilo vytvořit deleční kmen. Nicméně v minulém roce se nizozemskému týmu Jonge a Tommassen podařilo vytvořit podmínky, za kterých bylo možné vytvořit deleční mutanty, konkrétně využili k pěstování bakteriálních kultur tekuté Verwey médium standardizované pro *B. pertussis* v roce 1949 (Verwey *et al.*, 1949). Oproti standardnímu SS médiu neobsahuje tak vysokou koncentraci železa. Suplementace $0,01 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ byla dostatečná k růstu bakterií a zároveň nedocházelo k intoxikaci buněk železem v delečním kmenu postrádající zásadní regulátor homeostázy tohoto kovu (de Jonge a Tommassen, 2022). Vytvoření deleční mutanty $\Delta BP3083$ postrádající druhý protein z rodiny Fur bylo provedeno v naší laboratoři dle klasického postupu uvedeného v kapitole 3.2.3.3 a 3.2.3.4, bez nutnosti změny média. Gen *BP3083* tedy není pro *B. pertussis* esenciální a pravděpodobně nehraje roli v regulaci udržování hladiny železa v cytozolu, což naznačují i výsledky naší RT-qPCR analýzy, kdy nebyl pozorován žádný vliv přidaného železa na kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$. Na druhou stranu nulový vliv přidání železa na úroveň standardního SS média ($36 \mu\text{M}$) je v porovnání s prvním experimentem (graf číslo 11) překvapivý, neboť jsme předpokládali, že právě vysoká koncentrace železa ve standardním SS médiu přispívá k eliminaci *BP3081* mRNA. K tomuto efektu nedošlo, tudíž je absence *BP3081* transkriptu ve standardním SS stále záhadou.

Kromě železa byly k charakterizaci vlastností regulátoru BP3083 využity i další přechodné kovy. Konkrétně mangan, kobalt, zinek, měď a nikl. Tyto kovy byly přidány do média k indukci operonu *BP3082-BP3077* ve zvýšených koncentracích a byl sledován jejich vliv na kmeny *B. pertussis* WT a $\Delta BP3083$ prostřednictvím RT-qPCR. Kvůli podobným vlastnostem těchto prvků jsme ale narazili na problém, že všechny zmíněné kovy s výjimkou železa negativně ovlivňují expresi všech genů v operonu v přítomnosti regulátoru z rodiny Fur BP3083 (kmen *B. pertussis* WT). Nepodařilo se nám tak určit, jaký kov je pro tento regulátor vlastní. Nicméně vzhledem k našim výsledkům naznačujícím, že ABC transportér BP3082-BP3080 importuje kobalt by bylo logické, že je BP3083 senzor kobaltu a represí operonu chrání buňku před intoxikací kobaltem při jeho zvýšené koncentraci. Doposud však nebyl popsán žádný represor z rodiny Fur, který by vázal kobalt jako výhradní kov. V laboratorních podmínkách za využití médií, která nemají složení korespondující s prostředím, kterému je bakterie vystavována přirozeně je poměrně obtížné určit, který kov je skutečně vlastní pro daný protein a nejedná se jen o artefakt. Pro další výzkum týkající se regulátoru BP3083 proto navrhujeme využití metody EMSA (electrophoretic mobility shift assay). Tato metoda je používána pro studium interakce

proteinu a DNA, popřípadě RNA. Funguje na principu elektroforetického dělení v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu na základě velikosti a náboje molekul. Protein navázaný na DNA fragment putuje gelem pomaleji, než kontrolní DNA bez proteinu. Vystavení regulátoru BP3083 různým kovům a následná elektroforéza s odpovídající DNA by mohla napomoci k určení vlastního vázaného kovu. Jedná se o přístup *in vitro*, který může svojí nižší komplexitou odstínit artefakty pozorované při komplexní reakci organismu, kde nejsme schopni odstranit některé kovy na úkor životaschopnosti bakterií. Izde lze ale očekávat technické problémy vyplývající z podobných vazebných vlastností přechodných kovů a také skutečnosti, že proteiny z rodiny Fur vyžadují pro správné složení strukturní atomy zinku. Momentálně máme připravený expresní kmen *E. coli* BL21 Rosetta exprimující gen *BP3083* pod IPTG indukovaným fágovým T7 promotorem. Po optimalizaci izolace proteinu lze provést již zmíněnou metodu EMSA, která by mohla vést k bližšímu určení specifického kovu pro represor BP3083. Zároveň stejně jako u studia exportérů by bylo vhodné provést více RT-qPCR měření pro účely statistiky a určení signifikance jednotlivých změn v míře exprese.

Do budoucna by bylo vhodné hlouběji prozkoumat problematiku transportu kobaltu pro vybrané kmeny *B. pertussis*. Především provést experimenty ve větším počtu opakování pro provedení statistických výpočtů a dále také vzorky analyzovat metodou ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectrometry). Tato metoda dokáže na základě atomizace vzorku pomocí plazmy velice přesně (až na stovky ppm) měřit koncentraci prvků. Na základě měření změny hladiny kobaltu ve vzorku oproti kontrole lze stanovit, zdali a kolik kovu bylo importováno do buněk. Tato metoda byla již v naší laboratoři použita pro měření obsahu manganu a potvrzení funkce exportéru BP3410 (Čapek *et al.*, 2021).

Studium lokusu *BP3083-BP3077* je důležité pro porozumění komplexních procesů v *B. pertussis* interagující s THP-1 makrofágy. Především výzkum genů kódující transporeéry kovů *BP3082-BP3080* a *BP3078* dokáže napovědět, jaké mikronutrienty *B. pertussis* využívá pro vyrovnávání se s nepříznivými podmínkami, jakým je vystavena ve fagozomu imunitních buněk. Bylo by také vhodné zaměřit pozornost na gen *BP3077* kódující TonB receptor, který také hraje velice důležitou roli v transportu látek do bakteriální buňky. Další průzkum vlastností genů v lokusu diskutovaném v této práci může vést k lepšímu pochopení interakce mezi patogenem a hostitelem.

6 Souhrn

- Byly připraveny deleční mutanty pro celý zkoumaný lokus ($\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3077$), pro operon bez deletovaného regulátoru ($\Delta BP3082-BP3077$), pro ABC transportér ($\Delta BP3082-BP3080$), pro NiCo transportér ($\Delta BP3078$), pro regulátor z rodiny Fur ($\Delta BP3083$) a kombinace delecí transportérů a regulátoru ($\Delta BP3083 + \Delta BP3082-BP3080$ a $\Delta BP3083 + \Delta BP3078$).
- Byly pozorovány růstové vlastnosti vybraných kmenů *B. pertussis* v přítomnosti toxických koncentrací přechodných kovů, konkrétně manganu, kobaltu, zinku, niklu a mědi. Na základě růstového defektu u kmene s deregulovaným ABC transportérem ($\Delta BP3083 \Delta BP3078$) v médiu s výslednou koncentrací CoCl_2 $100\mu\text{M}$ předpokládáme, že geny *BP3082-BP3080* kódují ABC transportér pravděpodobně sloužící k importu kobaltu u *B. pertussis*.
- Pomocí RT-qPCR byl zkoumán vliv přechodných kovů na kmeny s regulovaným a deregulovaným operonem (WT a $\Delta BP3083$) za účelem objasnění konkrétního prvku vázaného represorem z rodiny Fur BP3083. U všech použitých kovů (mangan, kobalt, zinek, nikl a měď), kromě železa, byl pozorován efekt na míru exprese jednotlivých genů v operonu pro kmen *B. pertussis* WT. BP3083 není klasický Fur protein vázající železo, nicméně určení jeho vlastního kovu není na základě výsledků této práce možné.

Seznam použité literatury

1. B. M. Althouse, S. V. Scarpino, Asymptomatic transmission and the resurgence of *Bordetella pertussis*. *BMC Medicine* **13** (červ. 2015).
2. R. Amann *et al.*, Obligate intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 115–121 (led. 1997).
3. S. C. Andrews, A. K. Robinson, F. Rodriguez-Quinones, Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 215–237 (červ. 2003).
4. A. Anjem, S. Varghese, J. A. Imlay, Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **72**, 844–858 (květ. 2009).
5. R. Antoine, C. Locht, Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from Gram-positive organisms. *Molecular Microbiology* **6**, 1785–1799 (čvc 1992).
6. V. Bartsevich, H. Pakrasi, Molecular identification of an ABC transporter complex for manganese: analysis of a cyanobacterial mutant strain impaired in the photosynthetic oxygen evolution process. *The EMBO Journal* **14**, 1845–1853 (květ. 1995).
7. B. W. Beall, G. N. Sanden, Cloning and initial characterization of the *Bordetella pertussis* *fur* gene. *Current Microbiology* **30**, 223–226, ISSN: 1432-0991 (dub. 1995).
8. C. L. Beier *et al.*, The Genus *Caedibacter* Comprises Endosymbionts of *Paramecium* spp. Related to the *Rickettsiales* (*Alphaproteobacteria*) and to *Francisella tularensis* (*Gammaproteobacteria*). *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 6043–6050 (pros. 2002).
9. T. Belcher, V. Dubois, A. Rivera-Millot, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence* **12**, 2608–2632 (zář. 2021).
10. C. Belon, A.-B. Blanc-Potard, Intramacrophage Survival for Extracellular Bacterial Pathogens: MgtC As a Key Adaptive Factor. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **6** (květ. 2016).
11. W. F. J. Beyer, I. Fridovich, In vivo competition between iron and manganese for occupancy of the active site region of the manganese-superoxide dismutase of *Escherichia coli*. eng, *The Journal of biological chemistry* **266**, 303–8 (1 led. 1991).

12. M. A. Bone *et al.*, *Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114** (ún. 2017).
13. E. L. Borths, K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees, The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 16642–16647, ISSN: 1091-6490 (pros. 2002).
14. E. F. Bosma, M. H. Rau, L. A. van Gijtenbeek, S. Siedler, Regulation and distinct physiological roles of manganese in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **45**, ISSN: 1574-6976 (květ. 2021).
15. V. Bouchez *et al.*, First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vaccine* **27**, 6034–6041 (říj. 2009).
16. J. H. Cafiero, Y. A. Lamberti, K. Surmann, B. Vecerek, M. E. Rodriguez, A *Bordetella pertussis* MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLOS ONE* **13**, ed. J. Nigou, e0203204 (srp. 2018).
17. P. A. Cotter, J. F. Miller, BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infection and Immunity* **62**, 3381–3390 (srp. 1994).
18. P. A. Cotter, J. F. Miller, A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Molecular Microbiology* **24**, 671–685 (květ. 1997).
19. L. Coutte *et al.*, The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Scientific Reports* **6** (zář. 2016).
20. J. G. Crawford, C. W. Fishel, Growth of *Bordetella Pertussis* in Tissue Culture. *Journal of Bacteriology* **77**, 465–474 (dub. 1959).
21. J. Čapek, I. Procházková, T. Matoušek, D. Hot, B. Večerek, A Unique Reverse Adaptation Mechanism Assists *Bordetella pertussis* in Resistance to Both Scarcity and Toxicity of Manganese. *mBio* **12**, ed. J. Parkhill (říj. 2021).
22. J. Čapek, B. Večerek, Why is manganese so valuable to bacterial pathogens? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **13**, ISSN: 2235-2988 (ún. 2023).

23. E. F. de Jonge, J. Tommassen, Conditional growth defect of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* ferric uptake regulator (fur) mutants. *FEMS Microbiology Letters* **369**, ISSN: 1574-6968 (2022).
24. D. A. Diavatopoulos *et al.*, *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathogens* **1**, ed. S. Hultgren, e45 (pros. 2005).
25. K. H. Ebrahimi, P.-L. Hagedoorn, W. R. Hagen, Unity in the Biochemistry of the Iron-Storage Proteins Ferritin and Bacterioferritin. *Chemical Reviews* **115**, 295–326 (lis. 2014).
26. M. R. Farman *et al.*, Avirulent phenotype promotes *Bordetella pertussis* adaptation to the intramacrophage environment. *Emerging Microbes & Infections* **12** (led. 2023).
27. N. Ferry, *Bacillus Bronchisepticus* (Bronchicanis): The Cause of Distemper in Dogs and a Similar Disease in other Animals. *The Veterinary Journal (1900)* **68**, 376–391 (čvc 1912).
28. B. S. Fields, The molecular ecology of legionellae. *Trends in Microbiology* **4**, 286–290 (čvc 1996).
29. M. F. Fillat, The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **546**, 41–52 (břez. 2014).
30. R. L. Friedman, K. Nordensson, L. Wilson, E. T. Akporiaye, D. E. Yocum, Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and Immunity* **60**, 4578–4585 (lis. 1992).
31. T. R. Fritsche *et al.*, In Situ Detection of Novel Bacterial Endosymbionts of *Acanthamoeba* spp. Phylogenetically Related to Members of the Order *Rickettsiales*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 206–212 (led. 1999).
32. N. K. Fry *et al.*, *Bordetella petrii* Clinical Isolate. *Emerging Infectious Diseases* **11**, 1131–1133 (čvc 2005).
33. J. Gorgojo, E. T. Harvill, M. E. Rodriguez, *Bordetella parapertussis* Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes. *Infection and Immunity* **82**, ed. R. P. Morrison, 5175–5184 (pros. 2014).

34. J. Gorgojo, Y. Lamberti, H. Valdez, E. T. Harvill, M. E. Rodriguez, Bordetella parapertussis Survives the Innate Interaction with Human Neutrophils by Impairing Bactericidal Trafficking inside the Cell through a Lipid Raft-Dependent Mechanism Mediated by the Lipopolysaccharide O Antigen. *Infection and Immunity* **80**, ed. R. P. Morrison, 4309–4316 (pros. 2012).
35. C. A. Guzman, M. Rohde, M. Bock, K. N. Timmis, Invasion and intracellular survival of Bordetella bronchiseptica in mouse dendritic cells. *Infection and Immunity* **62**, 5528–5537 (pros. 1994).
36. N.-C. Ha *et al.*, *Nature Structural Biology* **8**, 505–509, ISSN: 1072-8368 (červ. 2001).
37. A. Hartlova, L. Cervený, M. Hubálek, Z. Krocová, J. Stulík, Membrane rafts: a potential gateway for bacterial entry into host cells. *Microbiology and Immunology* **54**, 237–245 (pros. 2009).
38. J. A. Hayes *et al.*, Hfq modulates global protein pattern and stress response in Bordetella pertussis. *Journal of Proteomics* **211**, 103559 (led. 2020).
39. S. M. Hellwig, W. L. Hazenbos, J. G. Winkel, F. R. Mooi, Evidence for an intracellular niche for Bordetella pertussis in broncho-alveolar lavage cells of mice. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **26**, 203–207 (pros. 1999).
40. P. I. Higgs, P. S. Myers, K. Postle, Interactions in the TonB-Dependent Energy Transduction Complex: ExbB and ExbD Form Homomultimers. *Journal of Bacteriology* **180**, 6031–6038 (lis. 1998).
41. Y. Hiramatsu, T. Nishida, D. K. Nugraha, F. Sugihara, Y. Horiguchi, Melanin Produced by Bordetella parapertussis Confers a Survival Advantage to the Bacterium during Host Infection. *mSphere* **6**, ed. S. E. F. D’Orazio (říj. 2021).
42. Q. Chen, V. Ng, J. M. Warfel, T. J. Merkel, S. Stibitz, Activation of Bvg-Repressed Genes in Bordetella pertussis by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK. *Journal of Bacteriology* **199**, ed. A. M. Stock (lis. 2017).
43. J. Cheng, B. Poduska, R. A. Morton, T. M. Finan, An ABC-Type Cobalt Transport System Is Essential for Growth of Sinorhizobium meliloti at Trace Metal Concentrations. *Journal of Bacteriology* **193**, 4405–4416, ISSN: 1098-5530 (zář. 2011).
44. C. S. Inatsuka *et al.*, Pertactin Is Required for Bordetella Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infection and Immunity* **78**, 2901–2909 (čvc 2010).

45. H. Irving, R. J. P. Williams, 637. The stability of transition-metal complexes. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 3192, ISSN: 0368-1769 (1953).
46. N. Jabado *et al.*, Natural Resistance to Intracellular Infections. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1237–1248 (říj. 2000).
47. N. S. Jakubovics, H. F. Jenkinson, Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. *Microbiology* **147**, 1709–1718 (čvc 2001).
48. H. Jungnitz, N. P. West, M. J. Walker, G. S. Chhatwal, C. A. Guzman, A Second Two-Component Regulatory System of *Bordetella bronchiseptica* Required for Bacterial Resistance to Oxidative Stress, Production of Acid Phosphatase, and In Vivo Persistence. *Infection and Immunity* **66**, ed. J. R. McGhee, 4640–4650 (říj. 1998).
49. T. Kasuga, Y. Nakase, K. Ukishima, K. Takatsu, Studies on Haemophilus pertussis. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. eng, *The Kitasato archives of experimental medicine* **27**, 57–62 (3 zář. 1954).
50. D. G. Kehres, A. Janakiraman, J. M. Slauch, M. E. Maguire, Regulation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *mntH* Transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *Journal of Bacteriology* **184**, 3151–3158 (červ. 2002).
51. D. G. Kehres, A. Janakiraman, J. M. Slauch, M. E. Maguire, SitABCD Is the Alkaline Mn²⁺ Transporter of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **184**, 3159–3166 (červ. 2002).
52. M. Khademian, J. A. Imlay, How Microbes Evolved to Tolerate Oxygen. *Trends in Microbiology* **29**, 428–440, ISSN: 0966-842X (květ. 2021).
53. N. Khelef, A. Zychlinsky, N. Guiso, Bordetella pertussis induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infection and Immunity* **61**, 4064–4071 (říj. 1993).
54. B. H. Kim, *Bacterial Physiology and Metabolism* (Cambridge University Press, 2008), ISBN: 9780511389146.
55. A. J. King *et al.*, Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. *Microbiology* **147**, 2885–2895 (lis. 2001).
56. M. Kobayashi, S. Shimizu, Cobalt proteins. *European Journal of Biochemistry* **261**, 1–9, ISSN: 1432-1033 (břez. 1999).

57. H. Komeda, M. Kobayashi, S. Shimizu, A novel transporter involved in cobaltuptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 36–41, ISSN: 1091-6490 (led. 1997).
58. W. Köster, ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Research in Microbiology* **152**, 291–301 (dub. 2001).
59. Y. Lamberti, J. Gorgojo, C. Massillo, M. E. Rodriguez, *Bordetella pertussis* entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathogens and Disease* **69**, 194–204 (srp. 2013).
60. Y. Lamberti, J. A. Hayes, M. L. P. Vidakovics, M. E. Rodriguez, Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by *Bordetella pertussis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **56**, 143–150 (čvc 2009).
61. Y. Lamberti, M. L. P. Vidakovics, L.-W. van der Pol, M. E. Rodriguez, Cholesterol-rich domains are involved in *Bordetella pertussis* phagocytosis and intracellular survival in neutrophils. *Microbial Pathogenesis* **44**, 501–511 (červ. 2008).
62. Y. A. Lamberti, J. A. Hayes, M. L. P. Vidakovics, E. T. Harvill, M. E. Rodriguez, Intracellular Trafficking of *Bordetella pertussis* in Human Macrophages. *Infection and Immunity* **78**, 907–913 (břez. 2010).
63. E.-J. Lee, M. H. Pontes, E. A. Groisman, A Bacterial Virulence Protein Promotes Pathogenicity by Inhibiting the Bacterium's Own F1Fo ATP Synthase. *Cell* **154**, 146–156 (čvc 2013).
64. C. Loch, R. Antoine, F. Jacob-Dubuisson, *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Current Opinion in Microbiology* **4**, 82–89 (ún. 2001).
65. L. Ma, A. Caulfield, K. K. Dewan, E. T. Harvill, Pertactin-Deficient *Bordetella pertussis*, Vaccine-Driven Evolution, and Reemergence of Pertussis. *Emerging Infectious Diseases* **27**, 1561–1566 (červ. 2021).
66. L. Macomber, R. P. Hausinger, Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* **3**, 1153, ISSN: 1756-591X (2011).
67. T. Majtan, F. E. Frerman, J. P. Kraus, Effect of cobalt on *Escherichia coli* metabolism and metalloporphyrin formation. *BioMetals* **24**, 335–347 (pros. 2010).
68. H. Makui *et al.*, Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Molecular Microbiology* **35**, 1065–1078 (břez. 2000).

69. E. Massé, S. Gottesman, A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 4620–4625 (břez. 2002).
70. S. Mattoo, J. D. Cherry, Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews* **18**, 326–382 (dub. 2005).
71. A. R. Melton, A. A. Weiss, Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* **171**, 6206–6212 (lis. 1989).
72. S. B. Mulrooney, R. P. Hausinger, Nickel uptake and utilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 239–261, ISSN: 1574-6976 (červ. 2003).
73. C. D. Paddock *et al.*, Pathology and Pathogenesis of Fatal *Bordetella pertussis* Infection in Infants. *Clinical Infectious Diseases* **47**, 328–338 (srp. 2008).
74. K. Papenfort, J. Vogel, Regulatory RNA in Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe* **8**, 116–127 (čvc 2010).
75. J. Parkhill *et al.*, Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**, 523–527 (říj. 2001).
76. J. Parkhill *et al.*, Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* **35**, 32–40 (srp. 2003).
77. D. Petráčková *et al.*, Transcriptional profiling of human macrophages during infection with *Bordetella pertussis*. *RNA Biology* **17**, 731–742 (ún. 2020).
78. E. Pohl *et al.*, Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Molecular Microbiology* **47**, 903–915 (ún. 2003).
79. F. Porte, A. Naroeni, S. Ouahrani-Bettache, J.-P. Liautard, Role of the *Brucella suis* Lipopolysaccharide O Antigen in Phagosomal Genesis and in Inhibition of Phagosome-Lysosome Fusion in Murine Macrophages. *Infection and Immunity* **71**, 1481–1490 (břez. 2003).
80. K. Postle, TonB protein and energy transduction between membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **25**, 591–601 (pros. 1993).

81. A. Preston *et al.*, Genetic Basis for Lipopolysaccharide O-Antigen Biosynthesis in *Bordetellae*. *Infection and Immunity* **67**, ed. R. N. Moore, 3763–3767 (srp. 1999).
82. C. Ranquet, S. Ollagnier-de-Choudens, L. Loiseau, F. Barras, M. Fontecave, Cobalt Stress in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 30442–30451 (říj. 2007).
83. A. Rodrigue, G. Effantin, M.-A. Mandrand-Berthelot, Identification of *rcnA* (*yohM*), a Nickel and Cobalt Resistance Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **187**, 2912–2916, ISSN: 1098-5530 (dub. 2005).
84. B. Schneider, R. Gross, A. Haas, Phagosome Acidification Has Opposite Effects on Intracellular Survival of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica*. *Infection and Immunity* **68**, ed. D. L. Burns, 7039–7048 (pros. 2000).
85. I. H. Soumana, B. Linz, E. T. Harvill, Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Frontiers in Microbiology* **8** (led. 2017).
86. T. H. Stenson, A. G. Allen, J. A. al-Meer, D. Maskell, M. S. Peppler, *Bordetella pertussis* *risA*, but Not *risS*, Is Required for Maximal Expression of Bvg-Repressed Genes. *Infection and Immunity* **73**, 5995–6004 (zář. 2005).
87. S. Stibitz, Use of conditionally counterselectable suicide vectors for allelic exchange. *Bacterial Pathogenesis Part A: Identification and Regulation of Virulence Factors*, 458–465, ISSN: 0076-6879 (1994).
88. A. Stintzi, C. Barnes, J. Xu, K. N. Raymond, Microbial iron transport via a siderophore shuttle: A membrane ion transport paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 10691–10696 (zář. 2000).
89. D. L. Taylor-Mulneix *et al.*, *Bordetella bronchiseptica* exploits the complex life cycle of *Dictyostelium discoideum* as an amplifying transmission vector. *PLOS Biology* **15**, ed. M. Waldor, e2000420 (dub. 2017).
90. N. Tazato *et al.*, Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **65**, 4830–4838 (pros. 2015).
91. W. F. Verwey, E. H. Thiele, D. N. Sage, L. F. Schuchardt, A Simplified Liquid Culture Medium For The Growth Of *Hemophilus Pertussis*. *Journal of Bacteriology* **58**, 127–134, ISSN: 1098-5530 (srp. 1949).

92. F. Wang *et al.*, Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere* **67**, 896–902 (břez. 2007).
93. J. M. Warfel, L. I. Zimmerman, T. J. Merkel, Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 787–792 (lis. 2013).
94. Y. I. Wolf, E. V. Koonin, Genome reduction as the dominant mode of evolution. *BioEssays* **35**, 829–837 (červ. 2013).
95. L. Wolfram, P. Bauerfeind, Conserved Low-Affinity Nickel-Binding Amino Acids Are Essential for the Function of the Nickel Permease NixA of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* **184**, 1438–1443, ISSN: 1098-5530 (břez. 2002).
96. B. F. Woolfrey, J. A. Moody, Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clinical Microbiology Reviews* **4**, 243–255 (čvc 1991).
97. X. Zhang, M. E. Rodriguez, E. T. Harvill, O Antigen Allows *B. parapertussis* to Evade *B. pertussis* Vaccine-Induced Immunity by Blocking Binding and Functions of Cross-Reactive Antibodies. *PLoS ONE* **4**, ed. U. A. Maus, e6989 (zář. 2009).
98. C. Zhou *et al.*, Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. *PLOS Pathogens* **15**, ed. A. Peschel, e1007538, ISSN: 1553-7374 (led. 2019).