

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie
Studijní obor: Biochemie



David Jurnečka

Strukturní analýza filamentózního hemaglutininu (FhaB) z *Bordetella pertussis*

Structural analysis of filamentous hemagglutinin (FhaB) from *Bordetella pertussis*

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Školitel: Mgr. Ladislav Bumba, Ph.D.

Praha 2015

Prohlášení:

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

V Praze dne.....Podpis.....

Poděkování :

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za cenné rady, profesionální přístup a trpělivost při vedení mé diplomové práce. Dále prof. Ing. Peteru Šebovi, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR a také všem jejím členům za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Rovněž patří můj dík rodině za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt :

Filamentózní hemagglutinin (FHA) je adhesivní proteinová molekula, která je uvolňována gram-negativní bakterií *Bordetella pertussis*, způsobující infekční onemocnění zvané černý kašel (pertuse). C-koncový segment FHA hraje klíčovou roli v interakci mezi bakterií a hostitelskými buňkami, nicméně jeho struktura zůstává zatím neznámá. V této práci byla identifikována C-koncová aminokyselina FHA jako alanin v pozici 2304, zatímco C-koncová aminokyselina degradačního produktu FHA (FHA*) byla v pozici 2228. Spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD) a nukleární magnetická resonance (NMR) ukázaly, že C-koncový fragment FHA (FHA 1995-2228) má alfa-šroubovicový charakter a netvoří definovanou terciární strukturu. Navíc, potlačení transkripce malé regulační RNA párující se k5' konci *fhaB* transkriptu vede k dvojnásobnému zvýšení produkce FHA. Ze získaných dat vyplývá, že C-koncový segment FHA má vlastnosti nestrukturovaných proteinů a produkce FHA je negativně regulována pomocí malé RNA.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, filamentózní hemagglutinin, malá RNA

Abstract :

Filamentous hemagglutinin (FHA) is adhesive protein molecule that is secreted by Gram-negative bacterium *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough (pertussis). The C-terminal segment of FHA plays a crucial role in host-pathogen interaction, however, the structural features are still unknown. Here, we identified the C-terminal residue of FHA and processed form of FHA (FHA*) as alanine residues in position 2304 and 2228, respectively. Circular dichroism (CD) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy demonstrated that the C-terminal segment of FHA(FHA 1995-2228) is characterized by alpha-helical contribution without any compact protein fold. Moreover, suppression of transcription of small regulatory RNA pairing to the 5'-end of *fhaB* transcript resulted in two-fold increase of FHA production. These data suggested that the C-terminal segment of FHA appear to be an unstructured protein and FHA secretion is negatively regulated by small regulatory RNA.

(In Czech)

Keywords: *Bordetella pertussis*, filamentous hemagglutinin, small RNA

Osnova:

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Černý kašel	10
2.1. Diagnostika černého kašle.....	11
2.2. Vakcinace proti černému kašli.....	11
3. <i>Bordetella pertussis</i>	11
3.1. Faktory virulence.....	13
3.2. BvgAS systém.....	14
3.3. Pertusový toxin.....	15
3.4. Adenylátcyklázový toxin.....	15
3.5. Dermonekrotický toxin.....	16
3.6. Cytotracheální toxin.....	17
3.7. Lipooligosacharid <i>B.pertussis</i>	17
3.8. Pertaktin.....	18
3.9. Fimbrie.....	18
3.10. Filamentózní hemaglutinin.....	18
3.11. Bakteriální regulační RNA.....	24
3. Cíl práce	25
4. Materiál	26
4.1. Laboratorní vybavení.....	26
4.2. Chemikálie.....	26
4.3. Roztoky.....	28
4.4. Enzymy.....	32
4.5. Kultivační média.....	32
4.6. Bakteriální kmeny.....	34
4.7. Plasmidy.....	34
5. Metody	35
5.1. Transformace bakterií.....	35
5.2. Příprava agaru pro kultivaci bakterií.....	35
5.3. Izolace plasmidové DNA.....	35

5.4. Minipreparace plasmidové DNA.....	36
5.5. Kultivace bakterií v tekutém médiu.....	37
5.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	37
5.7. Štěpení dsDNA.....	41
5.8. Ligace dsDNA.....	41
5.9. Elektroforéza na agarosovém gelu.....	42
5.10. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu.....	43
5.11. Izolace fragmentů DNA z gelu.....	44
5.12. Specifická imunodetekce proteinu na membráně.....	44
5.13. Expres a purifikace rekombinantního proteinu.....	45
5.14. Purifikace filamentózního hemaglutininu z <i>B.pertussis</i>	46
5.15. Alelická výměna na chromosomu <i>B.pertussis</i>	47
5.16. Štěpení proteinu TEV proteásou.....	49
5.17. Purifikace RNA.....	50
5.18. Specifická detekce RNA na membráně.....	51
5.19. Gelová chromatografie.....	52
5.20. Kvantifikace signálu.....	52
6. Výsledky.....	53
6.1. Identifikace C-koncového segmentu filamentního hemaglutininu (FHA) z <i>Bordetella pertussis</i>	53
6.2. Strukturní charakterizace C-koncového segmentu FHA z <i>B.pertussis</i>	55
6.3. Strukturní charakterizace rekombinantního C-koncového segmentu FHA z <i>E.coli</i>	61
6.4. Post-transkripční regulace exprese a produkce FHA.....	68
7. Diskuze.....	73
8. Závěr.....	78
9. Literární zdroje.....	79
9.1. Přehled použitých obrázků.....	87

Seznam zkratek

AA	aminokyselina
ACT	adenylát cyklázový toxin
APS	peroxodisíran amonný
APV	nebuněčná pertusová vakcína (z angl. acellularpertussisvaccine)
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
BG	Bordet-Gengou
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CPV	celobuněčná pertusová vakcína (z angl. whole cell pertussisvaccine)
DNT	dermonekrotický toxin
DEPC	diethylpyrokarbonát
GTP	guanosintrifosfat
DNA	kyselina deoxyribonukleová
dNTP	deoxyribonuklesidtrifosfát
g	gravitační zrychlení
gDNA	genomová DNA
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FHA	filamentózní hemaglutinin
IPTG	isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid
IL	Interleukin

LB	Luria-Bertani (medium)
mRNA	mediátorová RNA (z angl. messenger RNA)
kDa	kiloDalton
OD	optická densita
PBS	fosfátový pufr s 0,15 M NaCl (z angl. PhosphateBufferedSaline)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl.polymerasechainreaction)
pDNA	plasmidová DNA
PT	pertusový toxin
RGD	tripeptid aminokyselin arginin, glycin, aspartát
RTX	repeats in toxin – opakování v toxinu
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS)
RNA	kyselina ribonukleová
sRNA	malá RNA (z angl. small RNA)
TBE	pufr – Tris/Kyselina boritá/EDTA
TEMED	tetramethylethylendiamin
TCT	tracheální cytotoxin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Úvod

Černý kašel (pertuse) je vysoce infekční onemocnění dýchacích cest, které způsobuje gram-negativní bakterie *Bordetella pertusis* (BP). Každým rokem má okolo 200 tisíc obětí a to především v Africe. Přesto, že mortalita tohoto onemocnění významně klesla po zavedení vakcinace, vrací se pertuse zpět i do vyspělých zemí. Mezi roky 2010 a 2012 byly hlášeny epidemie v Austrálii, USA, Velké Británii, Nizozemí a v České republice se za poslední 2 roky počet případů zdvojnásobil. Tento nárůst je pozorován především u adolescentů, u nichž se nemoc většinou projevuje mírněji, ale stávají se tak jejím rezervoárem rozšiřujícím černá kašel zejména na rodinné příslušníky. Největší riziko pak představuje pro novorozence s nedokončeným očkováním, u kterých má onemocnění velmi vážný průběh. Studium BP se v posledních letech dostává do popředí a detailní pochopení jejích mechanismů přispívá k vývoji účinné vakcinace a rozličných terapeutických prostředků.

2. Černý kašel

Černý kašel je akutní onemocnění dýchacích cest vyvolané bakterií *Bordetella pertussis*. Je vysoce infekční a po kontaktu s nakaženým člověkem onemocní 80 až 90% vnímavých jedinců [1]. K přenosu dochází vzduchem, především pomocí kapének nebo kontaktem s čerstvě infikovanými předměty [2]. Inkubační doba se pohybuje mezi 7 – 21 dny. Po kolonizaci řasinkového plicního epitelu bakterií se pertuse projevuje v několika fázích. Katarální fáze trvá 1-2 týdny. Infikovaní mají mírně zvýšenou teplotu, trpí nechutenstvím a občasnými záchvaty suchého kašle. V některých případech se první fáze pertuse u pacientů vůbec neprojevuje. Paroxysmální stádium může trvat až několik měsíců v závislosti na věku a celkovém zdraví pacienta. Projevuje se stupňujícími se záchvaty dráždivého kašle, kdy může docházet až k zástavám dechu a hypoxii. Velmi časté jsou poruchy spánku, překrvení spojivek, mírná oteklost obličeje, nauzea a zvracení. Celkový průběh nemoci vede k silné dehydratace a vyčerpání. Doba rekonvalescence se většinou pohybuje v řádu několika týdnů a může příležitostně docházet k záchvatům kašle u následných virových infekcí a při větší fyzické zátěži. Léčba pomocí antibiotik (chloramfenikol, erytromycin, ampicilin) je účinná pouze v katarální fázi onemocnění. V pozdějších stádiích se antibiotika používají z epidemiologických důvodů k zamezení

šíření infekce. Větší ztráty tekutin způsobené zvracením bývají nahrazeny umělou výživou podanou do žíly. Při těžším průběhu je aplikována kyslíková léčba případně podány tlumící léky. U adolescentů a dospělých dochází k závažnějším komplikacím jen výjimečně, a proto mají tendenci pertuse zaměňovat s nachlazením nebo zánětem průdušek. Infikovaní mohou následně nevědomě šířit nemoc mezi nejbližšími osobami. Největším rizikem jsou pro novorozence s nedokončeným očkováním, u kterých má onemocnění velmi vážný průběh a může být i letální [3]. Až 70% případů černého kašle u batolat a novorozenců bylo způsobeno kontaktem s nejbližším rodinným příslušníkem [4].

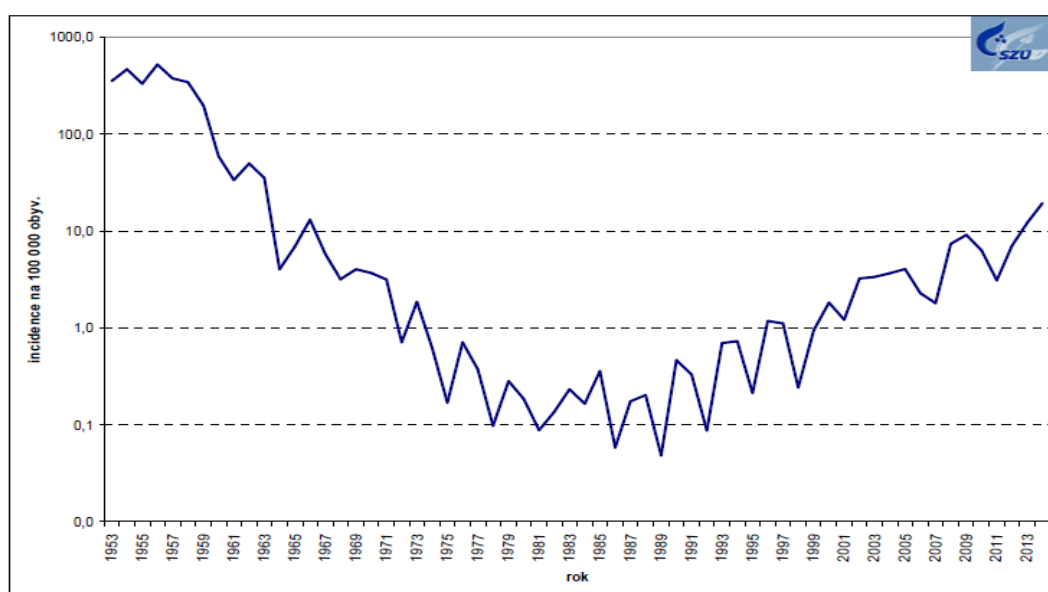
2.1. Diagnostika černého kašle

Černý kašel je diagnostikován na základě již dříve zmíněných symptomů v kombinaci s laboratorními testy. Nejčastěji se používá výtěr ze zadní stěny nosohltanu a následný kultivační nebo serologický test, případně polymerázová řetězová reakce (PCR). Kultivační test trvá 24-78 hodin a je velmi specifický. Výsledek ovšem záleží na kvalitě odběru vzorku a laboratoř musí použít speciální médium. U diagnostiky pomocí PCR se analytická citlivost, přesnost a kontrola kvality mezi různými laboratořemi významně liší. Hlavním problémem je rozlišení jednotlivých kmenů rodu *Bordetella*.

2.2. Vakcinace proti černému kašli

Vakcinace představuje doposud nejspolehlivější způsob ochrany proti černému kašli. Současné vakcíny poskytují ochranu po dobu 3-12 let a ani prodělání nemoci nezajistí celoživotní imunitu. Pro přetrvávající protekci je tak nutné pravidelné přeočkování. V České republice se začalo plošně očkovat v roce 1958 pomocí celobuněčné pertusové vakcíny (CPV). Využívání celých inaktivovaných buněk *B.pertussis* se velmi osvědčilo v prevenci onemocnění a snížení počtu infikovaných (Obr. 1). Vakcína ovšem může vykazovat velmi vážné vedlejší účinky. U pacientů je schopna vyvolat vysoké horečky, zvracení, apatii a výrazné zarudnutí a bolest v oblasti vpichu. Vzácně způsobuje také kolapsy, silné křeče a u dětí neustálý neutišitelný křik[5]. I přes zmíněné obtíže je CPV stále nejrozšířenější ochranou proti černému kašli. Od roku 2002 se ve vyspělých zemích začala využívat nebuněčná pertusová vakcína (APV) jako součást povinného očkování novorozenců hexavakcínou. APV se skládá z jednotlivých antigenů BP, které zajišťují

vyvolání specifické imunitní odpovědi. Mezi tyto antigeny patří zejména pertusový toxin (PTX), filamentózní hemagglutinin (FHA), pertaktin (PRN) a fimbrie (Fim). Ačkoliv je APV prakticky bez vedlejších účinků, od jejího zavedení se v daných zemích dramaticky zvedl počet diagnostikovaných případů černého kašle. Velkým problémem se pertuse stává v Severní a Jižní Americe, Austrálii i západní Evropě [6][7][8][9]. V České republice výrazně roste počet případů od roku 2001 (Obr. 2.1). Tento nárůst incidence můžeme vysvětlit několika způsoby. Velmi důležitým faktorem je rychlý úbytek protilátek po aplikaci APV a nedostatečná stimulace Th1 imunitní odpovědi [10][11][12][13]. U cirkulujících kmenů *B.pertussis* došlo během posledních let pod tlakem vakcinace k mnoha genetickým změnám, které zvyšují jejich virulenci [14]. Přes 85 % kmenů BP izolovaných v USA od roku 2011 přestalo produkovat jednu z klíčových složek APV, pertaktin [15]. Výskyt PRN negativních kmenů byl s nižší frekvencí pozorován také ve Francii a Itálii [16][17]. Je velmi nepravděpodobné, že by se země užívající APV vrátily zpět ke stávající CPV. Odpovědí na vnikající epidemie pertuse by tak mohlo být rozšíření nebuněčné vakcíny o další elementy BP nebo dramatické snížení reaktogenity celobuněčné vakcíny. V České republice se provádí povinné očkování hexavakcínou, která poskytuje ochranu proti tetanu, záškrtu, černému kašli, invazivním onemocněním vyvolaným bakterií *Haemophilus influenzae* typu B, proti virové hepatitidě typu B a přenosné dětské obrně. Aplikuje se ve čtyřech dávkách ve 2,3,4 a 10. měsíci po narození dítěte. V 5. a 10. roce se provádí přeočkování proti záškrtu, tetanu a pertusi.



Obr.2.1. Hlášená nemocnost pertusí v České republice 1953-2014,Převzato z [1]

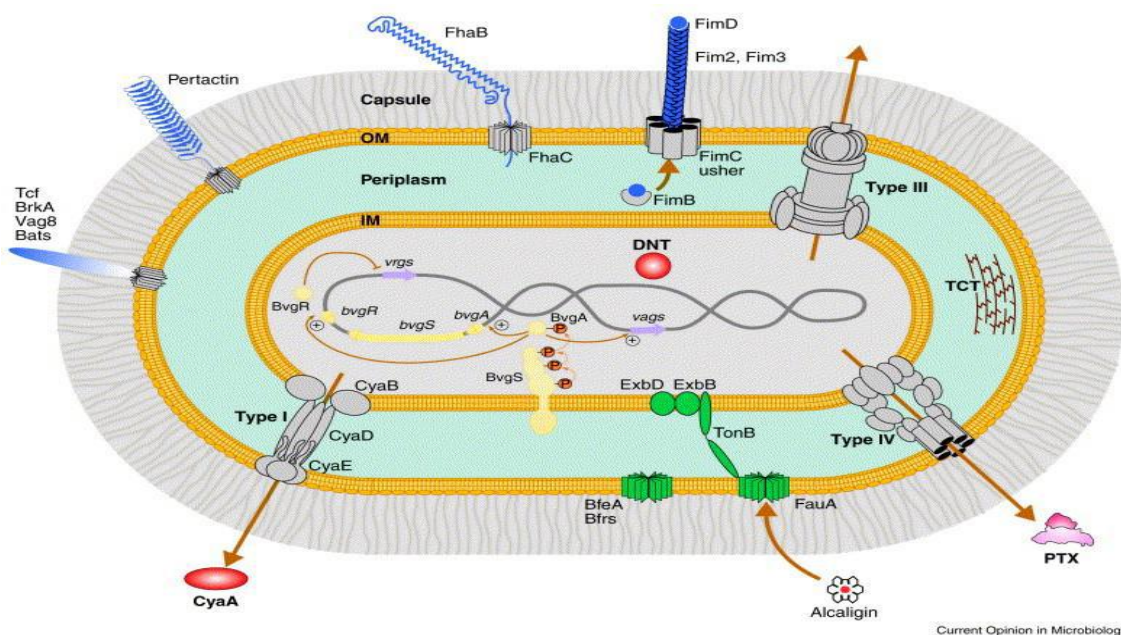
3. *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je gram-negativní, ovoidní, krátká tyčinka, kterou poprvé izolovali roku 1906 Jules Bordet a Octave Gengou jako potencionálního původce černého kašle [18]. Jedná se o výhradně lidský patogen. Snadno se přenáší z člověka na člověka pomocí kapének, ale je velmi citlivá na zevní prostředí. *B.pertussis* je striktně aerobní mikroorganismus, který se v laboratorních podmínkách pěstuje na speciálním Bordet-Gengově médiu (bramborový extrakt, beraní krve, glycerin a penicilin G). Kultivace trvá 36-72 hodin, kolonie jsou perleťově lesklé a virulentní kmeny vykazují na krevním agaru hemolýzu. *Bordetella* se během infekce nedostává do krevního řečiště. Kolonizuje slizniční povrch trachey a bronchů, kde blokuje funkci řasinek. Inhibice mukociliárního transportu vyvolává dráždivý kašel a uvolňování toxinů způsobuje katarální zánět a lymfocytózu.

Rod *Bordetella* má ještě několik méně známých zástupců sdílejících podobnou morfologii. *Bordetella parapertussis* způsobuje onemocnění velmi podobné černému kašli, má však lehčí průběh bez lymfocytózy [19]. *Bordetella bronchiseptica* kolonizuje dýchací trakt malých savců a na člověka se přenáší jen ve velmi výjimečných případech [20]. Dalšími dvěma zástupci jsou *B.avium* a *B.hinzii*. Infikují dýchací soustavu drůbeže a přenos na člověka je velmi ojedinelý [21][22].

3.1.Faktory virulence

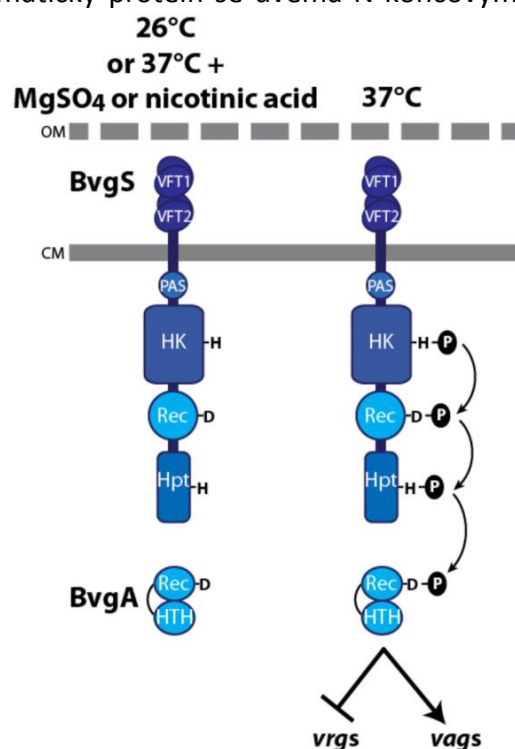
Bordetella pertussis disponuje velkým množstvím faktorů virulence. Mezi toxiny patří pertusový toxin (PTX), adenylát cyklázový toxin (CyaA), cytotracheální toxin (TCT) a dermonekrotický toxin (DNT). Mezi adhesiny patří filamentózní hemagglutinin (FHA), pertaktin (PRN) a fimbrie (Fim) (Obr. 3.1). Produkce faktorů virulence je řízena BvgAS systémem.



Obr. 3.1. Schematický přehled faktorů virulence u *B. pertussis*. Převzato z [2]

3.2. BvgAS systém

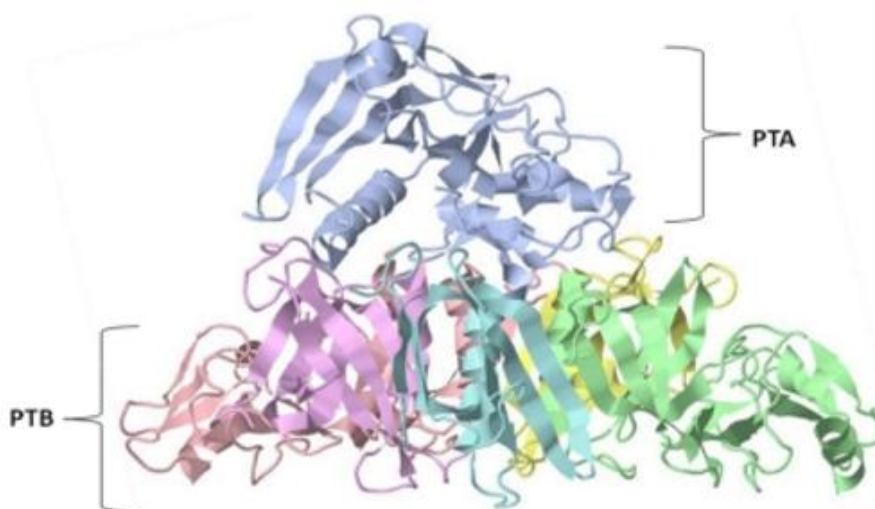
Exprese téměř všech faktorů virulence (vyjma TCT) je pozitivně regulována dvou komponentovým systémem BvgAS. Bvg aktivované proteiny jsou spojovány s virulencí a úpravou hostitelské imunity a jsou klíčovými faktory během infekce *B. pertussis* [23]. BvgA je regulační protein s N-koncovou doménou (Rec) pro příjem signálu a C-koncovou DNA-vazebnou doménou (HTH) [24]. BvgS je periplasmatický protein se dvěma N-koncovými doménami (VFT1,2) sloužící jako senzorová kináza [25]. Při růstu ve standardním médiu při 37°C je BvgAS systém aktivní a dochází k fosforylaci histidinu v cytoplazmatické HK doméně BvgS proteinu. Na konci fosforylační kaskády se nachází regulační doména proteinu BvgA, který následně dimerizuje, váže DNA a ovlivňuje transkripci faktorů virulence [26]. Signál pro BvgS protein je inhibován při teplotě okolo 26°C, v přítomnosti sulfátu nebo kyseliny nikotinové (Obr 3.2).



Obr. 3.2. Inhibice a aktivace BvgAS regulační kaskády. Převzato z [3]

3.3. Pertusový toxin

Pertusový toxin (PTX) je proteinový oligomer o molekulové hmotnosti 105 kDa. Řadí se do rodiny AB₅ exotoxinů společně s Shiga a Cholera toxiny. Skládá se z katalytické A podjednotky (PTA) a z pěti membránových vazebných podjednotek (PTB) (Obr. 3.3). Pertusový toxin je schopen vázat prakticky jakýkoliv glykoprotein obsahující sialovou kyselinu [27] a má tak velké množství potencionálních receptorů na eukaryotických buňkách [28]. Toxin vniká do buňky pomocí receptorem zprostředkované endocytózy a prochází retrográdním transportem do golgiho aparátu a následně do endoplasmatického retikula. A podjednotka toxinu se následně přesouvá do cytoplazmy, kde katalyzuje ADP-ribosilaci alfa podjednotky G proteinu. Tím inhibuje regulační funkce G proteinu a narušuje buněčnou signalizaci [29]. Pertusový toxin je zodpovědný za lymfocytózu [30] a vyvolává u infikovaného organismu hypoglykémii, která může vést k poruchám centrální nervové soustavy [31].

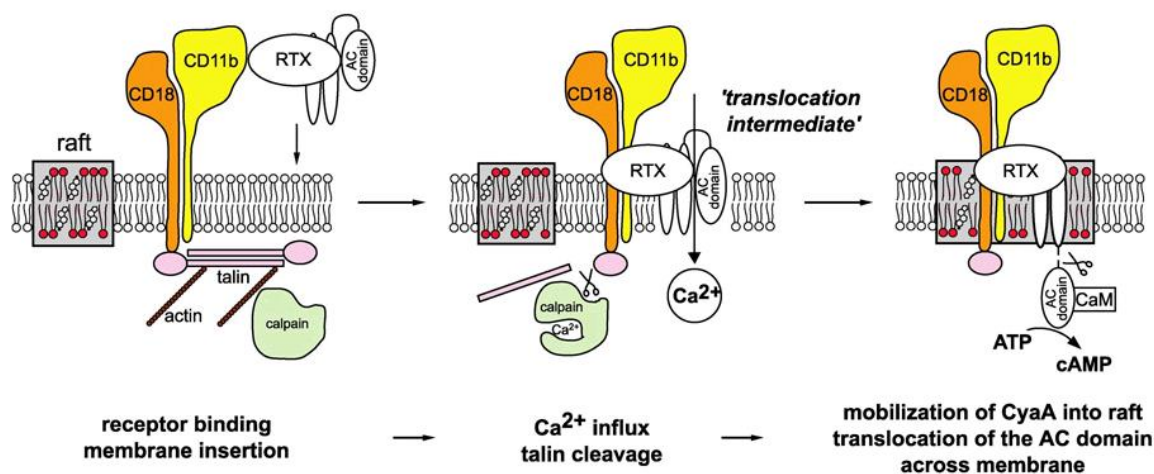


Obr. 3.3. Krystalová struktura hexameru pertusového toxinu. Převzato ze [4]

3.4. Adenylátcyklázový toxin

Adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT) je polypeptido molekulové hmotnosti 220 kDa. Patří mezi takzvané Repeats-in-toxin (RTX) exoproteiny vyskytující se mezi gram-negativními bakteriemi. Tento toxin se exportuje z buňky pomocí sekrečního systému typu I (T1SS) a je klíčovým faktorem virulence u všech zástupců rodu *Bordetella* schopných infikovat savce [32]. ACT se skládá ze dvou funkčně odlišných segmentů. C-koncová doména obsahuje

velký počet nonapeptidových glycin-aspartátových repetitivních sekvencí. Tyto repetice mají významnou funkci při vazbě iontů Ca^{2+} a podporují skládání proteinu do správné funkční konformace [33]. C-koncová doména zprostředkovává vazbu proteinu na cílové buňky, a tvoří kation-selektivní póry v jejich plasmatické membráně [34][35]. Má vysokou afinitu ke komplementovému receptoru 3 (CR3, $\alpha\text{M}\beta 2$ integrin, CD11b/CD18 a Mac-1), který se vyskytuje na neutrofilech, makrofázích a dendritických buňkách [36]. N-koncová doména obsahuje enzym adenylátcyklázy, který je schopen integrace do cílové buňky. Po aktivaci intracelulárním kalmodulinem katalyzuje nekontrolovanou přeměnu ATP na cAMP, čímž významně narušuje buněčnou signalizaci [37]. Tímto mechanismem je toxin schopen blokovat fagocytózu u makrofágů a neutrofilů [38] a potlačuje aktivaci a chemotaxi T-buněk [39].



Obr. 3.4. Mechanismus průniku ACT membránou – 1) Navázání na integrin $\alpha\text{M}\beta 2$ a inzerce do membrány, 2) Vstup iontů Ca^{2+} do buňky a štěpení talinu, 3) Translokace AC-domény přes cytoplazmatickou membránu. Převzato z [5]

3.5. Dermonekrotický toxin

Dermonekrotický toxin (DNT) je protein o molekulové hmotnosti 150 kDa. Na N-konci proteinu je doména zodpovědná za vazbu na buňky, ačkoliv přesný receptor není zatím znám [X]. C-koncová část toxinu má transglutaminásovou aktivitu a je tak schopna katalyzovat polyaminaci nebo deaminaci RhóGTPáz [40], čímž snižuje účinnost buněčné signalizace. Při in vitro experimentech byl také schopen inhibovat osteogenezi [41]. DNT ale postrádá signální sekvenci pro export z buňky a není ani bakterií aktivně sekretován

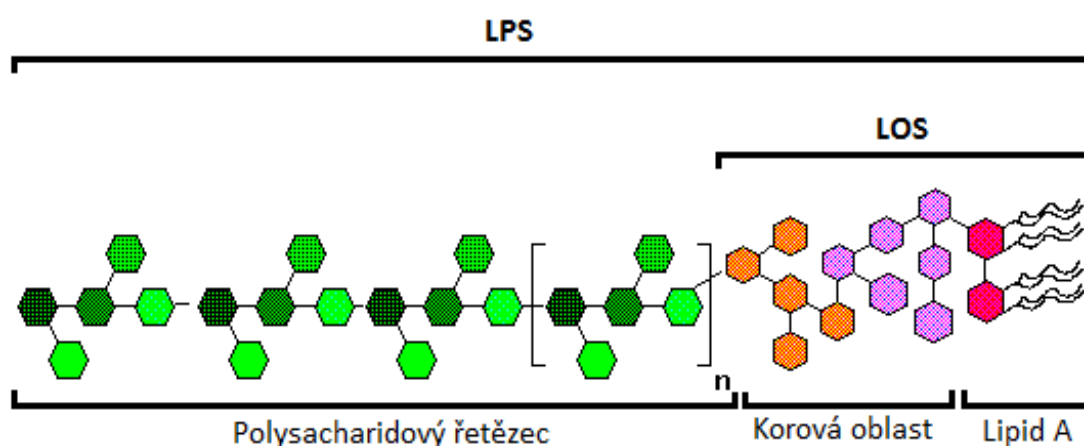
[42]. Funkce DNT v patogenezi černého kašle není přesně známa. Pravděpodobně zůstává při infekci v bakteriální cytoplazmě a zajišťuje přežití bakterií v hostiteli.

3.6. Cytotracheální toxin

Cytotracheální toxin (TCT) je nízkomolekulární glykopeptid o velikosti 921 Da, který se uvolňuje při přestavbách bakteriální stěny [43]. Je to jediný faktor virulence, jež není regulován BvgAS systémem. Většina gram-negativních bakterií ho velmi efektivně recykluje [44]. *B. pertussis* se uvolňuje většinu toxinu do extracelulárního prostředí. TCT je schopen stimulovat pro-zánětlivé cytokiny (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β a IL-6) a produkci oxidu dusnatého, čímž zabraňuje proliferaci buněk plicního epitelu [45].

3.7. Lipooligosacharid *B. pertussis*

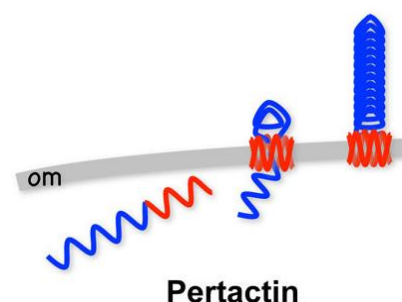
Všechny kmeny rodu *Bordetella* produkují odlišný typ lipooligosacharidu (LPS). *B. pertussis* tvoří penta-acylovaný lipid A, který je připojen k trisacharidové kórové oblasti (Obr. 3.5). Jelikož postrádá polysacharidový řetězec (O-antigen), je označován jako lipooligosacharid (LOS) [46]. Stimulace dendritických buněk pomocí LOS vede k produkci protizánětlivých regulačních T-buněk (T_{REG}) [47]. Snížení zánětlivé odpovědi pravděpodobně usnadňuje přežití *B. pertussis* během infekce. LOS také stimuluje TLR4 zprostředkovanou imunitní odpověď [48].



Obr. 3.5. Schematické znázornění LPS a LOS. Lipid A je fosforylovaný glukosaminový disacharid s několika mastnými kyselinami. Kórová oblast je tvořena 2-keto-3-deoxyacetátem (KDO) a heptózami. LOS obsahuje oproti LPS jen velmi krátký cukerný řetězec za kórovou oblastí. Převzato a upraveno z [6]

3.8. Pertaktin

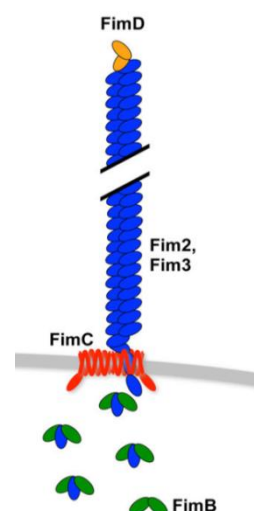
Pertaktin (PRN) je membránový protein o velikost 69 kDa. Patří mezi autotransportéry [49] a je tvořen z prekursoru o velikosti 100 kDa. C-koncový 30 kDa region (červený) tvoří kanál ve vnější membráně, který slouží k přenosu zbytku proteinu (modrý) na povrch buňky (Obr. 3.6). Pertaktin zvyšuje resistenci bakterie proti imunitní odpovědi zprostředkované neutrofily a zlepšuje přichycení buněk *B. pertussis* na buňky dýchacích cest [15][50].



Obr. 3.6. Schématické znázornění prezentace pertaktinu na buněčném povrchu. Převzato z [7]

3.9. Fimbrie

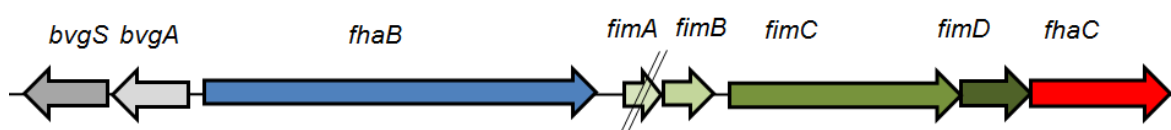
Fimbrie (Fim) jemné vláknité výrůstky na povrchu mnoha bakterií. U *B. pertussis* hlavními podjednotkami Fim2 nebo Fim3 (Obr. 3.7). Jejich molekulová hmotnost je podobná, ale sérologicky jsou odlišné [51]. Obsahují dvě heparin-vazebné domény, které zprostředkovávají vazbu na extracelulární matrix plicních epitelálních buněk [52].



Obr. 3.7. Schématické znázornění prezentace fimbrií na buněčném povrchu. Převzato z [7]

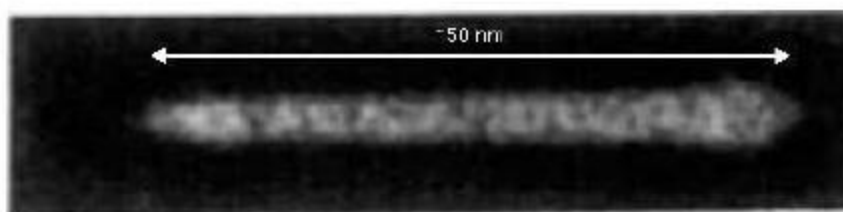
3.10. Filamentózní hemagglutinin

Filamentózní hemagglutinin (FHA) je protein o velikosti 230 kDa a je hlavním adhesinem *B. pertussis*. Je kódován strukturním genem *fhaB*, který je prvním v polycistronickém operonu, následován geny *fimB-D* pro biogenezi fimbrií a genem *fhaC* kódujícím transportér pro FHA ve vnější membráně (Obr. 3.8).



Obr. 3.8. Schématické znázornění struktury FHA locusu. Převzato z [8]

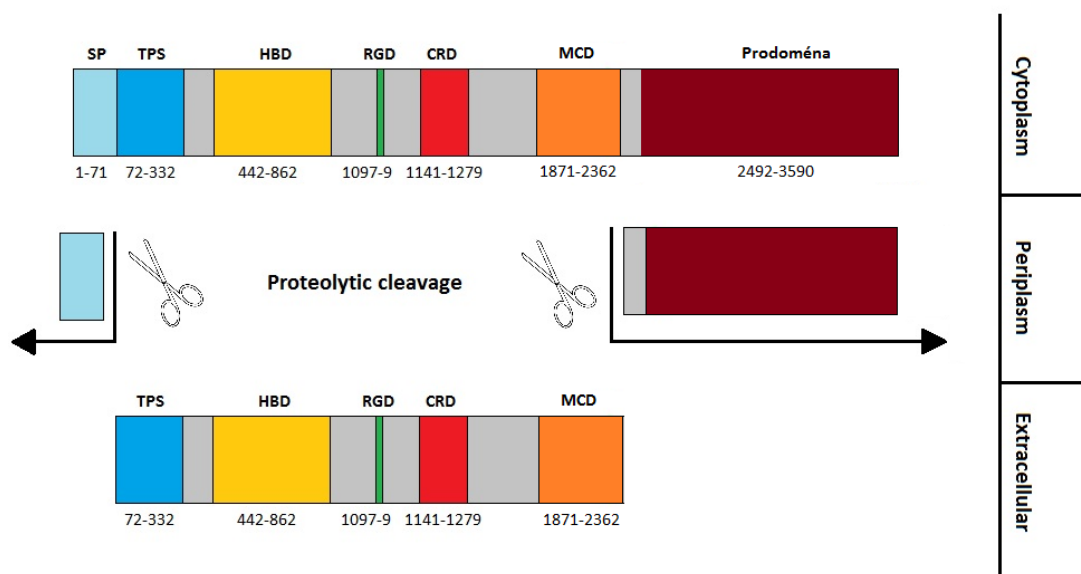
Gen *fhaB* má potenciál kódovat polypeptidový prekursor o velikosti 367 kDa, který prochází během sekrece do extracelulárního prostoru proteolytickým štěpením. Plně aktivní protein odpovídá N-koncovým dvěma třetinám prekursoru, má velikost 230 kDa a je prezentován na povrchu buněk nebo uvolňován do média[53]. Tvarem připomíná FHA sponku, která je přibližně 50nm dlouhá a 4nm široká (Obr. 3.9) [54].



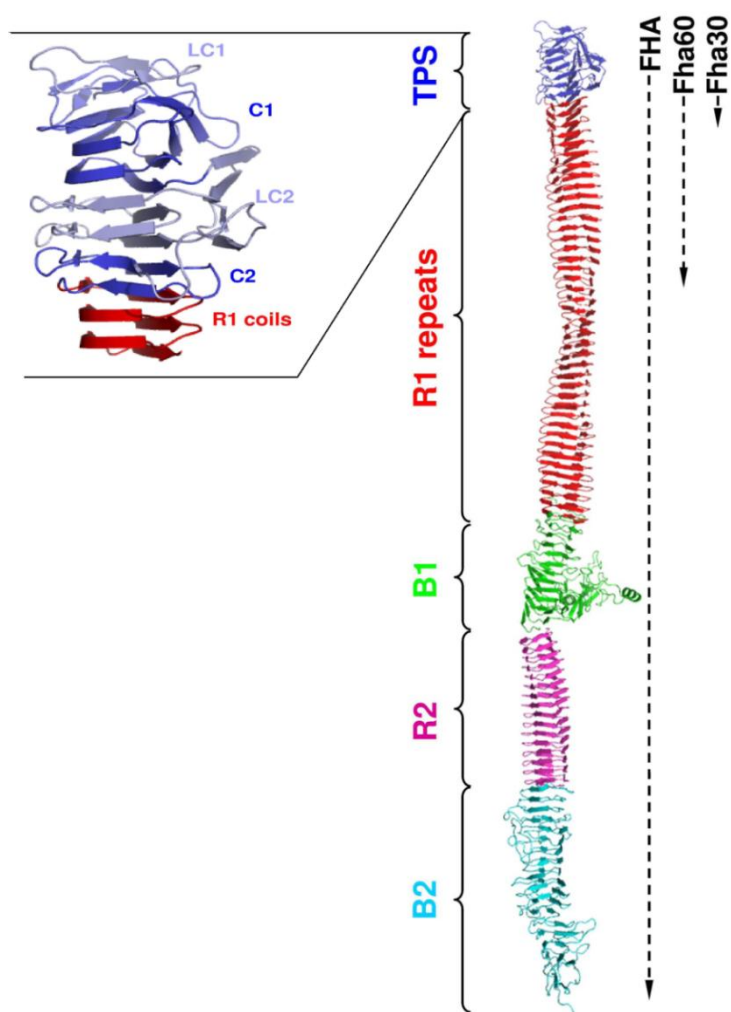
Obr. 3.9. Molekula FHA zobrazená pomocí negativního barvení v transmisní elektronové mikroskopii.

Převzato z [9]

FHA obsahuje dvě sekvence důležité pro sekreci proteinu (Obr. 3.10). N-koncový signální peptid (SP) pro Sec systém sloužící pro sekreci FHA do periplasmatického prostoru. Tato sekvence má 71 aminokyselin a obsahuje 3 cysteiny, které jsou nezbytné pro post-translační cyklizaci N-koncového glutaminu (Gln-72) na pyroglutamát. TPS modul zajišťuje interakci s partnerským proteinem FhaC a následný transport přes vnější cytoplasmatickou membránu do vnějšího prostředí. Tento modul vykazuje vysokou homologii s hemolysiny *Serratia marcescens* a *Proteus mirabilis*. FHA má také několik vazebných domén. Cukerná vazebná doména (CRD) pravděpodobně zprostředkovává vazbu buňky na řasinkový epitel makrofágů [55]. Heparin vazebná doména (HBD) se váže na sulfáty, které bývají hojně zastoupeny na buněčných površích a využívá se také k purifikaci proteinu z bakteriálního supernatantu [56]. Obsahuje také RGD (Arg-Gly-Asp) sekvenci, která je pravděpodobně odpovědná za interakci s integriny a s nimi asociovanými proteiny (LRI, integrin $\alpha\beta3$, IAP, CD 47) [57]. Na C-konci plně aktivního proteinu se nachází MCD (z angl. mature C-terminal domain), která hraje důležitou roli ve vazbě *B.pertussis* na buněčné povrchy[58] a je nutná pro kolonizaci respiračního traktu krys a myši. Prodoména je C-koncovou částí prekursoru FHA, která pravděpodobně slouží jako intramolekulární chaperon, zajišťující správné složení C-koncové části (MCD) aktivního FHA [59]. Také ovlivňuje rychlost samotné translokace FHA přes FhaC.



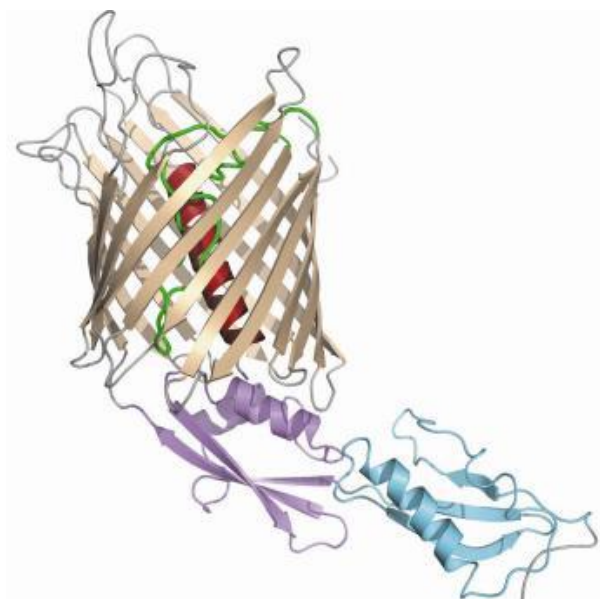
Obr 3.10. Schématický nákrés úpravy FHA během sekrece do vnějšího prostředí.



Obr. 3.11. Krystalová struktura 30 kDa N-koncové části FHA (Fha30, horní část), na jejímž základě je namodelována C-koncová část molekulyFHA (spodní část). Převzato z [10]

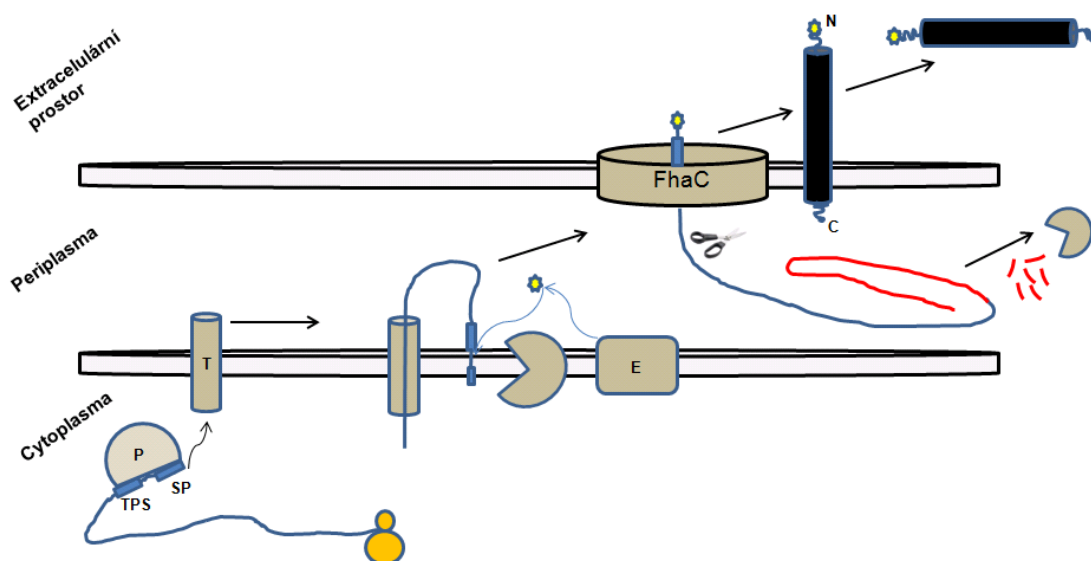
Prozatím byla vyřešena struktura N-koncové TPS domény, díky krystalizaci 30 kDa N-koncového fragmentu FHA (Obr. 3.11) [60]. Tato doména je složena do formy beta-šroubovice s několika extrahelikálními motivy. Obsahuje dvě dvojice velmi podobných struktur LC1, LC2 a C1, C2, které mají esenciální roly při rozpoznávání partnerského proteinu FhaC v extracelulární membráně. Zajišťují stabilizaci FHA a postupné skládání proteinu do formy beta-šroubovice [60][61]. FHA obsahuje dva velké oddíly repetitivních sekvencí R1 a R2 (Obr. 3.11). R1 sektor je složen ze dvou kopií 20 Aminokyselinových (AA) repeticí následován 37 kopiemi 19 AA bloků. R2 region obsahuje 13 repeticí po 19-20 AA s odlišným AA složením než v části R1. Tyto segmenty jsou predikovány jako beta-struktury [62]. Regiony B1 a B2 jsou pravděpodobně α -šroubovicové s nestrukturovanými úseky.

FHA patří mezi nejefektivněji sekretované proteiny mezi gram-negativními bakteriemi. Z buňky je exportován pomocí TPS (Two-partner secretion). Jedná se o interakci proteinu FHA (TpsA) s proteinem FhaC (TpsB), který umožňuje transport přes vnější buněčnou membránu. FhaC patří do skupiny Omp85-TpsB transportérů, zodpovědných za přenos beta-šroubovicových proteinů do extracelulárního prostředí. C-konec FhaC je složen z 16ti antiparalelních beta-skládaných listů s globulární periplasmatickou transportní doménou (POTRA), která je klíčová při rozeznávání FHA a jeho sekreci [63]. N-konec proteinu zakotvuje několik polypeptidů s transportní funkcí (Obr. 3.12). TPS je využíván velkým množstvím faktorů virulence u gram-negativních bakterií.



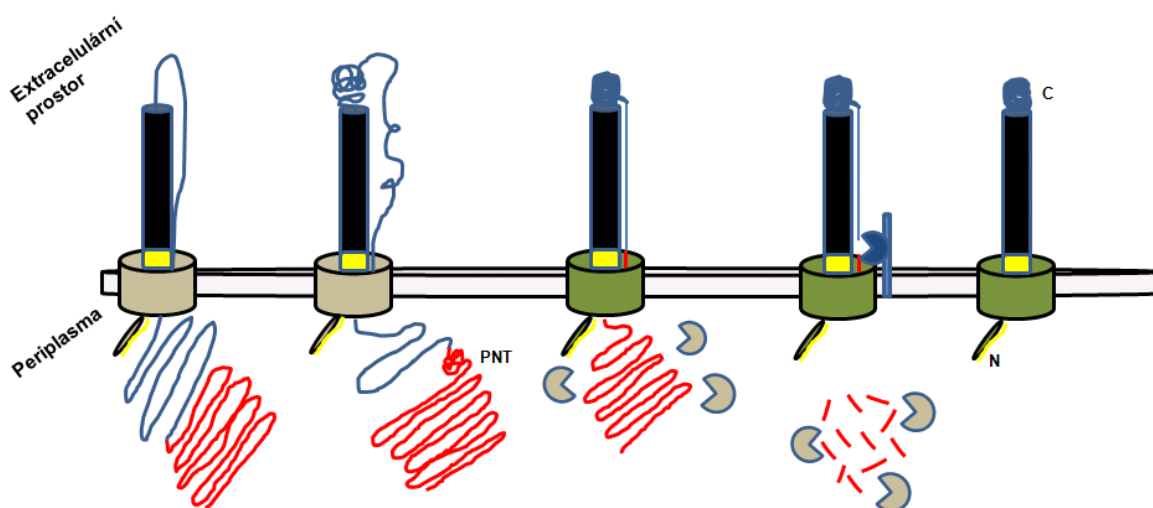
Obr. 3.12. Krystalová struktura FhaC. Přejato z [11]

Byly navrženy dva modely popisující sekreci FHA do extracelulárního prostoru. Nejdříve je prekurzor FHA o velikosti 367 kDa pomocí signální sekvence (SP) rozpoznán Sec systémem a translokován přes vnitřní cytoplasmatickou membránu do periplasmatického prostoru. Během nebo po průchodu přes cytoplasmatickou membránu dochází k odštěpení N-koncových 71 AA a následné enzymatické modifikaci N-koncového glutaminu (Gln72) na pyroglutamát. V první modelu, navrženém v roce 1996, rozpoznává TPS doména FhaC protein na vnější membráně a prochází N-koncovou částí napřed (Obr. 3.13)[64].



Obr. 3.13. Model mechanismu sekrece FHA (1996). Systém Sec je reprezentován P – pilotním proteinem a M – modifikačním enzymem. Přejato a upraveno z [8]

V modelu z roku 2006 je TPS segment FHA zachycen POTRA doménou a zůstává v periplasmě. Zbytek proteinu je poté translokován přes FhaC do extracelulárního prostoru. Energií k tomuto procesu pravděpodobně poskytuje progresivní skládání proteinu do formy beta-šroubovice (Obr. 3.14) [65]. Po translokaci je prekursor na povrchu buňky proteolyticky odštěpen a vzniká tak FHA o velikosti 230 kDa (Obr. 2.15, modrá linka). Štěpení provádí primárně SphB1 proteáza, která je na povrchu buňky ukotvena N-koncovou lipidickou kotvou [66]. U SphB1 deficientních kmenů *B. pertussis* dochází také ke štěpení FHA prekursoru na povrchu buňky, ale odštěpený protein má odlišnou velikost (250 kDa) a má u myši sníženou schopnost vaznosti na epitelální buňky a makrofágy [67]. Odštěpená C-koncová prodoména je po translokaci FHA pravděpodobně degradována v periplasmě (Obr. 2.16, červená linka).



Obr. 3.14. Schematický model mechanismu sekrece FHA z roku 2006. Převzato a upraveno z [8]

Topologie molekuly FHA během sekrece přes FhaC zůstává stále předmětem diskuzí. V prvním modelu procházel prekursor přes FhaC N-koncovou doménou napřed a na povrchu buňky by tak měl být nejdříve sekretován N-konec aktivního proteinu. Nedávné studie ale naznačují, že je procesovaný C-konec veden z buňky jako první a hraje pravděpodobně roli ve vazebné a imunomodulační aktivitě FHA [59] [65] [68].

3.11. Bakteriální regulační RNA

Existuje velké množství RNA, která není překládána do proteinové struktury, ale plní v buňce regulační funkce. Mezi ně patří například transferová RNA (tRNA), ribozomální RNA a tmRNA (z angl. transfer-messenger RNA) [69]. Většina regulačních RNA představuje krátké nekódující transkripty, a proto se souhrně nazývají malé RNA (sRNA, z angl. small RNA). Na základě mechanismu účinku je můžeme rozdělit na RNA působící v cis a v trans. První skupina ovlivňuje expresi genu, jehož jsou součástí. Jde především o tzv. antisense RNA (asRNA) přepisované z opačného řetězce než regulovaný gen. Trans-kódované RNA jsou přepisovány z jiného úseku DNA než vlastní regulovaný gen, ale díky částečné komplementaritě mohou vázat cílovou mRNA a ovlivňovat její stabilitu [70].

3. Cíle práce

- Identifikace C-koncového segmentu filamentózního hemaglutininu (FHA)

z Bordetella pertussis

- Strukturní charakterizace C-koncového segmentu FHA

- Studium post-transkripční regulace exprese FHA

4. Materiál

4.1. Laboratorní vybavení

Centrifuga Eppendorf 5415 R, Eppendorf AG, SRN.

Centrifuga Biofugepico, Heraeus Instruments, SRN.

Centrifuga Universal 32 R, HettichZentrifugen, SRN.

Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA.

Centrifuga Rotanta 406 R, HettichZentrifugen, SRN.

CO₂ inkubátor, Sanyo, Japonsko

Digitální analytické váhy AB-104 S, Mettler Toledo, USA.

Digitální váhy HF-2000G, A&D Weighing, USA.

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, USA.

ImageQuant LAS 4000, GE HealthcareLife science, UK.

Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, ČR.

pH-metrinoLab Level 1, BPW, SR

PCR cykler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc., USA

ProgrammableThermalController PTC-100, Bio-Rad, USA.

Mrazicí box (–80 °C), Jouan, Francie.

Mrazicí box (–20 °C), Liebherr, Švýcarsko.

Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie.

Termostatovaná vodní lázeň Assistant 3180, Karl HechtGmbH&Co KG, SRN.

Transluminátor G:BOX, Syngene, UK.

TřepačkaMaxQ 5000, ThermoScientific, USA.

Vortex MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA.

Zařízení pro Western blotSemiphor, Hoefer, USA.

Zdroj pro elektroforézuPowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad, USA.

4.2. Chemikálie:

λ-DNA, MBI Fermentas, Litva

β-merkapt ethanol, Calbiochem, SRN.

Adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát (cAMP), Amersham, USA

Akrylamid, Serva, SRN.

Ampicilin, Biotika, SR.

Agarosa pro DNA elektroforesu, Appligene, Francie

Bacto-trypton, Oxoid, UK.

Bakteriologický agar, Oxoid, UK.

Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA.

Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, SRN.

Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA.

Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA.

Dithiothreitol (DTT), Serva, SRN.

dNTP mix (roztok 10 mmol/l), MBI Fermentas, Litva

Dodecylsulfátsodný (SDS), Serva, SRN.

Ethanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, SRN.

Glycerol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Glycin, Serva, SRN.

Hovězí sérový albumin - Albumin Fraktion V (BSA), Carl Roth, SRN.

Hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Hydrogenuhlíčitán sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chloridsodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chlorid vápenatý, Lachema, Brno

Isopropanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Isopropyl β -D-thiogalaktopyranozid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA.

Kanamycin, Sigma, USA

Kvasničný extrakt, Oxoid, UK.

Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Lachema, Brno

Kyselina chlorovodíková, Lachema, Brno

Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Methanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Močovina, Sigma-Aldrich, USA.

Methanol, Lachema, Brno
Octan draselný, Lachema, Brno
Rnasa, Serva, SRN
Sacharosa, Lachner, ČR
Pankreatická ribonukleáza (RNáza), Fermentas International Inc., Kanada.
Persulfátamonný (APS), Serva, SRN.
Síran hořečnatý, Fluka, SRN
Streptomycin, Sigma, SRN
Tetracyklin hydrochlorid, Sigma, USA
Tris(hydroxymetyl)aminomethan (Tris), Serva, SRN
Tris(hydroxymetyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN
SDS, Serva, SRN
Tetracyklin, Sigma-Aldrich, USA.
Tris-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN.
Tween 20, Sigma-Aldrich, USA.

4.3. Roztoky

Sol I:

Glukosa..... 50 mmol/l
Tris-HCl..... 25 mmol/l
EDTA..... 10 mmol/l

Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Uchovává se při 4°C.

Sol II:

NaOH..... 0,2 mmol/l
SDS..... 1% (w/v)

Sol III:

Octan draselný..... 3 mol/l
Ledová kyselina octová..... 115mmol/l

Uchovává se při 4°C.

Eluční pufr:

Tris-HCl..... 10mmol/l

EDTA..... 1 mmol/l

TUS pufr:

Tris-HCl..... 50mmol/l

Močovina..... 8 mol/l

SDS..... 1% (w/v)

Blotovací pufr:

pH 8,3

Glycin.....39mmol/l

Tris.....48mmol/l

SDS..... 0,0375% (w/v)

Methanol.....20% (w/v)

Nanášecí pufr pro SDS-PAGE:

pH 6,8

Tris-HC.....l 50 mmol/l

DTT..... 100 mmol/l

SDS 2 % (w/v)

Bromfenolová modř..... 0,1 % (w/v)

Glycerol 10 % (v/v)

Tris-glycinový pufr:

pH 8,3

Tris 25 mmol/l

Glycin 250 mmol/l

SDS 0,1 % (w/v)

TE pufr:

pH 8,0

Tris-HCl 10 mmol/l

EDTA.....1 mmol/l

TBE pufr:

pH 8,3

Tris-borát.....90 mmol/l

EDTA.....2 mmol/l

SSC pufr 20x :

NaCl..... 3 mol/l

Citronan sodný..... 0,3 mol/l

Wash 1:

20x SSC pufr.....10%(v/v)

SDS.....0,1 % (w/v)

Wash 2:

20xSSC pufr.....0,5%(v/v)

SDS..... 0,1 % (w/v)

Assay pufr:

Tris..... 100 mmol/l

NaCl..... 100 mmol/l

MgCl₂..... 10 mmol/l

Blokovací pufr:

SDS..... 5 % (w/v)

Na₂HPO₄..... 17 mmol/l

NaH₂PO₄.....8 mmol/l

NaCl..... 125mmol/l

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant blue R250..... 0,01% (w/v)

Ethanol.....4,7% (v/v)

H₃PO₄.....8,7% (v/v)

Chemiluminiscenční roztok A:

pH 8,8

Roztok 1

Luminol(rozpustit v DMSO) 2,5mmol/l

Tris-HCl 100mmol/l

Roztok 2

Kyselina p-kumarová(rozpustit v DMSO) 90mmol/l

Výsledný roztok A: k 10 ml roztoku 1 přidat 44μl roztoku 2

Chemiluminiscenční roztok B:

pH 8,5

H₂O₂.....5,4mmol/l

Tris-HCl 100mmol/l

Před detekcí byly smíchány chemiluminiscenční roztok A a roztok B v poměru 1:1.

Roztoky byly uchovávány při 4°C.

PBS:

pH 7,4

NaCl.....138mmol/l

KCl 3 mmol/l

Na₂HPO₄ 12mmol/lKH₂PO₄.....2 mmol/l**PBST:**

Tween20..... 0,1% (w/v)

v PBS

PBST-BSA:

BSA 5% (w/v)

Tween20..... 0,1% (w/v)

v PBS

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol..... 225 ml

Voda 225 ml

Kyselina octová..... 50 ml

Coomassie Brilliant blue G250 0,5 g

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol..... 250 ml

Voda 650 ml

Kyselina octová 100 ml

NE Pufr 1,2,3,4, NewEnglandBiolabs, USA

T4 DNA Pufr Ligasy, MBI Fermentas, Litva

HF-Pufr DNA Polymerázy, NewEnglandBiolabs, USA

GC-Pufr DNA Polymerázy, NewEnglandBiolabs, USA

4.4. Enzymy:

Phusion High-Fidelity DNA Polymeráza, New England Biolabs, USA

T4 DNA Ligasa, MBI Fermentas, Litva

EagI, EcoRI, EcoRV, KpnI, NdeI, NsiI, SpeI, XhoI, New England Biolabs, USA

4.5 Kultivační média

LB medium (Luria-Bertani medium):

Bacto-tryptone 10 g

Kvasničný extrakt 5 g

NaCl 10 g

Deionizovaná voda ad 1000 ml

MDO:

NaH₂PO₄ 1 g

Na₂HPO₄ 3 g

NH₄Cl 2 g

Na₂SO₄ 0,5 g

Thiamin 0,01g

Kvasničný extrakt 20 g

Glycerol 20 g

Deionizovaná voda ad 1000 ml

Upraví se na pH 7,0 pomocí 5 mol/l NaOH. Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut)

BG:

Difco™ BordetGengou Agar.....	30g
Bramborový extrakt.....	4,5g
NaCl.....	5,5g
Agar.....	20 g
Glycerol.....	10 g
Deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut)

SS medium (Stainer-Scholte medium):**Frakce A**

Tris-HCl.....	3,36g
Tris-báze.....	1,18g
Glutamát.....	10,72g
Prolin.....	0,24g
NaCl.....	2,5g
KH ₂ PO ₄	0,5g
KCl.....	0,2g
MgCl ₂	0,1g
CaCl ₂	0,02g
Hydrolyzovaný kasein.....	5g
Cyklodextrin.....	1g
Deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

Frakce B

L-cystein.....	0,4g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g
Askorbová kyselina.....	0,2g
Nikotinová kyselina.....	0,04g
L-Glutation.....	0,1g
Deionizovaná voda.....	ad 100 ml

Před kultivací se do frakce A přidá 1ml frakce B.

Minimální médium M9

M9 sůl

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O.....	151g
KH ₂ PO ₄	30g
NaCl.....	5 g
Deionizovaná voda	ad 1000 ml

Upraví se na pH 7,4 pomocí 5 mol/l NaOH. Sterilizuje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut) Před použitím se na 1 litr roztoku M9 soli přidává :

Thiamin.....	...0,34g
Glukosa.....	4 g
MgSO ₄	0,24 g
CaCl ₂	0,11g
¹⁵ NH ₄ Cl.....	1g
Nutriční mix (SeMet).....	0,5g

4.6. Bakteriální kmeny:

B. pertussis Tohamal, Institute Pasteur, Francie

E. coli XL-1, Stratagene, USA

E. coli BL21 λ(DE3) , Stratagene, USA

E.coli SM10αpir, Biomedal, Španělsko

4.7. Plasmidy

pss4245, Scott Stibitz, USA

pet42b, Novagen, Německo

5. Metody

5.1. Transformace bakterií

Transformace je přijetí cizorodé genetické informace určitým organismem. Přirozeně se vyskytuje v přírodě zejména u bakterií, uměle ji vědci napodobují v genetickém inženýrství za cílem manipulace dané buňky. DNA se nejdříve přichytí na buněčnou stěnu a proniká do bakteriální cytoplazmy pomocí teplotního šoku.

Pracovní postup: Buňky bakterie *E. coli* byly vyjmuty z mrazicího boxu (-80 °C), rozmrazeny a byl přidán 1 µl požadovaného plasmidu. Po 10 minutové inkubaci na ledu, byla zkumavka přesunuta na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37°C. Následně byl přidán 1 ml LB média a kultivace pokračovala při 37 °C 1 hodinu. Mikrozkumavka byla centrifugována při 16000 g, 25 °C, 1 minutu, peleta byla resuspendována ve 300 µl média a hokejkou rozetřena na agarosovou misku s antibiotikem. Miska byla ponechána v místnosti s konstantní teplotou 37 °C po dobu 24 hodin.

5.2. Příprava agaru pro kultivaci bakterií

Agar je lineární polymer galaktózy s vysokou gelující schopností vyráběný z červených mořských řas rodů *Floridae* a *Gelidium*. Agar taje při 85°C a tuhne při méně než 40 °C. Ve spojení s LB a BG médiem se využívá jako živné médium pro kultivaci mikroorganismů.

Pracovní postup: LB a BG agar byly připraveny smíšením látek uvedených v kapitole 4.5 s příměsí 18 g/l bakteriologického agaru. Po autoklávování se agar ochladí na 50°C, přidá se k němu roztok antibiotik a v případě BG agaru i beraní krev (1:7). Následná směs se rozprostře na dno petriho misek a skladuje při 4°C.

5.3. Izolace plasmidové DNA

Izolace DNA je proces získání DNA ze zkoumaného vzorku pomocí kombinace fyzikálních a chemických metod. Po kyselé lyzi buňek následuje srážení proteinů a genomové DNA. Plasmidová dna se váže na křemičité mikropartikule na kolonce, promyje se a eluuje malým množstvím slabého pufru.

Pracovní postup: Kolonie *E. coli* y petriho misky byly resuspendovány v 1ml roztoku SOL I (Kap. 4.3) Roztok byl poté rovnoměrně rozdělen do 3 mikrozkuvek a do každé bylo přidáno 600 μ l roztoku SOL II (Kap. 4.3) a po 5ti minutách stejné množství roztoku SOL III (Kap. 4.3). Vzniklá sraženina byla inverzí promíchána a mikrozkuvka byla centrifugována při 16000 g, 25 °C, 5 minut. Supernatant byl ještě jednou centrifugován při stejných podmínkách. Na každou ze 2 minikolonen bylo napipetováno 200 μ l křemičitých mikropartikulí (DNA Lego kit, Top-Bio, ČR), které byly podtlakem popuštěny přes minikolonky. Roztok z mikrozkuvek byl poté smíšen s vazebným pufrům (1:1) a aplikován rovnoměrně na minikolonky. Plasmidová dna byla promyta 10ml pufru a minikolonky byly centrifugovány při 16000 g, 25 °C, 1 minutu pro odstranění zbylého promývacího pufru. Poté byly umístěny do čistých mikrozkuvek, na každou bylo pipetováno 30 μ l elučního pufru (Kap. 4.3) a následovala stejná centrifugace, jako v předešlém kroku. Roztok DNA byl skladován při -20°C.

5.4. Minipreparace plasmidové DNA

Kultivace jednoho klonu bakterie v malém množství tekutého média a izolace plasmidové DNA.

Pracovní postup: Jednotlivé kolonie *E. coli* byly postupně přesunuty pomocí párátko do připravených zkumavek s médiem a třepány při 37°C po dobu 18ti hodin. Následně bylo 1,5 ml vzorku odpipetováno do mikrozkuvky a centrifugováno při 16000 g, 25 °C, 1 minutu. Supernatant byl odstraněn a pelety byly resuspendovány ve 100 μ l SOL I (Kap. 4.3) Poté bylo přidáno 200 μ l SOL II (Kap. 4.3), roztoky byly promíchány a umístěny na led. Po 5ti minutách bylo přidáno 150 μ l SOL III (Kap. 4.3), vzniklé sraženiny byly inverzí promýhány a mikrozkuvky byly centrifugovány při 16000 g, 4 °C, 15 minut. Po dokončení centrifugace bylo z každé z mikrozkuvek odpipetováno 400 μ l vzorku a přidáno stejné množství vychlazeného isopropanolu. Vzniklé směsi byly promíchány a centrifugovány při 16000 g, 4 °C, 15 minut. Supernatanty byly odstraněny, pelety byly převrstveny 1 ml 70% ethanolu a mikrozkuvky byly centrifugovány při 16000 g, 25 °C, 3 minuty. Pelety byly vysušeny, resuspendovány ve 40 μ l roztoku TE (pH 8) s pankreatickou RNAsou (c=20 μ g/ml) a inkubovány v 70 °C vodní lázni 30 minut.

5.5. Kultivace bakterií v tekutém médiu

Kultivace bakteriální populace je mnohonásobné množení bakteriální buňky, dokud není vyčerpáno množství živin v prostředí či se jinak nezmění podmínky. Růst bakterií má několik dobře rozlišitelných fází a dá se v průběhu kultivace průběžně spektrofotometricky měřit.

LBmédiu (*E.coli*)

Pracovní postup: Několik kolonií s potřebným klonem *E. coli*, bylo kličkou přeneseno do 50 ml LB média s antibiotikem a třepáno ve 37 °C po dobu 12 hodin. Následně bylo 250 ml čerstvého MDO média se stejným antibiotikem inokulováno 5ml noční kultury. Baňka byla třepána při 37 °C za průběžné spektrofotometrické kontroly optické density (OD) při $\lambda = 600\text{nm}$. Po dosažení $OD=0,6$ byla kultura indukována pomocí IPTG na celkovou koncentraci 1 mM. Po 2 hodinách bylo odebráno 100 μl vzorku z kultivační baňky a centrifugováno při 16000 g, 25 °C, 1 minutu. Peleta byla resuspendována ve 100 μl SDS nanášecího pufru (Kap. 4.3.) a následně byla provedena elektroforéza na polyakrylamidovém gelu. Po 4 hodinách kultivace byla kultura přelita do vychlazených kyvet a centrifugovány při 16000 g, 4 °C, 20 minut. Peleta byla resuspendována v 20 ml 50 mM Tris pufru pH 8 a vzniklý roztok byl centrifugován při 16000 g, 4 °C, 20 minut. Poté byl supernatant odstraněn a peleta zmražena v -20 °C.

SS médium (*B.pertussis*)

Pracovní postup: Kolonie potřebného kmene *B.pertussis* byly do tekutého vyhřátého (37°C) SS média přeneseny v takovém množství, aby výsledná $OD=0,1-0,2$. Bakterie se pěstuje v množstvích 2-5 ml na třepačce ve 37°C 1 den. Po adaptaci na tekuté médium je možné *B.pertussis* rozpěstovat ve větších objemech inokulací předešlou kulturou na $OD=0,1-0,2$.

5.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (polymerázová řetězová reakce) je metoda molekulární biologie používaná k množení specifického úseku DNA in vitro, který je ohraničen krátkými DNA oligonukleotidy označovanými jako primer. DNA je syntetizována pomocí enzymu DNA-polymerázy na

principu komplementarity bazí. Vysokou teplotou dojde k denaturaci dvouřetězcové DNA a získaná jednořetězcová vlákna slouží jako templát. V další fázi nasedají primery ke komplementárním úsekům řetězců DNA tak, že jejich 3'-OH-konce směřují proti sobě. Následně dochází k samotné syntéze komplementární DNA od 5'ke 3'konci.

Pracovní postup: Jednotlivé složky reakce byly podle Tab. 4.1 napipetovány do PCR-mikrozkumavky a umístěny do PCR termobloku. Přístroj byl spuštěn s nastaveným programem dle Tab. 4.2.

Tab. 5.1.: Objemy všech složek pro přípravu vzorku pro amplifikační reakci PCR pro 50 μ l.

Pipetovací schéma pro PCR	
Komponenty	V (μ l)
H ₂ O	17,5
5x Phusion HF Pufr	10,0
5x Enhancer	10
10 mM dNTPs	1,0
primer A (c=0,01mM)	2,5
primer B (c=0,01mM)	2,5
Vzorová(templátová) DNA (c=0,3 μ g/ml)	1,0
glycerol	5,0
Phusion DNA polymeráza	0,5

Tab. 5.2.: Trvání a teploty jednotlivých cyklů při PCR.

Schéma cyklu PCR		
	T (°C)	t (s)
1.	98	15
2.	62	30
3.	72	20/kb
Opakování kroku 1-3 35		

Primery a vektory použité v této práci jsou uvedeny v Tab 5.3,5.4, cílovým genem pro PCR amplifikace byl *fhaB B.pertussis* Tohamal.

Tab. 5.3. Seznam použitých vektorů a k nim příslušných primerů

vektor	název primeru		sekvence (5' - 3')
pss4245 FHA TEV Δ371-1748	1	F-SpeI371	TTTACTAGT.GGCGGCCGCATCGGCCT
	2	R-TEV KpnI 371	TTTGGTACCGCCGCCGCGACGTTCA
	3	F-TEV KpnI 1748	TTTGGTACCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCGGGGAGCT GACCGTCAAG
	4	R-EcoRI1748	TTTGAATTCATACTCCATGGCGGACACG
pss4245 FHA TEV Δ371-1995	1	F-SpeI 371	TTTACTAGT.GGCGGCCGCATCGGCCT
	2	R-TEV KpnI 371	TTTGGTACC GCCGCCGCGACGTTCA
	3	F-TEV KpnI 1995	TTTGGTACCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCGACCTGCGT GGCCATACG
	4	R-EcoRI 1995	TTTGAATTCACGGTTTGTTCTTGGGAT
pss4245 FHA TEV Δ757-1748	1	F-SpeI 757	TTTACTAGTGGCGCGGATATCTCCGGC
	2	R-TEV XhoI 757	TTTCTCGAGCTCGGCCACGGTCGCCG
	3	F-TEV XhoI 1748	TTTCTCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCGGGGAGCTGACC GTCAAG
	4	R-EcoRI 1748	TTTGAATTC.ATACTCCATGGCGGACACG
pss4245 FHA TEV Δ757-1995	1	F-SpeI 757	TTTACTAGT.GGCGCGGATATCTCCGGC
	2	R-TEV XhoI 757	TTTCTCGAGCCGGTGCCAGCGGC
	3	F-TEV XhoI 1995	TTTCTCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCGACCTGCGTGGC CATAAG
	4	R-EcoRI 1995	TTTGAATTC.CACGGTTTGTTCTTGGGAT
pss4245 FHA TEV 1744	1	F-SpeI 1744	TTTACTAGTAGCCTGAAGGCAGGCCAC
	2	R-TEV XhoI 1744	TTTCTCGAGCGCTTCGCTTCGTTGGC
	3	F-TEV XhoI 1744	TTTCTCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCCTGTGGGCCGCC GGGG
	4	R-EcoRI 1744	TTTGAATTCGGACACGGTGCGCACCAC
pss4245 FHA TEV 1862	1	F-SpeI 1862	TTTACTAGTCTGACCACCGAAATCGAGAC
	2	R-TEV XhoI 1862	TTTCTCGAGCGACTGCTCCGCCGT
	3	F-TEV XhoI 1862	TTTCTCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCATCGAGGTCGGC AAGGATC
	4	R-EcoRI 1862	TTTGAATTCATCTTCGCCTTCTCGTACT

Tab. 5.4. Seznam použitých vektorů a k nim příslušných primerů

vektor	název primeru		sekvence (5' - 3')
pss4245 FHA TEV 1871	1	F-TEV SpeI 1871	TTTACTAGTAATCCCGGCAGCCTGATCG
	2	R-TEV XhoI 1871	TTTCTCGAGATAGAGATCCTTGCCGACCT
	3	F-TEV XhoI 1871	TTTCTCGAGAACCTGTACTTCCAGGGCCTGAATGCCGG AGCGCGC
	4	R-TEV EcorI 1871	TTTGAATTCGTAAGCCTCCACGGCCTG
pss4245 FHA TEV 1995	1	F-TEV SpeI 1995	TTTACTAGT GGTATCGGCTATGTCAACTAC
	2	R-TEV SacI 1995	TTTGAGCTCCTTGAAAATAAAGATTCTCCTTGGGCATC GGCGGCG
	3	F-TEV SacI 1995	TTTGAGCTCCCGAACTCGACCTG
	4	R-EcorI 1995	TTTGAATTC CTTGGGATAGAACGCGATTTC
pet-42b FHA EC 1995-2108	1	F-FHA 1995	AAACCATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAAGGCTCCC GAACTCGAC
	2	R-FHA 2108	AAACTCGAGTTACACCGCGTCGATCTGCG
pet-42b FHA EC 1995-2162	3	F-FHA 1995	AAACCATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAAGGCTCCC GAACTCGAC
	4	R-FHA 2162	AAACTCGAGTTAGGTTTGTTCCTTGGGATAGA
pet-42b FHA EC 1995-2228	1	F-FHA 1995	AAACCATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAAGGCTCCC GAACTCGAC
	2	R-FHA 2228	TTTCTCGAGTTAAGCCAGCGCATCGTCGAT
pet-42b FHA EC 1995-2304	3	F-FHA 1995	AAACCATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGCAAGGCTCCC GAACTCGAC
	4	R-FHA 2304	TTTCTCGAGTTAGGCCACCTGCGCATTGC
pss4245 asFhaB	1	F-asFhaBSpeI	TTTACTAGTGTTGTGCGGCGCACGCCTA3
	2	R-asFhaBEagI	TTTCGGCCGGAAGACCCGTACACGC
	3	F-asFhaBEagI	TTTCGGCCGTACACGACGCCAGGG
	4	R-asFhaBEcorI	TTTGAATTCCTGTTGACGCTGGGACGC

5.7. Štěpení dsDNA

Restrikční endonukleázy jsou velká skupina původně bakteriálních enzymů, které štěpí dvoušroubovici DNA v místech se specifickou lokální nukleotidovou sekvencí a vytvářejí fragmenty definované délky.

Pracovní postup: Jednotlivé složky reakce byly podle Tab. 5.7 napipetovány do mikrozkušavky a reakce probíhala ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 2-4 hodin v závislosti na použitém enzymu a koncentraci DNA. BSA se do reakce přidává v případě, kdy to vyžaduje použitý enzym.

Tab. 5.7.: Objemy všech složek reakční směsi pro štěpení dsDNA

Štěpení vektoru	
Komponenty	V (μl)
vektor	35
NE Pufr 10x(1,2,3,4)	4
BSA 100x	0,4
Restrikční endonukleáza	2

5.8. Ligace dsDNA

DNA ligázy jsou specifická skupina enzymů schopných spojovat dsDNA fragmenty mezi sebou. Katalyzují vytvoření fosfodiesterové vazby mezi 3'OH skupinou jednoho řetězce DNA a 5'fosfátovou skupinou řetězce jiného. Jedná se o endergonickou reakci pro níž je energie získána rozštěpením ATP.

Pracovní postup: Jednotlivé složky reakce byly podle Tab. 5.8 napipetovány do mikrozkušavky a reakce probíhala při laboratorní teplotě 24 hodin.

Tab. 5.8.: Objemy všech složek reakční směsi pro ligaci DNA

Ligace vektoru	
Komponenty	V (μl)
vektor	1
Insert	16
Pufr T4 DNA Ligázy	2
T4 DNA Ligáza	1

5.9. Elektroforéza na agarósovém gelu

Elektroforéza patří mezi separační metody, které využívají k dělení látek jejich odlišnou pohyblivost ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektroforéza nukleových kyselin je založena na tom, že NK jsou v neutrálním nebo zásaditém prostředí polyanionty a se zvyšujícím se počtem nukleotidů v molekule DNA (RNA) úměrně roste i její náboj. Pro zachování stálosti rozdělení se využívají různé nosiče. Agarósa je netoxický lineární polysacharid, který je velmi stálý a dá se na něm rozdělit poměrně velké rozmezí velikostí molekul.

Příprava gelu: Podle požadované hustoty gelu bylo odváženo potřebné množství agarósy (Tab. 5.9) a láhev byla doplněna do 400 ml pomocí TBE. Po rozehrátí v mikrovlnné troubě bylo přidáno 14 μl ethidium bromidu, pro snadnou detekci nukleových kyselin. Agarósa byla v tekutém stavu rozlita do formy s hřebínkem.

Tab. 5.9.: Množství agarósy pro přípravu 0,6 a 2% agarosového gelu.

Příprava agarosového gelu		
$\omega_{\text{agarosy}} (\%)$	$m_{\text{agarosy}} (\text{g})$	$V_{\text{gelu}} (\text{ml})$
0,6	2,4	400
2	8	400

Elektroforéza: Do jamek ztuhlého agarosového gelu se napipetují vzorky s příměsí nanášecího pufru. Pro snadnou identifikaci velikosti fragmentů se do jedné z jamek dává standart, se směsí DNA o známých molekulových hmotnostech.

5.10. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Elektroforéza patří mezi separační metody a využívá se k oddělení látek na základě jejich různé pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli, jak již bylo uvedeno v předešlé kapitole. Polyakrylamid jako nosič má velmi vysokou rozlišovací schopnost a DNA izolovaná z tohoto gelu je vysoce čistá. Akrylamid ale patří mezi potencionální karcinogeny a mutageny a gel se pracněji připravuje. Do vzorků pro elektroforézu se přidává β -merkaptoethanol pro rozrušení disulfidických můstků a detergent ve formě dodecylsírany sodného (SDS), který proteiny obaluje a uděluje jim uniformní záporný náboj.

Příprava gelu: Ve zkumavce byly nejdříve smíšeny všechny složky separačního gelu podle Tab. 5.10 a roztok byl nanesen do aparatury. Následně byl převrstven etanolem pro zajištění jednotné hladiny. Po odlití etanolu a vysušení byl nanesen roztok zaostřovacího gelu vzniklý smíšením všech složek podle Tab. 5.10 a do něj byl umístěn hřebínek.

Tab. 5.10.: Objemy všech složek pro přípravu polyakrylamidového gelu.

% gel	5 %	7,5%	10%	12,5%	15%
separační gel					
Akrylamid 30%	0,83 ml	1,24 ml	1,66 ml	2,07 ml	2,5 ml
dH ₂ O	2,25 ml	1,8 ml	1,38 ml	1,98 ml	0,55 ml
Tris 1M pH 8.8	1,87 ml				
SDS 10%	50 µl				
APS 25%	12,5µl				
TEMED	12,5µl				
zaostřovací gel					
Akrylamid 30%	1,23 ml				
dH ₂ O	0,266 ml				
Tris 1M pH 6.8	0,2 ml				
SDS 10%	60 µl				
APS 25%	20 µl				
TEMED	5 µl				

Elektroforéza: Připravený gel byl přiložen k aparatuře, která byla naplněna Tris-glycinovým pufrem. Vzorky byly smíšeny s nanášecím pufrem a navrstveny pomocí Hamiltonovi stříkačky do jamek. Do jedné z jamek byl přidán proteinový standart. Elektroforéza probíhala při 40 mA 1 hodinu. Gel byl následně oddělen od aparatury a barven v bromfenolové modři nebo použit na přenos proteinů na membránu.

5.11. Izolace fragmentů DNA z gelu

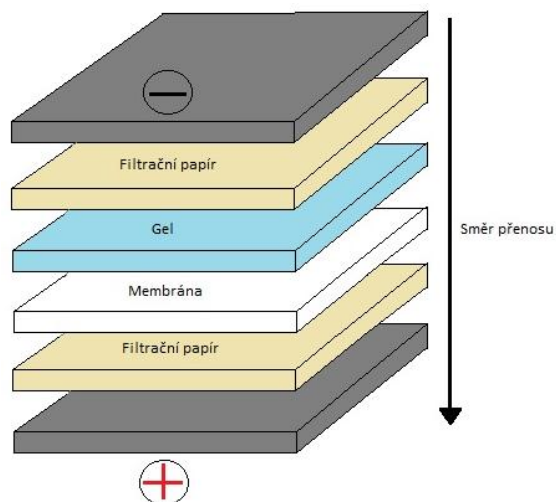
Po elektroforéze na agarosovém gelu je možné díky vmezeženému ethidium bromidu pozorovat DNA pod UV transluminátorem. Jednotlivé fragmenty mohou být vyřezány z gelu a rozpuštěny za vyšší teploty ve vazebném pufru. Separovaná DNA je poté promyta na kolonce a eluována do malého množství slabého pufru.

Pracovní postup: K vyřezanému fragmentu DNA bylo přidáno trojnásobné množství vazebného pufru a gel byl rozpuštěn v 50 °C vodní lázni za 10 minut. Na kolonku (NZYtech, Lisabon) byl napipetován roztok vazebného pufru s DNA a zkumavka s kolonkou byla centrifugována při 16000 g, 25 °C, 1 minutu. Poté bylo na kolonku pipetováno 700 µl promývacího pufru a následovala centrifugace při 16000 g, 25 °C, 1 minutu. Do středu minikolonky bylo pipetováno 40 µl elučního pufru a po 2 minutové inkubaci při pokojové teplotě byla kolonka centrifugována stejně jako v předešlém kroku. DNA byla zmražena při -20 °C.

5.12. Specifická imunodetekce proteinu na membráně (Western blot)

Western blot je analytická metoda, která se využívá k imunodetekci určitého proteinu ze směsi. Proteiny jsou nejdříve rozděleny pomocí Elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a přeneseny na povrch membrány. Nespecifická vazebná místa na membráně se poté zablokuje pomocí sušeného mléka nebo BSA. Následuje inkubace s primární protilátkou a sekundární, která je konjugována s křenovou peroxidázou. Ta katalyzuje v přítomnosti H_2O_2 oxidaci luminolu, který při stabilizaci vyzařuje světlo zachycované pomocí detekčního přístroje.

Pracovní postup: Filtrační papíry a membrána byly nejdříve namočený v blotovacím pufru a s gelem umístěny do aparatury podle Obr. 5.12. Přístroj byl uzavřen horním dílem a přenos proteinů probíhal 1 hodinu při napětí 5V.



Obr. 5.12.: Schematický náčrt zařízení pro Western blot

Po ukončení přenosu byla membrána třepána v roztoku PBST-BSA (Kap. 4.3) 1 hodinu při pokojové teplotě. Roztok byl odstraněn a přidán roztok PBST-BSA (Kap. 4.3) s vhodně naředěnou (1:10000) primární myší monoklonální anti-FHA-protilátkou. Membrána byla následně třepána 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byla 3krát promyta pomocí PBST (Kap. 4.3) vždy po 5ti minutách. K membráně byl přidán roztok PBST-BSA (Kap. 4.3) s vhodně ředěnou (1:4000) sekundární protilátkou. Membrána se třepala při laboratorní teplotě další 1 hodinu a následovalo 3krát pomytí pomocí PBST vždy po 5ti minutách. Po vysušení byla membrána převrstvena luminiscenčním roztokem vzniklým smíšením 1 ml roztoku A a 1 ml roztoku B (Kap. 4.3) a analyzována pomocí přístroje LAS4000.

5.13. Expres a purifikace rekombinantního proteinu

Expres rekombinantních proteinů je proces, při kterém můžeme pomocí různých expresních systémů vytvořit protein odvozený od konkrétního genu, nebo části genu. Prokaryotní systémy jsou výhodné především díky jednoduchosti, rychlosti a mají vysoký výtěžku produkovaného proteinu. Pomocí purifikačního systému se protein oddělí od nežádoucích nečistot a čistý produkt může být použit při dalších experimentech. Vektory byly konstruovány z plasmidu pet42b (resistence na Kanamycin). Pro purifikaci všech

rekombinantních proteinů v této práci byla použita afinitní chromatografie za pomoci Glutathion S-transferázy (GST) a Ni-NTA sefarózy. Nosič obsahuje imobilizovaný redukovaný glutathion, který je schopen v neutrálním pH vázat glutathion S-transferázu umístěnou na jednom z konců rekombinantních proteinů. Eluce proteinu se provádí pomocí volného redukovaného glutathionu a GST je posléze odštěpena pomocí TEV proteázy. Odštěpený protein se v dalším kroku váže díky histidinové kotvě na Ni-NTA sefarózu a je eluován gradientem imidazolu.

Pracovní postup: Bakterie s příslušným plasmidem byly pěstovány při 30 a 37°C podle návodu v kapitole 5.5. Pelety byly rozmrazeny, resuspendovány ve 35 ml PBS s 500 mM NaCl, sonikovány ultrazvukem při amplitudě 70 % 3 minuty a centrifugovány při 20000 g, 4°C, 30 minut. Kolona s 5 ml glutathion sefarózy byla nejdříve promyta pomocí PBS s 500 mM NaCl a následně byl přes ni přelit supernatant z centrifugovaných vzorků. Kolona byla následně promyta 25 ml PBS s 500 mM NaCl a protein byl eluován stejným pufrům s příměsí L-glutathionu (c=3 mg/ml). Následně byl protein přes noc dializován s TEV proteázou ve 4°C proti PBS a nanesen na kolonu s 5 ml Ni-NTA sefarózy, ze které byl po promytí pomocí PBS, eluován gradientem imidazolu.

5.14. Purifikace filamentózního hemagglutininu (FHA) z *B.pertussis*

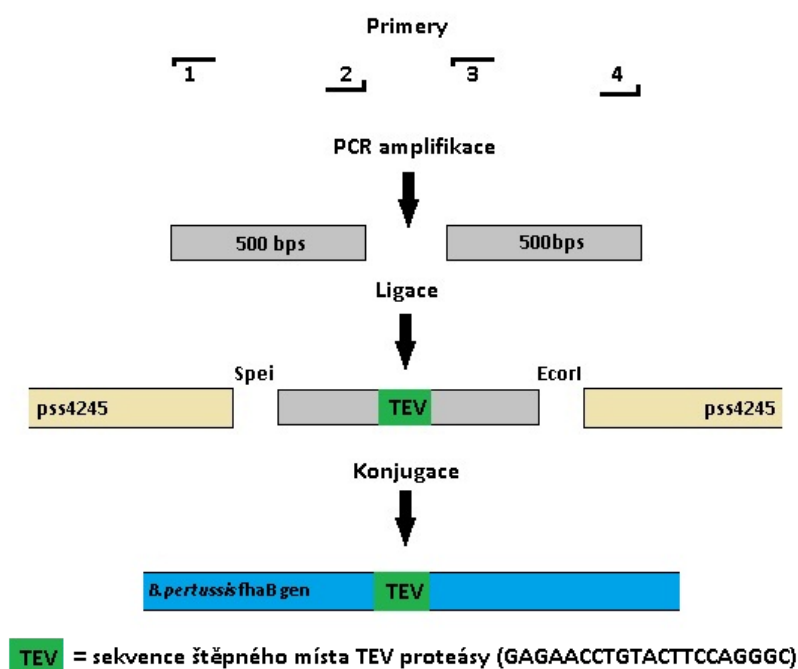
Jak již bylo zmíněno, filamentózní hemagglutinin patří mezi nejefektivněji sekretované proteiny mezi gram-negativními bakteriemi. *B.pertussis* produkuje FHA především ve stacionární fázi. Plně aktivní protein je sekretován do extracelulárního prostoru a je purifikován z média pomocí afinitní chromatografie. Jako nosič byl použit Cellufine sulfát (JNC corporation, Japonsko), který má vysokou afinitu k heparin-vazebné doméně obsažené v FHA. Eluce proteinu se provádí pomocí vysoké koncentrace soli.

Pracovní postup: Potřebný kmen *B.pertussis* byl napěstován ve 100 ml baňce dle postupu v kapitole 5.5. Poté byla přelita do 50ml flakonek a centrifugována při 16000 g, 4°C, 20 minut. Supernatant byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr a nanesen kolonu se Cellufine sulfátem, která byla nejdříve promyta pomocí 0,01 M fosfátového pufru pH 7,6. Poté byla

kolona promyta pomocí 0,01 M fosfátového pufru pH 7,6 a protein byl eluován po 1 ml frakcích pomocí 0,01 M fosfátového pufru s 0,7 M NaCl. Jednotlivé frakce byly kontrolovány na přítomnost proteinu pomocí činidla bradfordové. Proteiny byly skladovány při -80 °C.

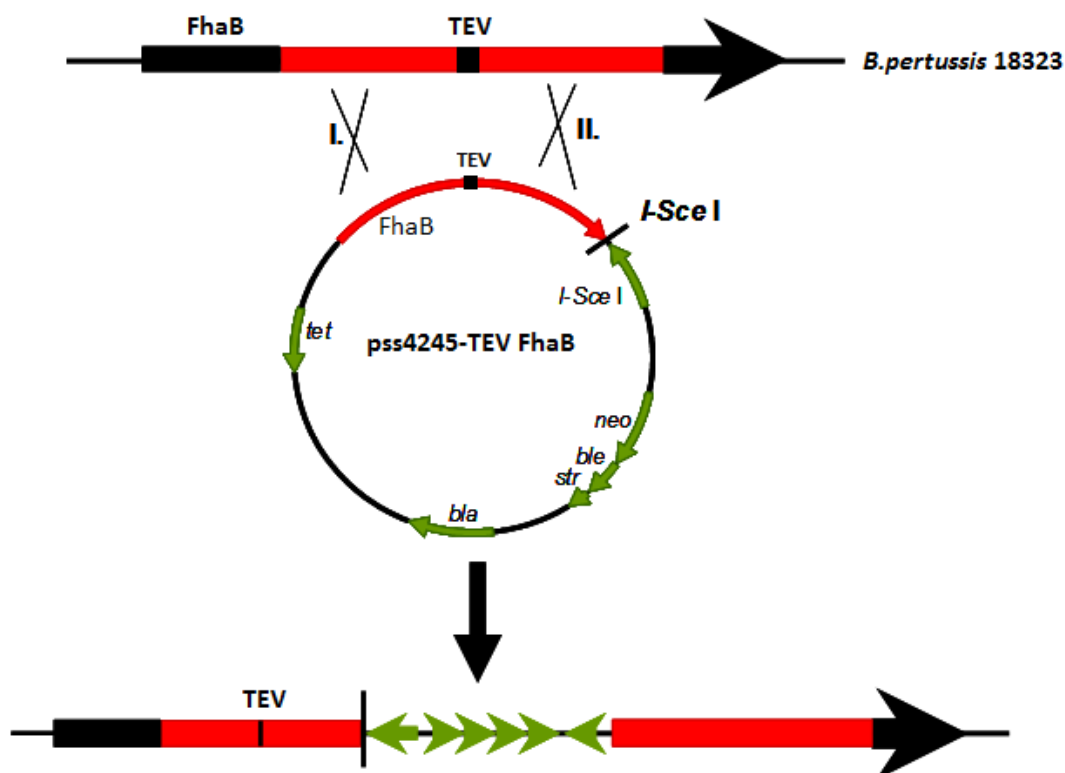
5.15. Alelická výměna na chromosomu *B.pertussis*

Konjugace je typ horizontální výměny DNA mezi dvěma buňkami, které jsou za tímto účelem dočasně spojené. Bakterie s F plasmidy tvoří tzv. pohlavní pilus zprostředkující kontakt s další bakterií. Vzniká tak cytoplazmatický můstek, kterým prochází jedno vlákno z dvoušroubovice plasmidu. V obou buňkách se vlákno dosyntetizuje a recipient může dále konjugaci sám iniciovat. Plasmidy se mohou přenášet i mezi bakteriemi různých druhů. Ke konjugaci *B.pertussis* se využívá kmen *E.coli* SM10λ pir s různými variantami plasmidu pss4245 (resistence na Ampicilin). Pro homologní rekombinaci se využívá dvou přibližně 500 bps homologních úseků dna, díky kterým se může plasmid rekombinovat do chromosomu *B.pertussis*. Do jednoho z primerů pro PCR amplifikaci je ve čtecím rámci přidána sekvence, kterou po translaci na protein rozeznává TEV proteáza. Schéma celého procesu je vidět na obr. 5.15. Do mutace se přidává se také unikátní restrikní místo pro snadnou analýzu plasmidů i kmenů.



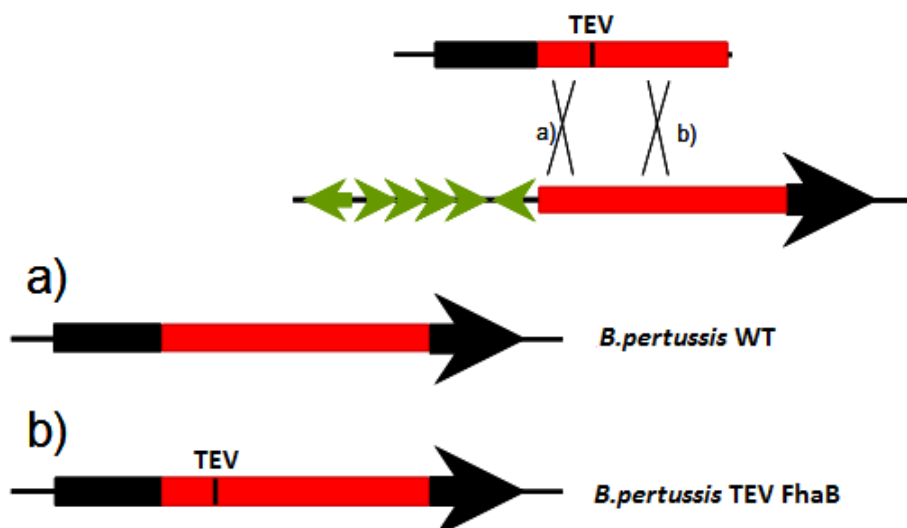
Obr. 5.15. Schematicky náčrtek konstrukce vektorů pro bakteriální konjugaci

Na plasmidu pss4245 je umístěn gen pro restrikční endonukleasu *I-SceI*, který je pod kontrolou *bvg* operonu (kap. 3.2), a zásahové místo pro restrikční endonukleasu *I-SceI*. Modulace BvgS proteinu pomocí 50 mM $MgSO_4$, vede k jeho inaktivaci a ke snížené expresi genů virulence. Po konjugaci *B.pertussis* s *E.coli* za modulačních podmínek dochází k 1. crossoveru a začlenění plasmidu pss4245 do chromosomu *B.pertussis* (Obr. 5.16).



Obr. 5.16. Schématické zobrazení 1.crossoveru mezi chromosomem *B.pertussis* a plasmid pss4245 a integrace plasmidu do chromosomu

Po několika denní inkubaci ve 37°C se bakterie roztírá na BG agar bez $MgSO_4$. Dochází tak k aktivaci *bvg* operonu, stěpení plasmidu pss4245 v *I-SceI* místě a 2.crossoveru (Obr. 5.17.)



Obr. 5.17. Schématické zobrazení 2.crossoveru v chromosomu *B.pertussis* a delece páteře plasmidu pss4245

Pracovní postup: Nejprve se divoký typ *B.pertussis* 18323 rozetřel na BG krevní misky (Kap. 5.2) s příměsí 50mM MgSO_4 a rostl 3 dny v inkubátoru ve 37°C. Plasmid pss4245 s potřebnou mutací byl transformován den před konjugací do *E.coli* SM10. Další den byl divoký typ *B.pertussis* ze 3 BG misek setřen do jednoho bodu na BG misku s 50 mM MgSO_4 a 10 mM MgCl_2 a následně byla přidána jedna klička *E.coli* SM10 s potřebným plasmidem. Tato směs se inkubovala ve 37°C po dobu 5 hodin. Malé množství bakteriální směsi bylo rozetřeno na 3 BG misky s 50 mM MgSO_4 , ampicilinem (30 $\mu\text{g/ml}$), kanamycinem (40 $\mu\text{g/ml}$) a streptomycinem (500 $\mu\text{g/ml}$) a misky byly inkubovány 3 dny ve 37°C. Několik náhodně vybraných kolonií bylo následně rozčárkováno na BG misky bez MgSO_4 a bakterie rostli při 37°C další 3 dny. U jednotlivých klonů byla následně provedena PCR reakce pro detekci vložené mutace a sekvenace.

5.16. Štěpení proteinu TEV proteázou

TEV proteáza se díky své vysoké specifitě používá ke kontrolovanému štěpení fúzních proteinů in vitro i in vivo. Je to protein o velikosti 27 kDa patřící mezi cysteinové proteázy

rozpoznávající aminokyselinou sekvenci ENLYFQ\G(S). K rekombinantním proteinům se přidává v poměru 1:20 (1TEV:20Prot) a optimální štěpení probíhá ve 4°C 18 hodin. TEV proteáza je inaktivní v prostředí s vysokou koncentrací soli (>300mM) nebo močoviny (>3M).

5.17. Purifikace RNA

Extrakce RNA z biologických vzorků bývá komplikována především přítomností velkého množství enzymů degradujících výslednou RNA. RNázy se oproti Dnázám velmi obtížně inaktivují a jsou ve velkém množství přítomny v okolí. Nejdříve se stěna bakteriálních buněk naruší pomocí Lysozymu a RNA je následně extrahována pomocí TRI-Reagentu, který díky kombinaci fenolu a guanidin thiokyanátu inhibuje RNázy. Po přidání chloroformu se z vodné fáze odpipetuje RNA, která se vysráží pomocí isopropanolu.

Pracovní postup: K 8 ml kultury *B.pertussis* napěstované dle návodu v kapitole 5.5 se přidaly 2 ml roztoku 96% etanolu s 5% (w/v) fenolu, a směs byla centrifugována při 16000g, 4°C, 20minut. Peleta byla resuspendována ve 400 µl TE pufru (Kap. 4.3) s lysozymem (1 mg/ml) a bylo přidáno 8ml TRI-Reagentu. Po 5ti minutách při pokojové teplotě a důkladném promíchání byl roztok rozdělen do 8 mikrozkuvek a centrifugován při 16000 g, 4°C, 10 minut. Supernatanty byly přepipetovány do čistých mikrozkuvek a do každé bylo přidáno 200 µl chloroformu. Směs byla promíchána a po 10ti minutách při pokojové teplotě centrifugována při 16000 g, 4°C, 12 minut. Vodná fáze z každého vzorku byla spolu s 500 µl vychlazeného isopropanolu převedena do čistých mikrozkuvek, rozmíchána a po 5ti minutách při pokojové teplotě centrifugována stejně, jako v předešlém kroku. Následně byl supernatant odstraněn a bylo přidáno 900 µl čerstvě připraveného 70% etanolu. Mikrozkuvky byly centrifugovány při 16000 g, 4°C, 15 minut, etanol byl odstraněn a pelety byly po vysušení resuspendovány ve 35 µl vody ošetřené pomocí DEPC (diethylpyrokarbonát). Kvalita a kvantita RNA vzorků byla měřena pomocí přístroje NanoDrop a RNA byla skladována při -80°C.

5.18. Specifická detekce RNA na membráně (Northern blot)

Northern blot je analytická metoda, která se využívá ke studiu genové exprese pomocí detekce specifické RNA ze směsi. RNA je nejdříve rozdělena pomocí Elektroforézy na polyakrylamidovém gelu a přenesena na povrch membrány. Nespecifická vazebná místa na membráně se zablokují pomocí DNA lososích spermií. S membránou je poté inkubována hybridizační sonda specifická pro hledanou RNA, která je na 5'konci označena biotinem. Po promytí se přidává streptavidin, který má vysokou afinitu k biotinu, s navázanou alkalickou fosfatázou. Ta je na membráně detekována pomocí chemiluminiscenčního substrátu CDP-Star (Sigma-Aldrich, USA) a signál je analyzován pomocí přístroje LAS 4000.

Pracovní postup: Všechny složky denaturujícího 10% polyakrylamidového gelu byly smíšeny ve zkumavce, doplněn vodou do 10ml (tab. 5.18) a roztok byl rozprostřen mezi skla aparatury.

Tab. 5.18. Objemy všech složek pro přípravu 10% denaturujícího polyakrylamidového gelu.

akrylamid 40%	močovina	APS	TEMED	10xTBE
2,5g	4,8g	33 μ l	4 μ l	1 μ l

Po ztuhnutí byl gel umístěn do přístroje pro elektroforézu a předehřát v přítomnosti TBE pufru. Do RNA vzorků byl přidán nanášecí pufr, vzorky byly zahřáty na 65°C a nanášeny společně se standardem na gel. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 15 mA. Následně byla RNA z gelu přenesena na membránu podle schématu z kap. 5.12. Přenos probíhal 1 hodinu při napětí 8V. RNA na membráně byla poté zafixována pomocí crosslinkeru (Stratalinker® UV Crosslinker), promyta SSC pufru (Kap. 4.3) a znovu zafixována. Membrána byla umístěna do skleněného válce a bylo přidáno 10 ml hybridizačního roztoku se 100 μ l DNA z lososích spermií pro zablokování volných míst na membráně. Skleněný válec se průběžně točil ve speciální komoře se 42°C a po 2 hodinách byl přidán 1 μ l biotinilované proby. Membrána byla inkubována 18 hodin při 60°C. Následně byla membrána odstraněna ze skleněného válce a promyta 2krát 5 minut puforem Wash1 a

Wash2 (Kap. 4.3.). Po promytí byl přidán blokovací pufr (Kap 4.3) 2krát na 5 minut, poté 3krát 30 minut, kdy v prostředním kroku byl přidán do blokovacího pufru streptavidin s navázanou alkalickou fosfatázou ($c=1\mu\text{g/ml}$). Následovalo další promytí membrány 2 2krát 5 minut pufrem Wash1 a Wash2 a 2krát 2 minuty v Assay pufru (Kap 4.3.). Membrána byla osušena, převrstvena 1ml roztoku CDP-Star a výsledná chemiluminiscence byla analyzována přístrojem LAS4000.

5.19. Gelová chromatografie

Gelová chromatografie patří mezi nejčastěji používané separační metody v molekulární biologii. Využívá se hydrofilního přírodního nebo syntetického gelu s póry, který je umístěn ve svislé koloně. Tou prochází konstantní rychlostí mobilní fáze a molekuly větší než póry gelu procházejí přes kolonu stejnou rychlostí jako mobilní fáze. Látky se tedy rozdělují podle zmenšujících se rozměrů molekul. Velké molekuly procházejí kolonou rychleji, malé pomaleji.

Pracovní postup: Kolona Superdex 200 (10/300) připojena k přístroji AKTA Prime FPLC (z angl. Fast protein liquidchromatography) byla promyta pomocí pufru (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl) a ve stejném pufru byl nanesen i vzorek. Gelová filtrace proteinu probíhala rychlostí 0,4 ml/min, 40 minut, při konstantním tlaku 0,6 MPa.

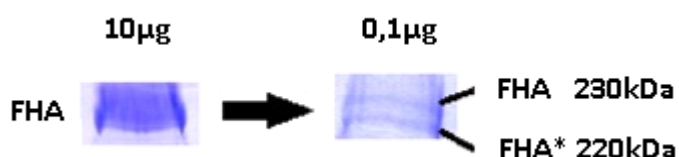
5.20. Kvantifikace signálu

Kvantifikace signálu získaných pomocí metody Western blotting byla analyzována v softwaru ImageJ (<http://www.uhnresearch.ca/facilities/wcif/imagej/>). Získané obrazy byly převedeny do 0-255 stupňů šedi a analyzovány modulem "Gels".

6. Výsledky

6.1. Identifikace C-koncového segmentu filamentózního hemaglutininu (FHA) z *Bordetella pertussis*

Z bakteriálního supernatantu *B. pertussis* lze purifikací na Cellufine sulfátu získat velké množství filamentózního hemaglutininu (FHA). FHA byl analyzován pomocí elektroforézy na 5% polyakrylamidový gelu, na který bylo naneseno 10 µg a 0,1 µg proteinu.



Obr. 6.1. Analýza 10 µg a 0,1 µg FHA na 5% polyakrylamidovém gelu.

Jak je vidět z Obr. 6.1, je možné rozlišit dvě formy FHA o molekulových hmotnostech 220 a 230 kDa. Proteinový pruh s nižší molekulovou hmotností vzniká pravděpodobně degradací FHA. Jelikož je na N-konci proteinu stabilní struktura, k degradaci pravděpodobně dochází v C-koncové části, která byla charakterizována ve spolupráci s Petrem Haladou, Ph.D, (Laborař charakterizace molekulární struktury, AV ČR) pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Purifikovaný FHA byl nejdříve rozdělen pomocí elektroforézy na 5% polyakrylamidovém gelu. Oba proteiny (FHA, FHA*) byly izolovány z gelu a štěpeny pomocí několika proteás (Clostripain, Trypsin, Lys-C proteáza a Asp-N proteáza), které zajišťují mnohem vyšší pokrytí peptidové sekvence (Obr. 6.2). Srovnání MS analýzy peptidových map obou proteinů ukázalo, že má FHA na C-konci několik peptidů, které chybí v mapě FHA*. Po bližší selekci byl nalezen peptid RLDIDDALA získaný pomocí proteázy Lys-C, štěpící peptidové řetězce za lysiny. Jelikož sekvence RLDIADDALA nepokračuje lysinem ale alaninem (Obr. 6.2), poslední aminokyselina tohoto peptidu, alanin2228, je také C-koncovou aminokyselinou FHA*. Poslední zachycený C-koncový peptid FHA byl na základě MS analýzy určen jako DAAQGLEVSGRRNAQVA. C-koncovou aminokyselinu FHA jsme tak identifikovali jako alanin v pozici 2304.

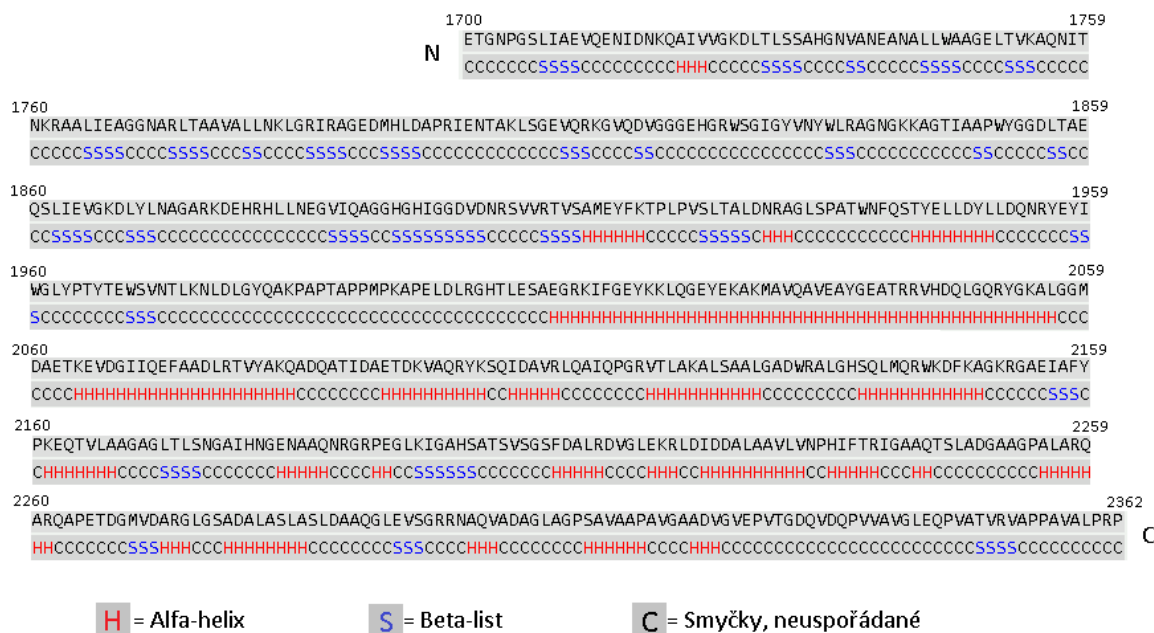
Peptidová mapa C-koncového segmentu FHA (2201-2320)



Obr. 6.2. Peptidová mapa C-koncového segmentu FHA získaná štěpením FHA* a FHA pomocí Clostripainu, Trypsinu, Lys-C proteázy a Asp-N proteázy. V translatované sekvenci FHA jsou červenými písmeny vyznačeny C-koncové aminokyseliny posledního identifikovaného peptidu získaného proteolytickým štěpením FHA* (Ala2228) a FHA (Ala2304).

6.2. Strukturní charakterizace C-koncového segmentu FHA z *B.pertussis*

C-koncová doména FHA (MCD) zprostředkovává vazbu bakterií na buňky plicního epitelu a je tak esenciální pro funkci proteinu. Struktura tohoto segmentu ale nebyla blíže studována. Sekundární struktura C-koncové části FHA byla navržena pomocí serveru I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) (Obr. 6.3).

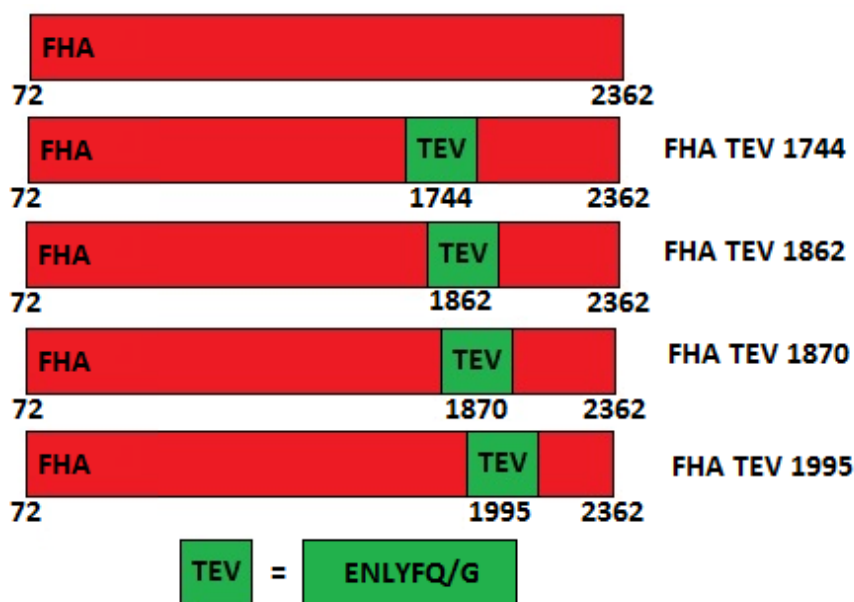


Obr. 6.3. Predikce sekundární struktury C-koncového segmentu FHA (1700-2362) ze severu I-TASSER zpracovaný metodou LOMETS (z angl. Local Meta-Threading-Server)

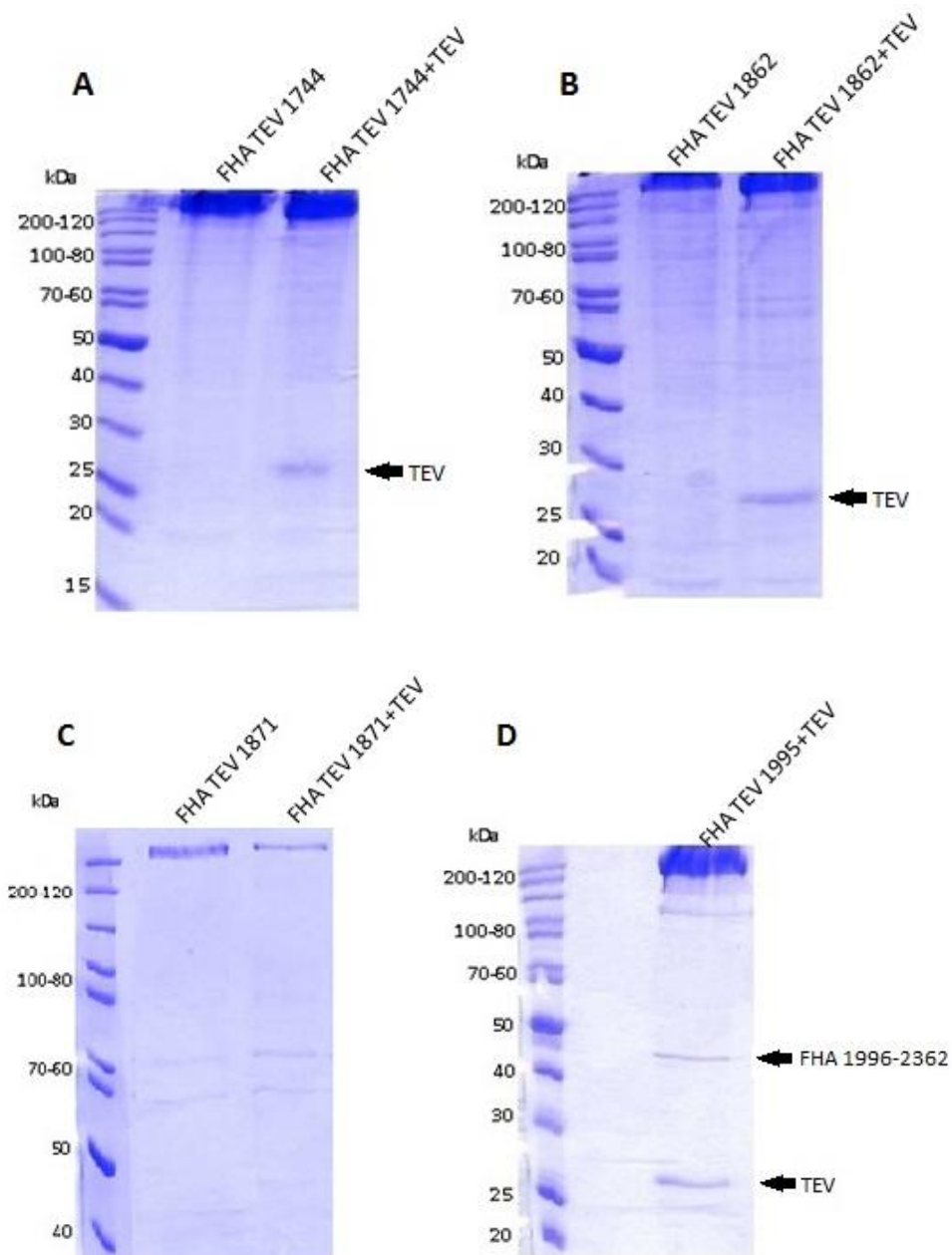
Přestože je většina FHA složena do formy repetitivních beta-otáček (Kap. 3.10), C-koncová část FHA pravděpodobně obsahuje velké zastoupení alfa-šroubovic a nestrukturovaných segmentů (Obr. 6.3).

FHA je kooperativně skládán během sekrece do extracelulárního prostoru. K získání C-koncového segmentu FHA byl zvolen systém, kde specifické místo, které rozeznává TEV proteáza (ENLYFQ/G), bylo umístěno do předem určených míst na polypeptidovém řetězci FHA. Byly sestaveny mutované kmeny *B.pertussis*, které produkovali FHA proteiny, jenž měli v pozicích 1744, 1862, 1871, 1995 vloženou sekvenci kódující štěpné místo pro TEV proteázu. Mutované kmeny byly vytvořeny pomocí rekombinace homologní části plasmidu *pss4245* do chromosomu *B.pertussis*. Vektory *pss4245-FHA-TEV1744*, *pss4245-FHA-TEV1862*, *pss4245-FHA-TEV1871* a *pss4245-FHA-TEV1995* byly vytvořeny podle

schématu na Obr. 5.15, Kap. 5.15. Pro PCR amplifikaci jednotlivých úseků *fhaB* genu byly použity primery z tab. 5.3, 5.4. Amplifikované fragmenty byly izolovány z gelu a každý byl štěpen dvojicí restrikčních enzymů (viz Tab. 5.3 a Tab. 5.4). Tyto fragmenty byly ligovány s plasmidem *pss4245* štěpeným restrikčními endonukleázami *SpeI*, *EcoRI*. Výsledné vektory byly ověřeny restrikční analýzou a DNA sekvenací. Následně byly transformovány do *E. coli* SM10 λ pir a konjugovány s divokým typem *B. pertussis Tohamal* (kap. 5.15.). Po homologní rekombinaci byly mutantní kmeny selektovány pomocí restrikční analýzy PCR úseků, získaných amplifikací oblasti chromosomu s mutací. Pozitivní kmeny byly dále identifikovány pomocí DNA sekvenace. Sekrece FHA proteinů byla ověřena kultivací jednotlivých kmenů ve 2 ml SS média, kde přítomnost FHA proteinů byla analyzována pomocí SDS- PAGE a imunochemické detekce proteinu na membráně. Kmeny byly poté napěstovány ve 200 ml SS média a FHA proteiny byly z bakteriálních supernatantů purifikovány pomocí afinitní chromatografie na Cellufine sulfátu. Jednotlivé varianty FHA byly štěpeny TEV proteázou po dobu 18 hodin ve 4°C a směsi proteinů následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 6.5).



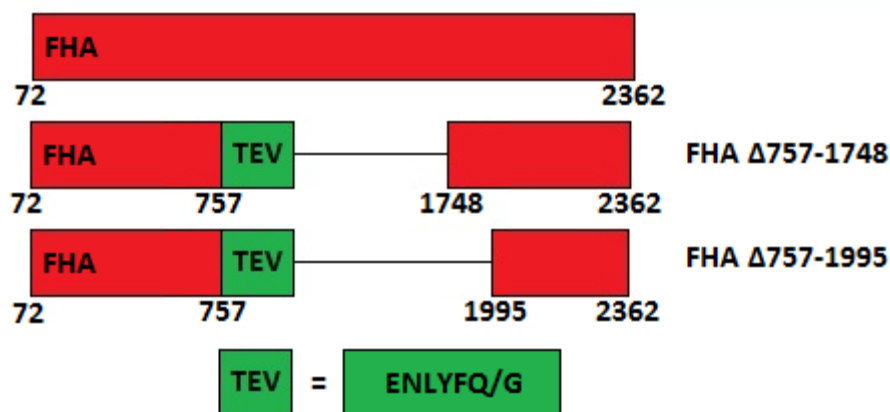
Obr. 6.4. Schematicky náčrtek mutantních variant FHA s vloženou sekvencí místa, které rozeznává TEV proteáza



Obr.6.5. Analýza efektivity štěpení mutantních variant FHA TEV proteásou pomocí SDS-PAGE, A – FHA TEV 1744, B – FHA TEV 1862, C – FHA TEV 1871, D – FHA TEV 1995

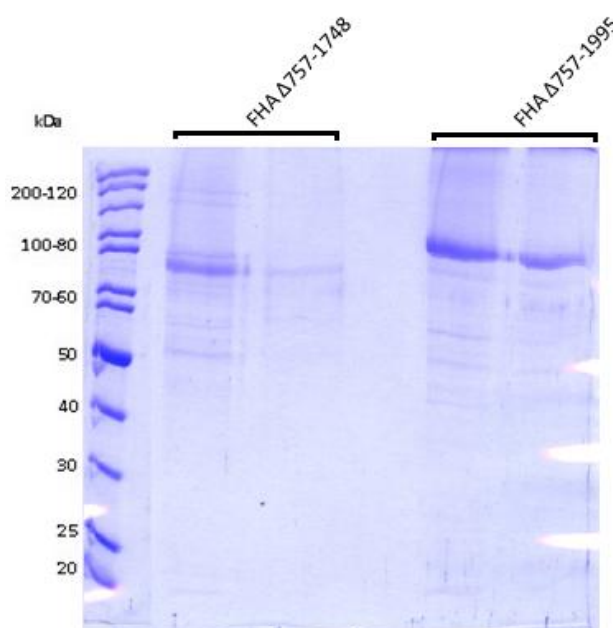
Jak je patrné z Obr. 6.5, štěpení proteinů FHA TEV 1744, FHA TEV 1862 a FHA TEV 1871 pomocí TEV proteázy nebylo účinné. Naproti tomu, velmi slabý pruh proteinu FHA1996-2362 byl detekován po štěpení FHA TEV 1995 proteinu. Nicméně, výtěžek tohoto C-koncového segmentu byl tak nízký, že nedostačoval pro další strukturní studie. Vzhledem k tomu, že vložení sekvence pro TEV proteázu do plného FHA proteinu nebylo efektivní,

rozhodli jsem se vytvořit mutanty s delecí ve střední části FHA. Deleční mutanty obsahovali N-koncový segment obsahující heparin-vazebnou doménu, zásahové místo pro TEV proteázu a C-koncové segmenty FHA (Obr 6.6).

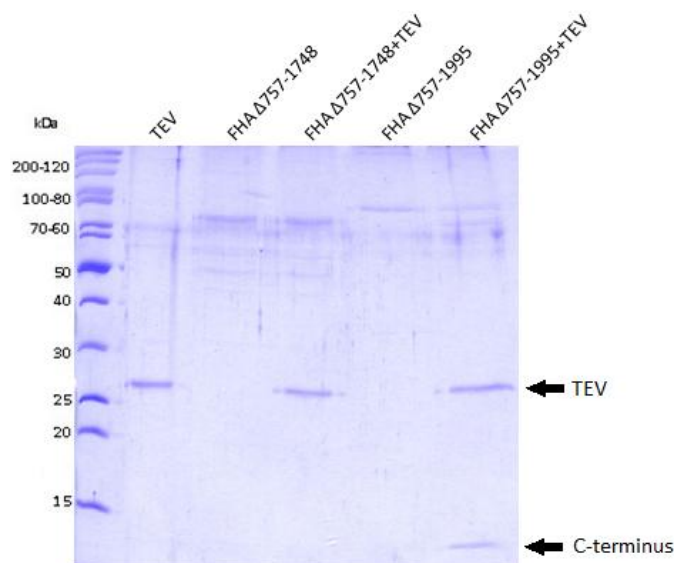


Obr. 6.6. Schematicky náčrtek delečních variant FHA s vloženou sekvencí místa, které rozeznává TEV proteáza

Mutované kmeny byly opět vytvořeny pomocí homologní rekombinace a oba modifikované FHA proteiny byly purifikovány z bakteriálního supernatantu pomocí afinitní chromatografie na Cellufine sulfátu (Obr. 6.7). K proteinům byla přidána TEV proteáza, štěpení probíhalo 18 hodin při 4°C a proteiny byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 6.8).

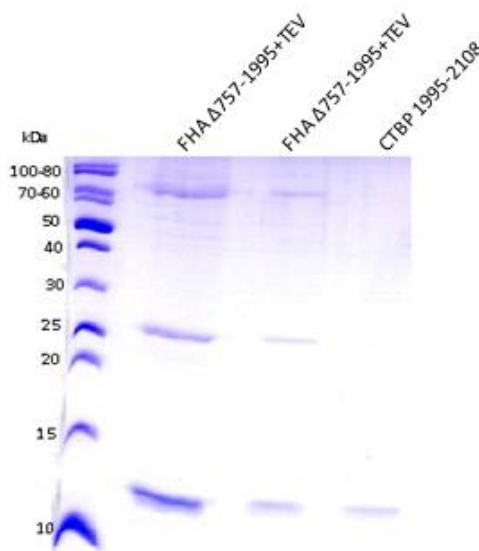


Obr. 6.7. Purifikace proteinu FHAΔ757-1748 a FHA Δ757-1995 na Cellufine sulfátu



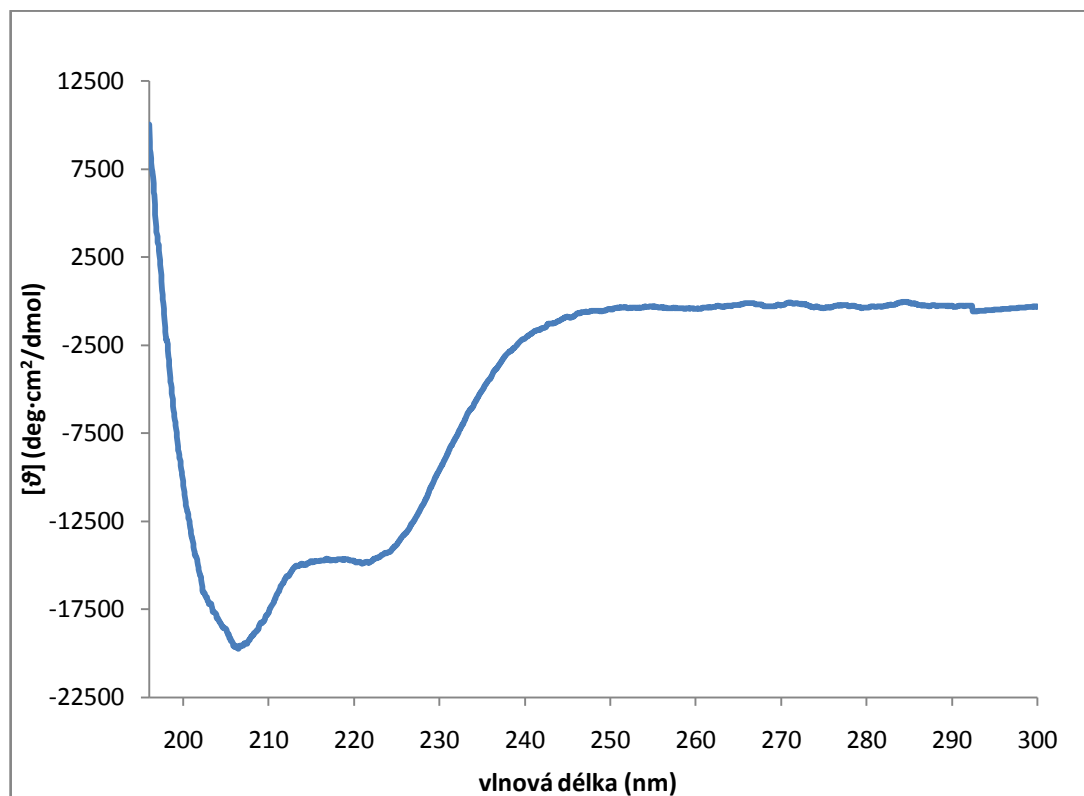
Obr. 6.8. Analýza proteinu FHAΔ757-1748 a FHA Δ757-1995 na polyakrylamidovém gelu a jejich štěpení pomocí TEV proteázy

Jak je znázorněno na Obr. 6.8, u proteinu FHAΔ757-1748 nedocházelo ke štěpení TEV proteázou. Oproti tomu FHAΔ757-1995protein byl štěpen velmi efektivně, za vzniku fragmentu o velikosti 13 kDa. Díky velkému rozdílu isoelektrických bodů N-koncové ($pI=10$) a C-koncové části FHAΔ757-1995proteinu ($pI=5,4$), byl C-koncový segment separován ze směsi pomocí silného kationtového měniče SP sefarázy (sulfo-propyl). N-koncový fragment byl společně s TEV proteázou návázán na matrici, zatímco nenavázaná frakce obsahovala C-koncový fragment o velikosti 13 kDa (Obr. 6.9).



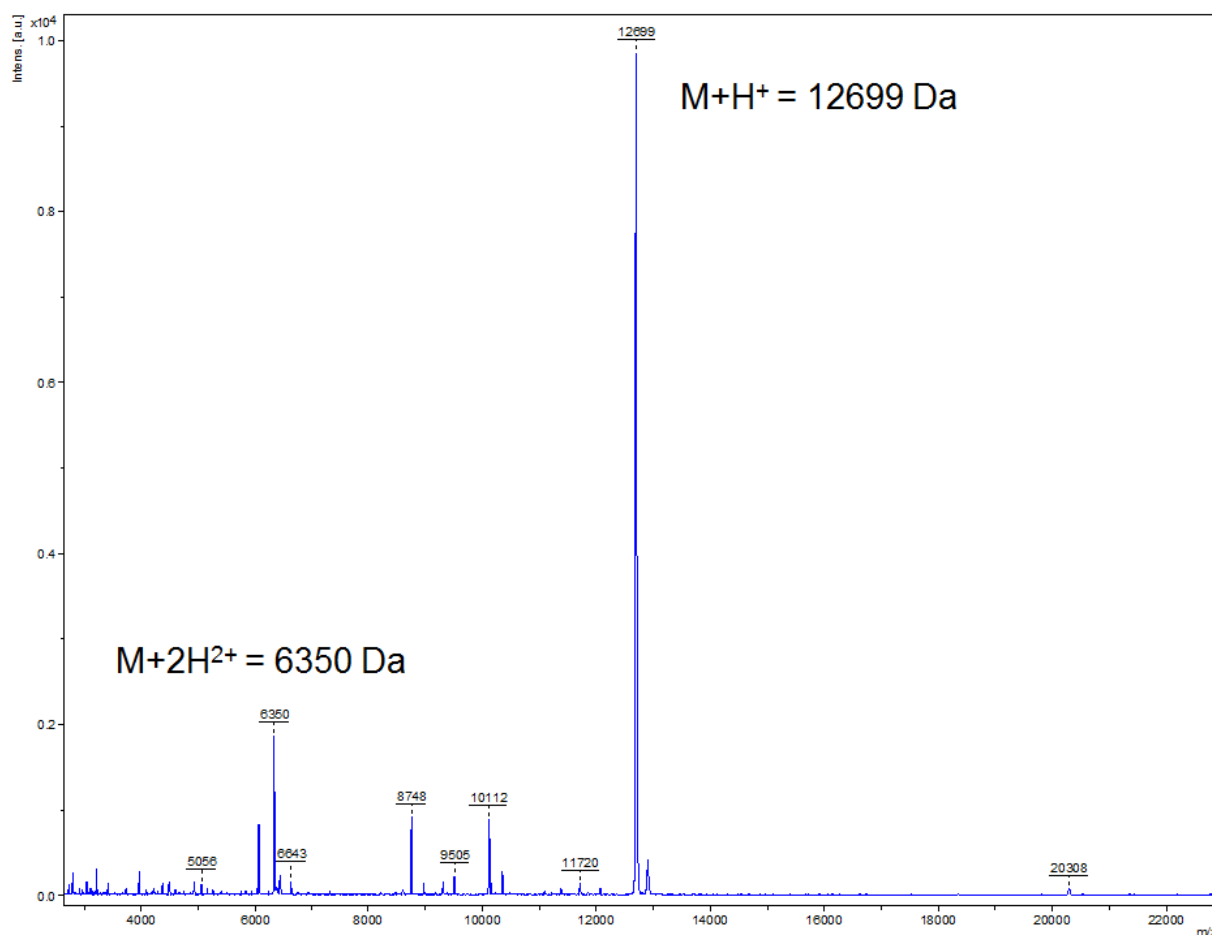
Obr. 6.9. Purifikace CTBP 1995-2108 na kationtovém měniči (SP sefaráza). Směs proteinů byla nanášena na SP sefáru a nenavázaná frakce obsahovala C-koncový fragment CTBP 1995-2108.

C-koncový segment FHA (CTBP 1995-2108) byl zakoncentrován na 0,6 mg/ml a analyzován pomocí cirkulárně dichroické spektroskopie (CD) ve spolupráci s Tatsianou Charnavets, Ph.D. (Biocev, Vestec).



Obr. 6.10. CD spektrum proteinu FHA CTBP 1995-2108. Protein byl naředěn na 0,2 mg/ml a jeho CD spektrum bylo měřeno v rozmezí od 190 do 300 nm.

CD spektroskopie je metoda schopná určit sekundární strukturu na základě rozdílu v absorpci levo- a pravotočivého kruhově polarizovaného světla. Alfa-šroubovicové proteiny mají ve spektru negativní pásy kolem 208 a 222 nm a pozitivní pás u 193 nm. Proteiny s definovanými antiparalelními beta-otáčkami mají negativní pás při 218 nm, pozitivní při 195 nm a nestrukturované molekuly mají velký negativní pás okolo 195 nm. Jak je patrné z Obr. 6.10, CD spektrum proteinu CTBP 1995-2108 bylo charakteristické dvěma negativní pásy u 208 a 222nm, což naznačovalo přítomnost alfa-šroubovicové struktury v CTBP 1995-2108 proteinu.

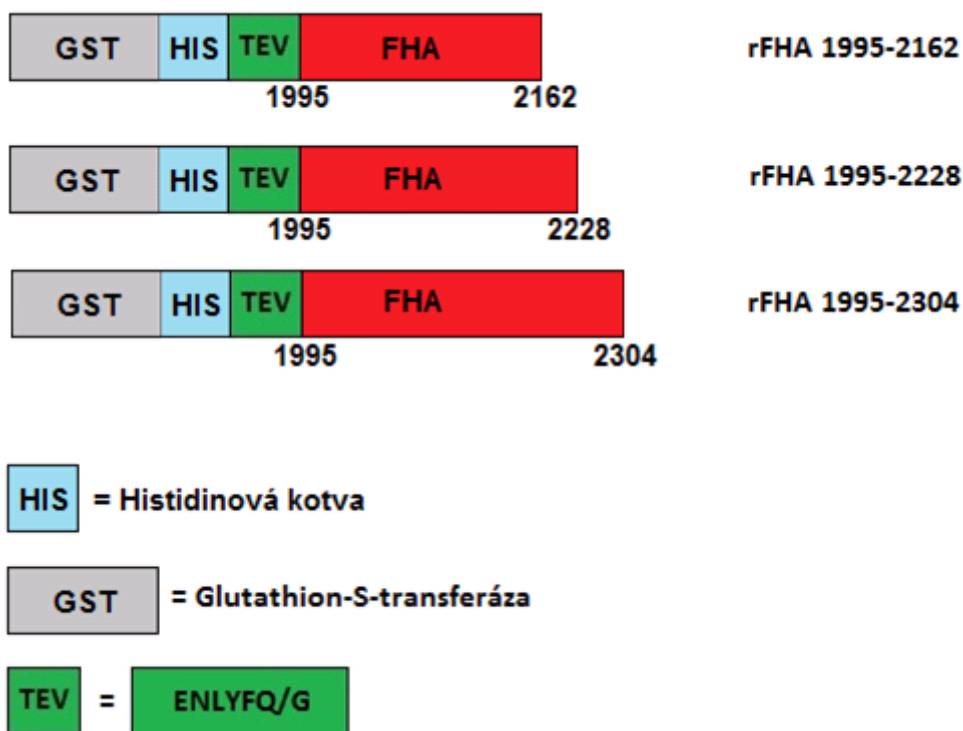


Obr. 6.11. Nativní hmotnostní spektrum proteinu FHA CTBP 1995-2108. Protein byl odsolen pomocí speciální kolonky a jeho hmotnost byla zjištěna metodou MALDI-TOF.

Ve spolupráci s Petrem Haladou, Ph.D. (Laboratoř charakterizace molekulární struktury MBU, AV ČR) bylo následně změřeno nativní hmotnostní spektrum proteinu CTBP 1995-2108. Předpokládaná velikost proteinu byla 38285 Da, skutečná byla podle hmotnostního spektra (Obr. 6.11) 12699 Da. Z těchto dat vyplývá, že deleční mutant FHA Δ 757-1995 je pravděpodobně během sekrece procesován odlišným způsobem než kompletní protein. Produkce C-koncové části FHA v nativním prostředí není příliš efektivní a proto bylo přistoupeno k rekombinantní produkci v *E.coli*.

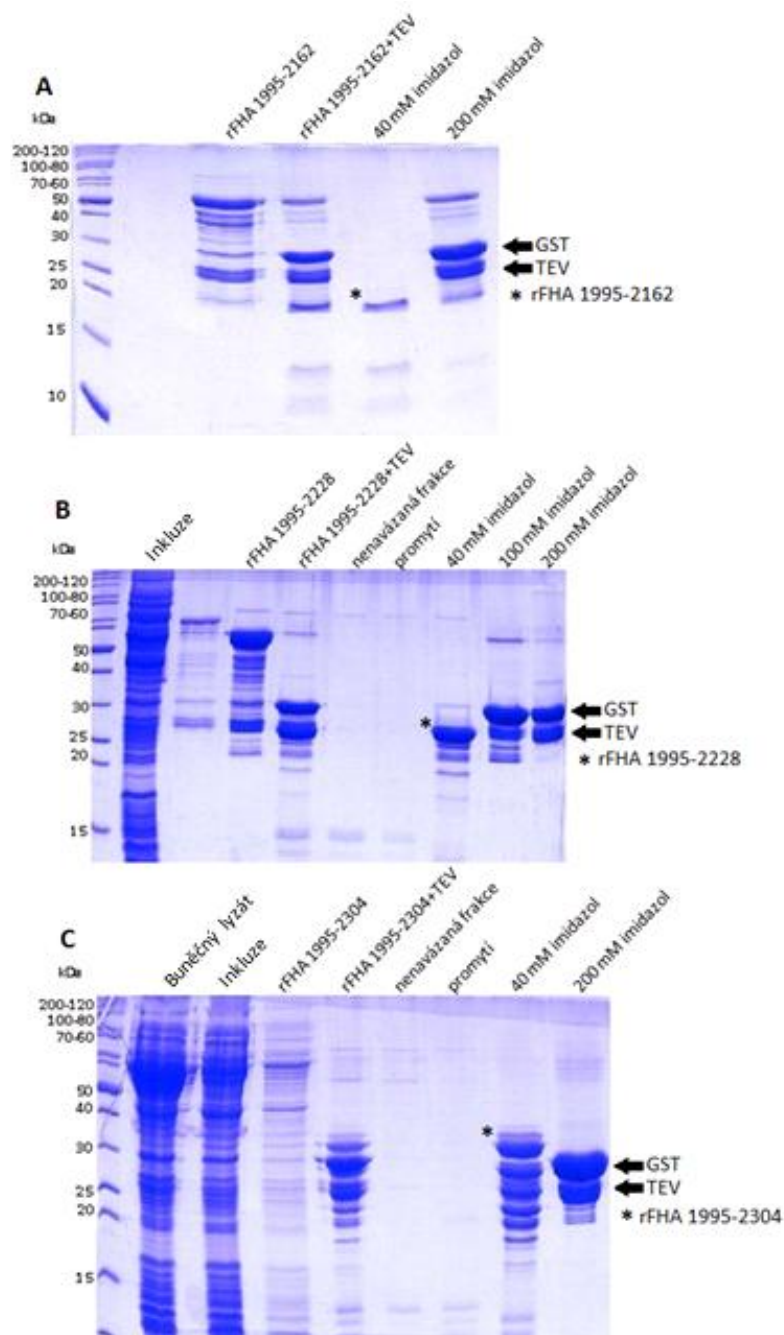
6.3. Strukturní charakterizace rekombinantního C-koncového segmentu FHA z *E.coli*

C-koncové segmenty FHA byly dále produkovány v *E. coli* jako fúzní proteiny obsahující N-koncovou glutathion-S-transferázu s histidinovou kotvou (Obr. 6.12).



Obr. 6.12. Schematický náčrt rekombinantních C-koncových segmentů FHA v *E.coli*

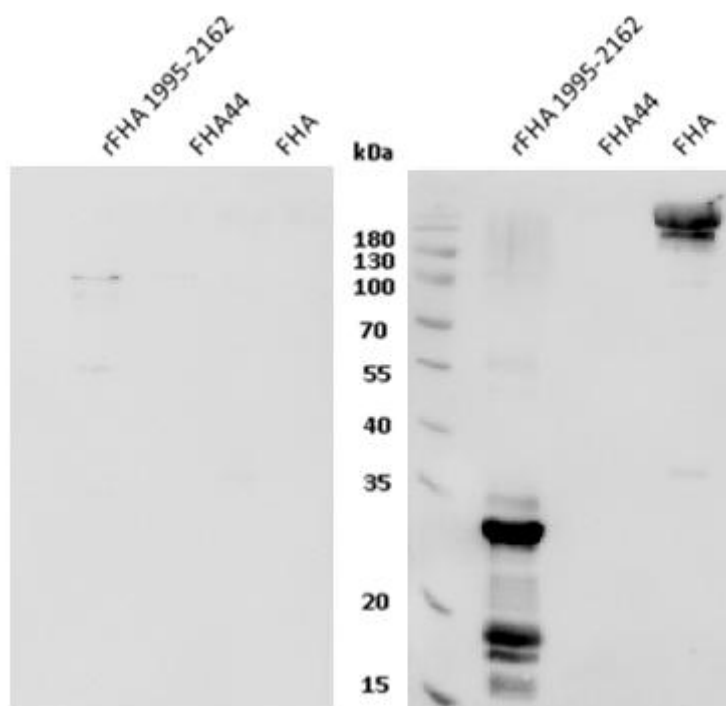
Nukleotidové sekvence odpovídající úsekům FHA 1995-2162, FHA 1995-2228 a FHA 1995-2304 byly amplifikovány pomocí PCR podle primerů v tab. 5.4, štěpeny restričními endonukleázami NcoI a XhoI, a zaligovány do plasmidu *pet42b*. Jednotlivé vektory byly transformovány do *E. coli* BL21 λ (DE3) a kultivovány v LB médiu při 30 °C (Kap 5.5). Produkce rekombinantních proteinů do bakteriálního cytosolu byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Následně byly konstrukty produkovány ve velkém objemu LB média, a GST fúzní proteiny byly z cytosolické frakce purifikovány pomocí afinitní chromatografie na nosiči obsahujícím imobilizovaný glutathion (Glutathione agaróza). Purifikované fúzní proteiny byly přes noc dialyzovány v přítomnosti TEV proteázy a směs proteinů byla následně separována pomocí Ni-NTA sefary. C-koncové segmenty FHA nemající His kotvu byly následně eluovány pomocí 40 mM koncentrace imidazolu (Obr. 6.13).



Obrázek 6.13. Purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie na Ni-NTA sefaroze, A – rFHA 1995-2162, B – rFHA 1995-2228, C – rFHA 1995-2304. C-koncové segmenty byly eluovány 40 mM imidazolem a GST a TEV proteáza se z kolony uvolnily až 200 mM imidazolem.

C-koncový segment rFHA1995-2162 byl použit jako antigen pro vytvoření polyklonálního myšího séra proti C-koncové části FHA. Pro imunizaci bylo použito pět myší a experiment byl prováděn ve spolupráci s Ing. Karolínou Baslerovou (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů, AV ČR). Specificita získaného polyklonálního séra byla testována pomocí imunochemické detekce proteinu na membráně. Proteiny rFHA 1995-2162,

FHA72-862(80-kDa N-koncový segment FHA) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy, přeneseny na membránu a detekovány pomocí polyklonálního séra (Obr. 6.14). Jako kontrolní sérum bylo použito myší polyklonální sérum získané imunizací myší proteinem obsahující části RTX domény proteinu CyaA. Z Obr. 6.14 je patrné, že sérum proti C-konci FHA rozeznává protein rFHA 1995-2162 a FHA, ale nedetekuje N-koncový segment FHA72-862. Na membráně inkubované s kontrolním sérem není vidět žádný specifický signál.

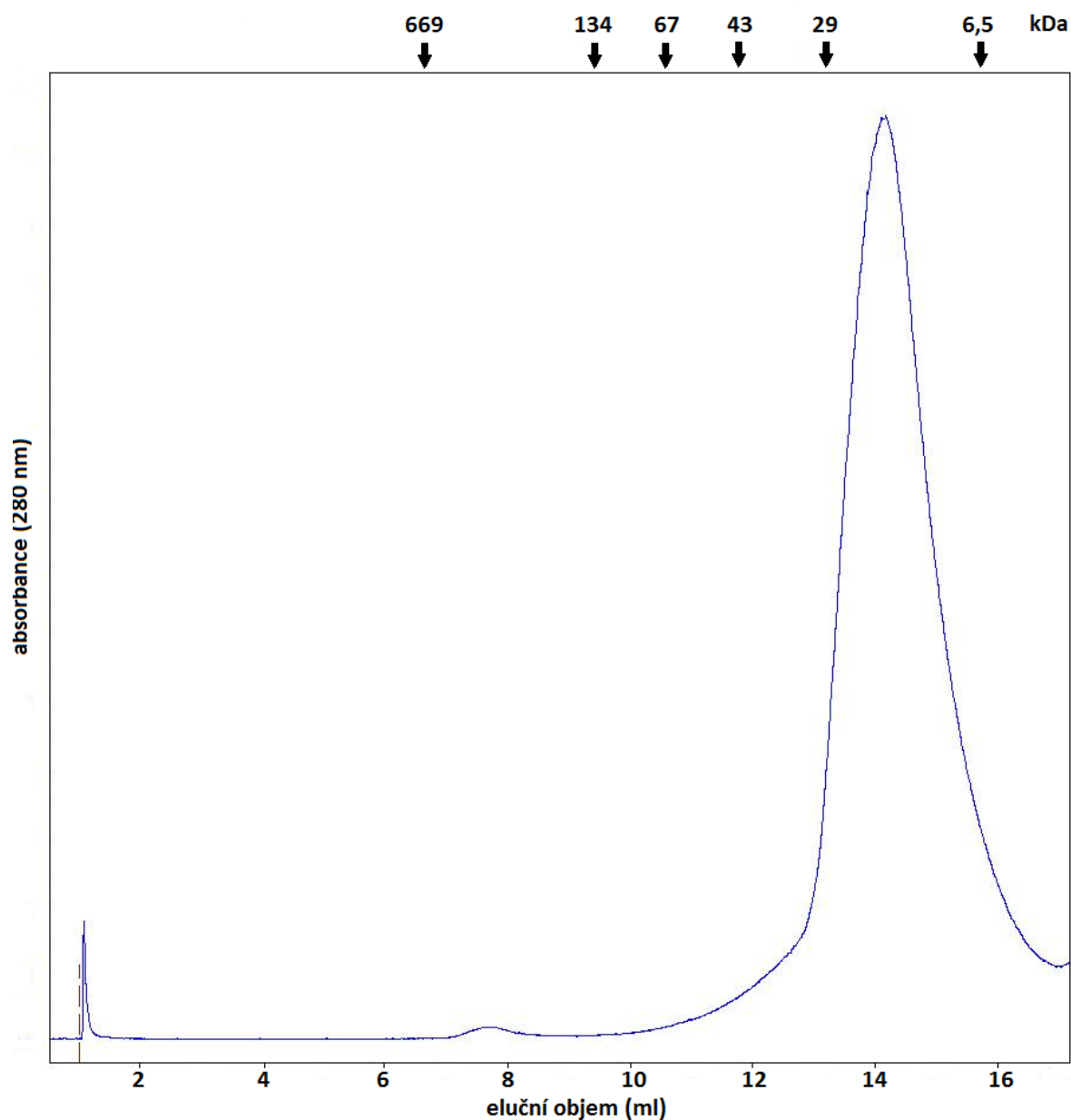


Obrázek 6.14. Imunochemická detekce FHA EC 1995-2162, FHA72 a FHA pomocí myšího polyklonálního séra proti C-koncové části FHA. Proteiny byly separovány pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu, přeneseny na membránu a chemiluminiscenční signál byl detekován CCD kamerou.

Získané polyklonální myší sérum je specifické a lze ho použít pro detekci FHA.

Protein rFHA EC 1995-2228 byl dále použit pro strukturní studie. Nejdříve byl protein přečištěn pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 200 (10/300) (kap. 5.19).

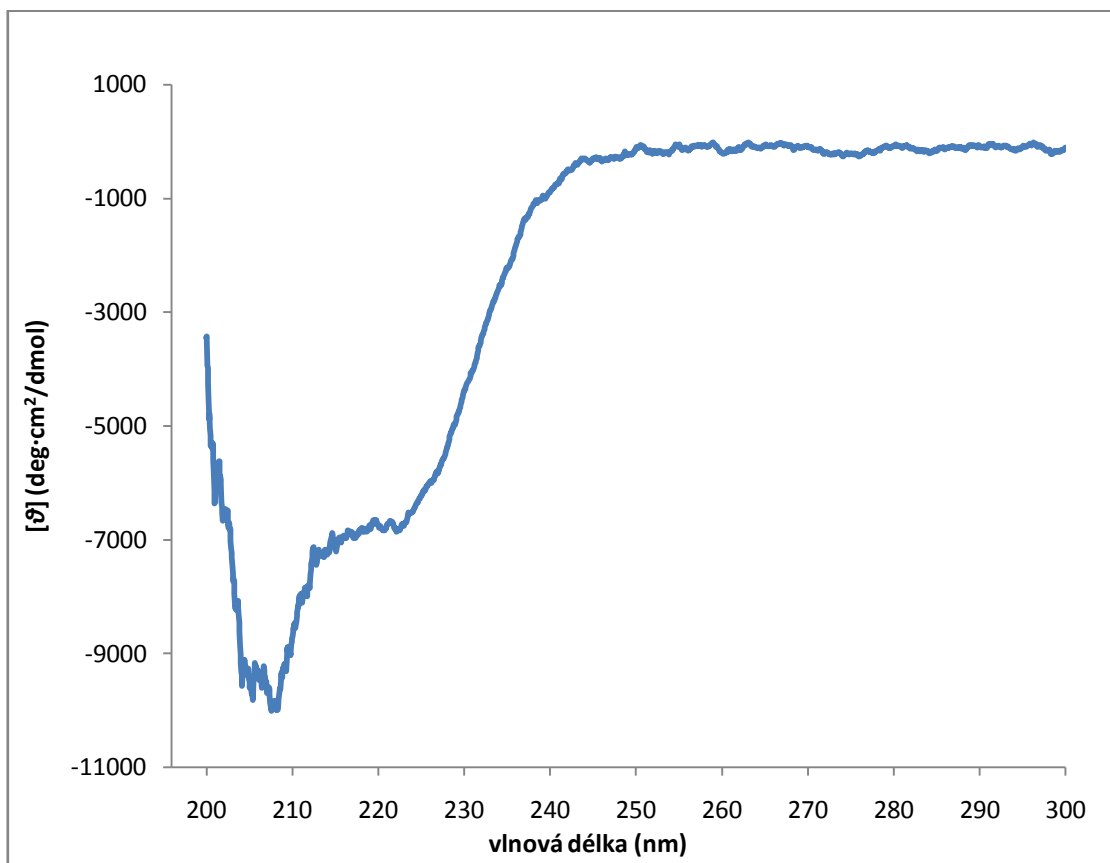
.



Obrázek 6.15. Gelová filtrace proteinu rFHA 1995-2228. Protein byl v pufru (PBS, 150 mM NaCl) navrstven na kolonu Superdex 200 (10/300) a připojen na zařízení AKTA prime. Průtok kolovou byl nastaven na 0,4 ml/min a v průběhu byla měřena absorbance při 280 nm. Kalibrace kolony je zobrazena šípkami; thyroglobulin (669 kDa), bovinní serový albumin (134 a 67 kDa), ovalbumin (43 kDa), anhydráza kyseliny uhličitě (29 kDa) a aprotinin (6,5 kDa)

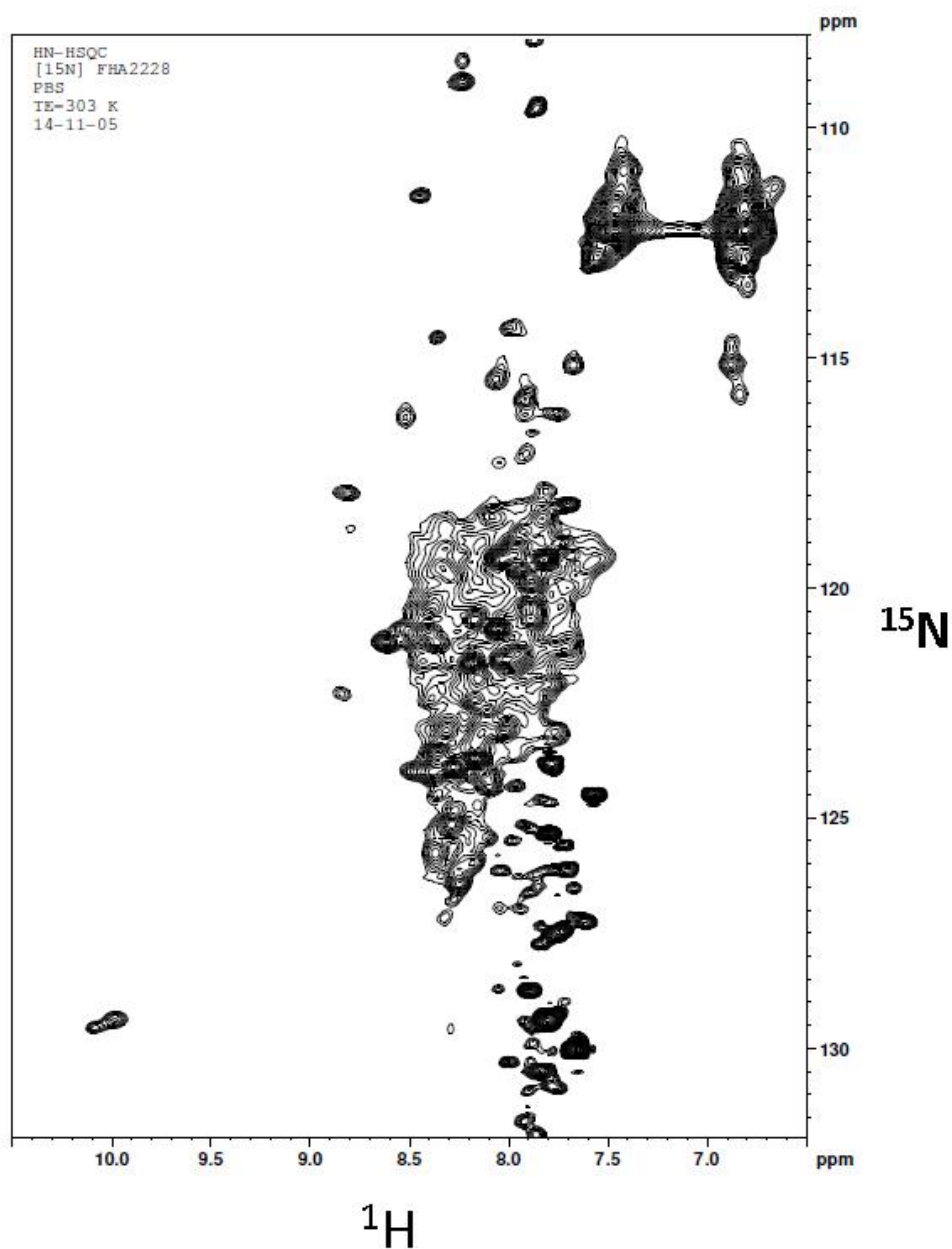
Eluční profil na Obr. 6.15 ukazuje, že rFHA EC 1995-2228 má jediný vrchol ve 14 minutě, což odpovídalo proteinu s molekulovou hmotností přibližně 25 kDa. Tato hmotnost koresponduje s molekulovou hmotností rFHA1995-2228, z čehož vyplývá, že tento protein se v roztoku nachází jako monomer. Rekombinantní C-koncový fragment FHA byl během gelové filtrace dočištěn od nízkomolekulárních kontaminant a následně analyzován

pomocí CD spektroskopie ve spolupráci s Lucií Bednárovou, Ph.D. (Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR).



Obrázek 6.16. CD spektrum proteinu rFHA 1995-2228. Protein byl naředěn na 0,2 mg/ml, aplikován do 1mm kyvety a jeho CD spektrum bylo měřeno v rozmezí 190-300 nm.

Jak je zřejmé na Obr. 6.16, rFHA 1995-2228 má v CD spektru dva negativní pásy u 208 nm a 222 nm, jež jsou typická pro alfa-šroubovicé struktury. Protein rFHA 1995-2228 byl zakoncentrován na 9 mg/ml a podroben krystalizačním pokusům. Pro tento účel byly využity komerční sady JCSG I-IV, Midas a Morpheus. Bohužel nebyly nalezeny podmínky, ve kterých by protein tvořil krystaly. Jelikož nebyla krystalizace úspěšná, pokusili jsme se o charakterizaci pomocí nukleární magnetické resonance. Protein rFHA 1995-2228 byl produkován v minimálním médiu (M9, Kap. 4.3) obsahujícím $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, jako jediný zdroj dusíku. Značený protein byl přečištěn pomocí dvou afinitní chromatografií a gelové filtrace, zakoncentrován na 7 mg/ml a analyzován pomocí nukleární magnetické resonance (NMR) ve spolupráci s Josefem Chmelíkem, Ph.D (Laboratoř charakterizace molekulární struktury, AV ČR).

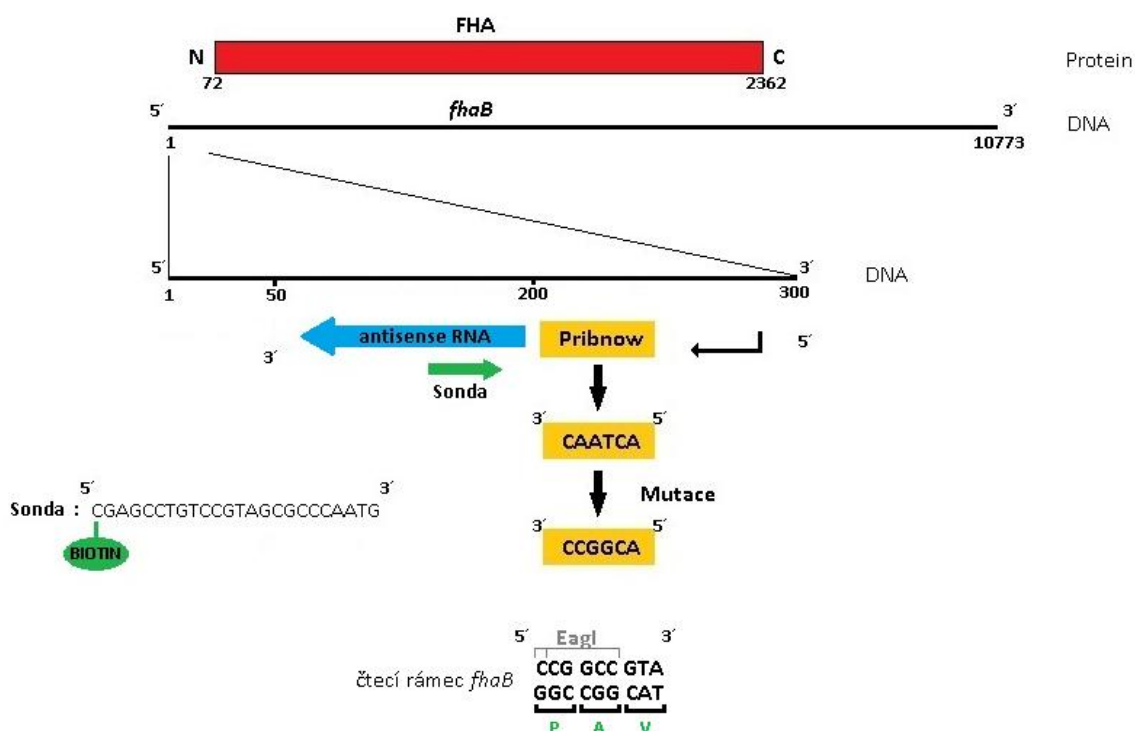


Obrázek 6.17. ^1H - ^{15}N 2D HSQC NMR spektrum značeného proteinu rFHA 1995-2228. HSQC spektrum bylo měřeno na přístroji Bruker Avance III 700 MHz

Jak je patrné z Obr. 6.17, v rámci 2-D NMR spektra je disperze chemických posunů lokalizována především mezi 7,5 - 8,5 ppm, což naznačuje, že rFHA1995-2228 protein se chová jako nesbalený protein postrádající definovanou terciární strukturu.

6.4. Post-transkripční regulace exprese FHA

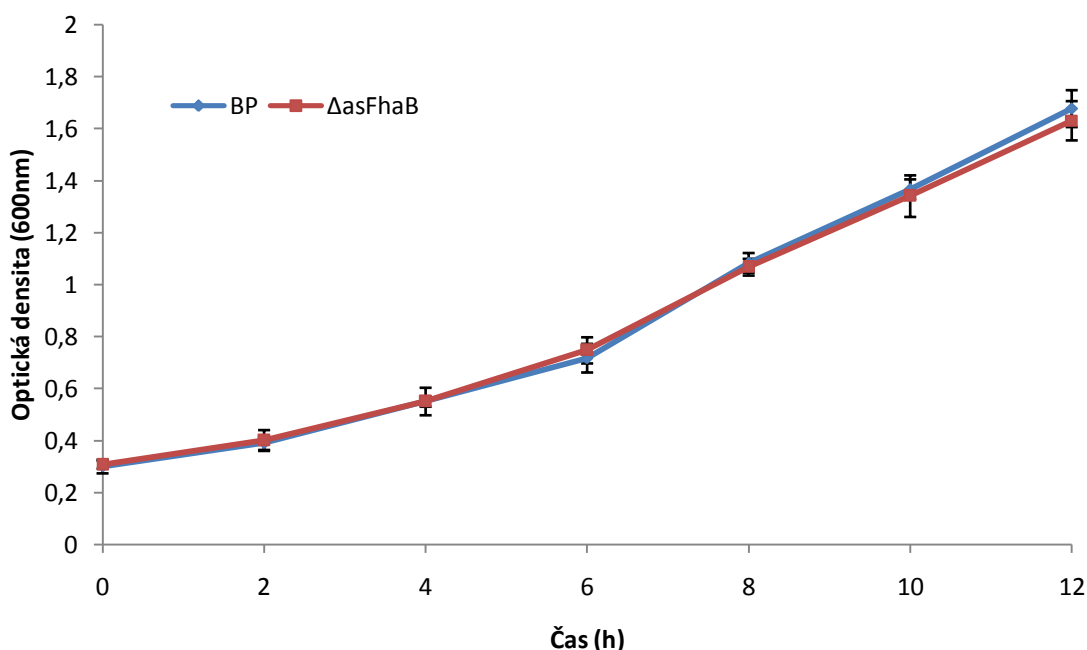
Expresse FHA je striktně regulována dvou komponentovým systémem BvgAS (Kap. 3.2). Nicméně, za posledních 15 let se ale našla velká řada regulačních RNA, které se také významně podílí na regulaci genové exprese[69][71][72]. Pomocí RNA sekvenace byla identifikována malá antisense RNA (asRNA), která se páruje s úsekem na 5'konci genu *fhaB* (nepublikovaná data, D.Hot a kolektiv, Lille, Francie).



Obrázek 6.18. Schematický náčrt organizace 5' konce *fhaB* a jeho sRNA s vyznačenou DNA sondou a mutací v Pribnowově boxu s vloženým restrikčním místem EagI.

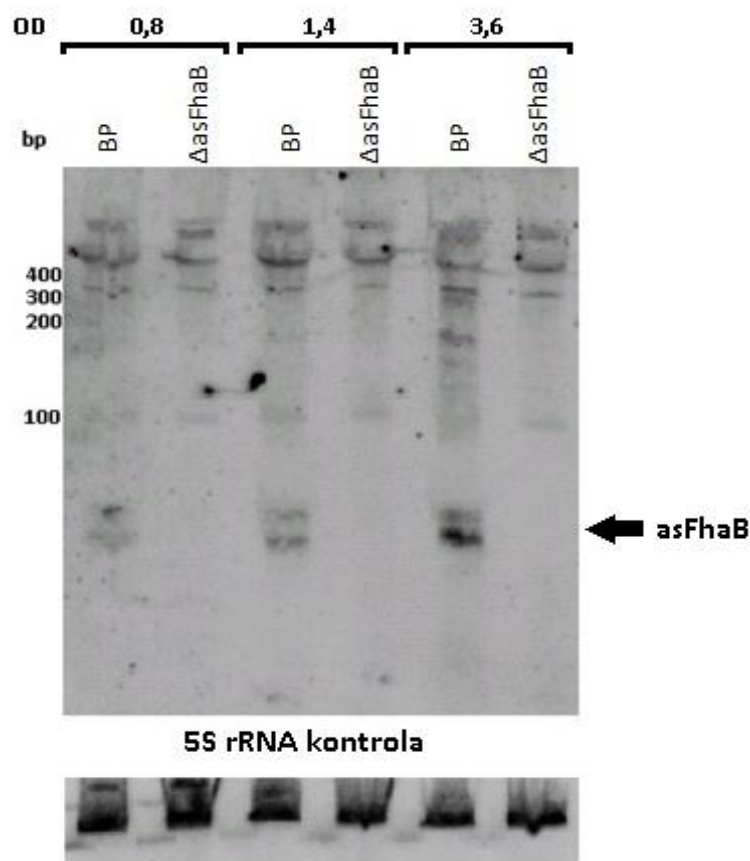
V této práci jsme se pokusili prokázat přítomnost této malé RNA a případně zjistit její roli na regulaci *fhaB* genu. Vzhledem k tomu, že se jedná o cis-sRNA, která je součástí *fhaB* genu, nebylo možné provést její delecí bez ztráty daného úseku genu. Nicméně bylo možné zasáhnout do jejího promotoru. Prokaryotický promotor obsahuje dvě důležité regulační oblasti. První je „-35“ (35 nukleotidů od „+1“, začátku transkripce), a druhá „-10“ (10 nukleotidů od začátku transkripce). -10 oblast se označuje také jako Pribnowův box a je to vazebné místo sigma podjednotky RNA polymerázy během iniciace transkripce. Právě do této oblasti byla vnesena mutace, která brání vazbě RNA polymerázy a inhibuje tak transkripci antisense RNA (Obr. 6.18). V sekvenci Pribnowova boxu byla substituována

většina párů A-T za G-C čímž došlo také k záměně leucinu (AAT) za alanin (CGG)(Obr. 6.18). Pro identifikaci mutantního kmene, bylo do sekvence Pribnowa boxu zaneseno restriční místo pro endonukleázu EagI. Kmen *B.pertussis* Δ asFhaB byl vytvořen pomocí homologní rekombinace podle schématu na Obr. 5.15, Kap. 5.15 způsobem, který byl popsán v kapitole 6.2. Vytvořený kmen (Δ asFhaB) byl ověřen sekvenací a společně s divokým typem (BP) pěstován v SS médiu. Růstová křivka obou kmenů je uvedena na Obr. 6.21.



Obr. 6.21. Růstová křivka divokého (BP) a mutantního (Δ asFhaB) kmene *B.pertussis*. Každé 2 hodiny byla měřena absorbance kultury při 600nm.

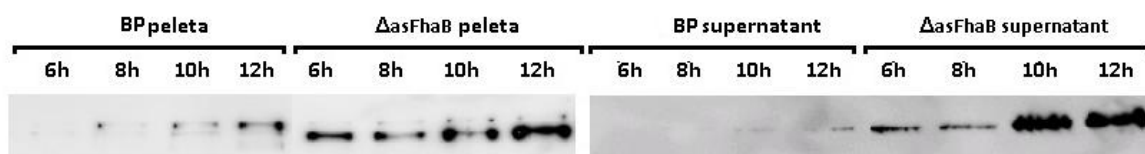
Jak je zřejmé z Obr. 6.21, mutace promotorové oblasti malé RNA nemá vliv na růst bakterie. Celková RNA z exponenciálních a stacionární fáze byla izolována podle Kap. 5.17. a využita k detekci malé RNA metodou Northern blot (Kap. 5.18.). Celková RNA divokého a mutantního kmene byla nejdříve rozdělena pomocí elektroforézy na 10% redukujícím polyakrylamidovém gelu a přenesena na membránu. RNA byla hybridizována s DNA sondou biotinylovanou na 5'konci a detekována pomocí konjugátu streptavidin-alkalická fosfatáza (Obr. 6.19).



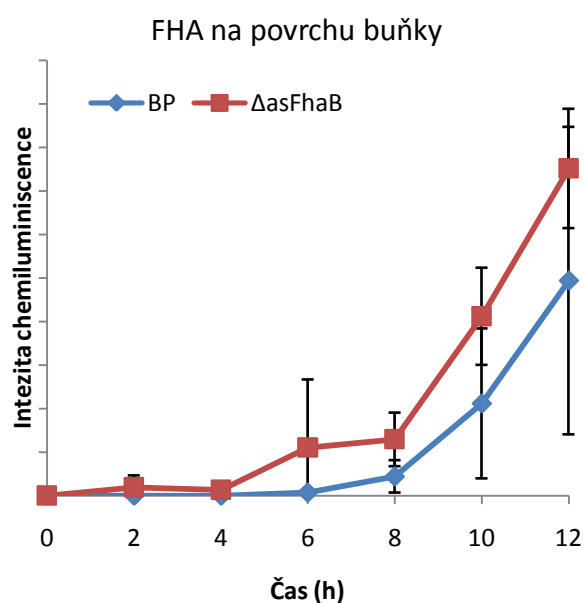
Obr. 6.19. Specifická detekce antisense RNA (asFhaB) z celkové RNA purifikované z divokého kmene *B. pertussis* (BP) a mutantu (Δ asFhaB). Celková RNA byla rozdělena na redukujícím polyakrylamidovém gelu, přenesena na membránu a hybridizována s biotinilovanou DNA sondou. Po přidání streptavidinu, konjugovaného s alkalickou fosfatázou, a jejího substrátu byla RNA detekována pomocí chemiluminiscenčního signálu.

Jak je patrné z Obr. 6.19, sonda rozpoznávala signál o velikosti 50 bazí u divokého kmene bakterie. Naproti tomu, u mutantního kmene *B. pertussis* (Δ asFhaB), proužek o velikosti 50 bazí nebyl detekován, což potvrzuje přítomnost malé RNA u divokého kmene a potlačení její transkripce u kmene s modifikovaným RNA promotorem. Úloha této malé RNA byla sledována pomocí sekrece FHA v mutantním a divokém kmeni po dobu 12 hodin. Každé 2 hodiny byl odebrán 200- μ l alikvot z bakteriálních kultur a jednotlivé vzorky pelet a supernatantů byly analyzovány na přítomnost FHA pomocí specifické imunodetekce na membráně (Obr. 6.20A).

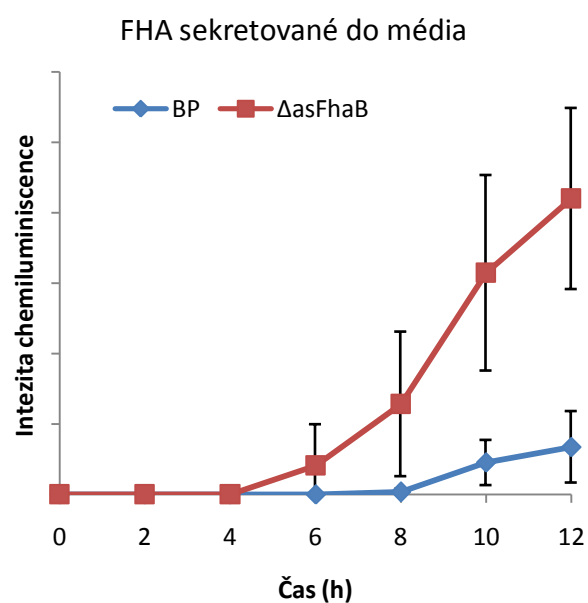
A



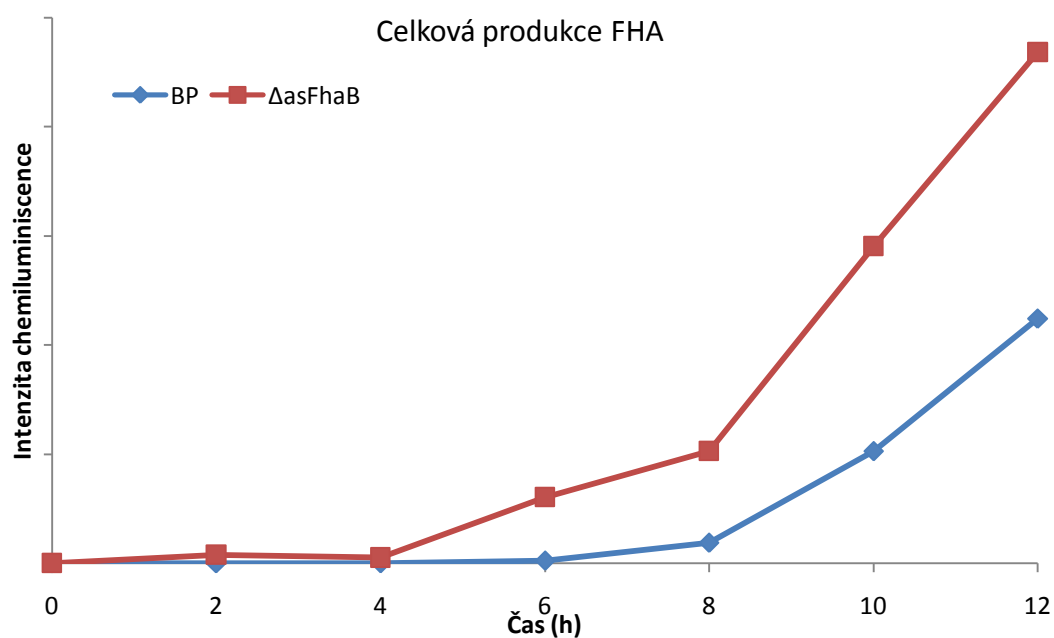
B



C



D



6.20. A-Reprezentativní imunoblot získaný detekcí FHA v peletách a supernatantech divokého a mutantního kmene *B. pertussis*. B – kvantifikace FHA na povrchu buňky, C- kvantifikace FHA sekretovaného do média, D- kvantifikace celkové produkce FHA

Jak je znázorněno na Obr.6.20B, množství FHA na povrchu buněk bylo srovnatelné mezi divokým (BP) a mutovaným kmenem (Δ asFhaB). Nicméně, detailní kvantifikace chemiluminiscenčních signálů ukázala, že množství FHA uvolněného do supernatantu je čtyřikrát větší u mutovaného kmene než u kmene divokého (Obr. 6.20C). Celkové množství FHA, které je dáno aritmetickým součtem FHA v supernatantu a na povrchu buněk ukazuje, že sekrece u mutovaného kmene je přibližně dvakrát větší než u kmene divokého. Z těchto dat vyplývá, že malá RNA párující se s 5'koncem genu *fhaB* výrazně ovlivňuje produkci a sekreci FHA.

7. Diskuze

7.1. Charakterizace rekombinantního C-koncového segmentu FHA

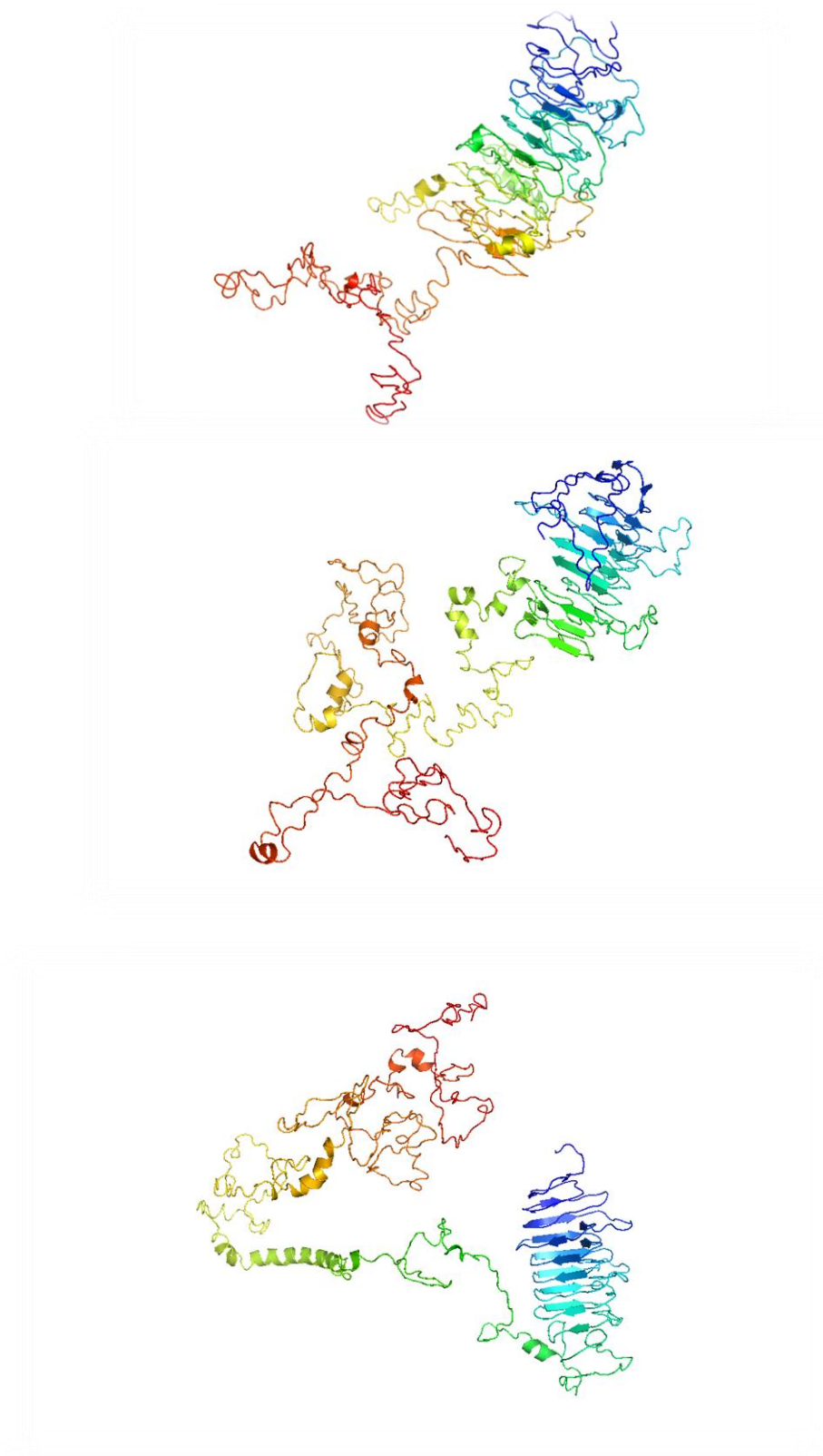
Filamentózníhemagglutinin (FHA) je z buňky sekretován pomocí "two-partner secretion" (TPS)[74]. Prekurzor FHA je nejdříve veden pomocí Sec systému přes vnitřní cytoplazmatickou membránu do periplasmy, kde rozeznává partnerský protein FhaC, který umožňuje transport FHA do extracelulárního prostředí [75][76]. Během sekrece je C-koncová prodoména FHA proteolyticky odštěpena a pravděpodobně degradována v periplasmě. Štěpení FHA provádí primárně serinová proteáza SphB1 a při procesování na povrchu buňky jsou do extracelulárního prostředí uvolňovány proteiny s molekulovou hmotností 220 a 230 kDa [65]. FHA může být ale procesováno i odlišným způsobem. U kmene *B.pertussis* s delecí genu kódujícího SphB1 proteázu dochází ke snížení sekrece FHA do extracelulárního prostoru a v bakteriálním médiu je možné detekovat protein s vyšší molekulovou hmotností (FHA^+), než u divokého kmene. Proteiny FHA a FHA^+ byly purifikovány z bakteriálního supernatantu a analyzovány pomocí nativní hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) [68]. Molekulová hmotnost FHA byla určena jako $232\,760 \pm 558$ Da a hmotnost FHA^+ jako $246\,954 \pm 386$ Da. Coutte a kol. [68] tak zjistili, že FHA sekretované v SphB1-deficientním kmeni a divokém kmeni je během sekrece štěpeno v odlišných pozicích prekurzoru. V této práci byly identifikovány C-koncové aminokyseliny FHA a jeho degradačního produktu FHA^* odlišným přístupem. FHA bylo purifikováno z bakteriálního supernatantu pomocí afinitní chromatografie na Cellufine sulfátu a získaná směs proteinů FHA a FHA^* byla rozdělena pomocí elektroforézy na 5% polyakrylamidovém gelu. Proteiny byly izolovány a štěpeny čtyřmi proteázami (Clostripain, Trypsin, Asp-N, Lys-C) pro co nejvyšší pokrytí sekvence proteinů. Jednotlivé peptidy byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie a ze získaných dat byly sestaveny peptidové mapy FHA a FHA^* . Porovnáním obou map bylo identifikováno několik peptidů, které byly unikátní pro FHA a chyběly v mapě FHA^* . V MS analýze peptidových (Obr 6.2, str. 54) byl nalezen peptid RLDIDDALA získaný štěpením Lys-C proteázou, což je enzym štěpící peptidové řetězce za každým lysinem. Jelikož sekvence RLDIADDALA nepokračuje lysinem ale alaninem, poslední aminokyselina tohoto peptidu, alanin²²²⁸, je také C-koncovou aminokyselinou FHA^* . Poslední C-koncový peptid FHA byl získán pomocí Asp-N proteázy

a identifikován jako DAAQGLEVSGRRNAQVA. C-koncová aminokyselina FHA tak byla určena na základě získaných dat jako alanin2304 (Obr. 6.2, str. 54). Coutte a kol. [68] použili pro identifikaci C-koncového segmentu FHA a FHA⁰ nativní hmotnostní spektrometrii, která poskytuje informaci o celkové hmotnosti měřeného proteinu. Analýza velkých proteinů (>100kDa) může být ale problematická a měření je zatíženo velkou chybou. Oproti tomu měření hmotnostních spekter jednotlivých peptidů, získaných štěpením proteinu, poskytuje velmi přesná data. Vlivem různých fyzikálních vlastností jednotlivých aminokyselin může ale docházet k nerovnoměrné ionizaci peptidů a výsledné pokrytí proteinu tak nemusí být stoprocentní. C-koncová pozice štěpení prekursoru FHA byla v této práci určena jako alanin2304, což je o 58 aminokyselin méně, než bylo určeno v předchozí studii [68].

Celková struktura FHA nebyla prozatím objasněna. Je ale velmi pravděpodobné že většina proteinu je složena z repetitivních komplexní beta-struktury. Tento model byl odvozen na základě trojrozměrné struktury 30-kDa N-koncové části FHA, která byla charakterizována pomocí rentgenové krystalografie [60]. V poslední době je ale kladen velký důraz na získání informace o struktuře C-koncové MCD domény FHA, která se ukázala jako esenciální pro vazbu *B.pertussis* na buňky plicního epitelu. Jelikož je FHA skládáno kooperativně od N k C-konci během translokace přes vnější cytoplazmatickou membránu, pro zachování vhodné konformace sekretovaného proteinu je klíčová jeho N-koncová část. Pro získání C-koncového segmentu FHA tak bylo v této práci vytvořeno několik mutantních kmenů *B.pertussis* které měli v různých pozicích C-koncové části FHA (1744, 1862, 1870, 1995) vloženou sekvenci ENLYFQ/G, kterou rozeznává a štěpí TEV proteáza. Jednotlivé varianty FHA byly purifikovány a následně štěpeny TEV proteázou. Bohužel bylo štěpení proteinu velmi neefektivní (Obr. 6.5, str. 57) a nebylo kvantitativní ani v přítomnosti 3M močoviny, která by měla strukturu proteinu alespoň částečně rozvolnit. Mazar a Cotter[65] vytvořili mutantní kmen *B.pertussis*, který měl na 5'konci genu pro TPS doménu vloženou sekvenci kódující His-kotvu a před MCD doménou v pozici 1870 sekvenci kódující aminokyseliny ENLYFQ/G, které rozeznává a štěpí TEV proteáza. Stejně jako v této práci byly po štěpení proteázou výtěžky C-konce FHA velmi nízké. Je to pravděpodobně způsobeno sterickým bráněním štěpného místa vlivem ucelené struktury

FHA. Pro získání C-koncového segmentu tak byly vytvořeny mutanty *B.pertussis* produkující modifikovanou verzi FHA s delecí ve střední části proteinu. Deleční mutanty FHA obsahovali N-koncovou heparin-vazebnou doménu nutnou pro purifikaci proteinu následovanou sekvencí ENLYFQ/G a C-koncovou částí proteinu. Ačkoliv byla produkce mutantního FHA téměř 10krát nižší než u divokého kmene, štěpení proteinu FHA Δ 757-1995 TEV proteásou bylo velmi účinné s vysokými výtěžky C-koncového segmentu CTBP 1995-2108. Analýza zmíněného segmentu FHA pomocí chirálního dichroismu ukázala, že je C-koncová část proteinu alfa-helikální. Nicméně, nativní hmotnostní spektrum ukázalo, že protein měl skutečnou hmotu 12699 Da oproti předpokládané 38285 Da (Obr. 6.11, str.61). U delečního mutantu tak pravděpodobně dochází k procesování v odlišném místě než u kompletního proteinu. Pro získání velkého množství proteinu pro strukturní studie bylo přistoupeno k rekombinantní produkci v *E.coli*. C-koncový segment FHA byl produkován jako fúzní protein obsahující glutathion-S-transferázu s histidinovou kotvou na N-konci připojenou přes TEV místo na C-koncový segment FHA. Protein rFHA 1995-2228 byl purifikován z cytosolické frakce a charakterizován pomocí cirkulárního dichroismu. Rekombinantní C-koncová část FHA měla podle naměřených dat alfa-helikální strukturu. Protein byl také produkován v minimálním médiu v přítomnosti $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a studován pomocí nukleární magnetické resonance. Jak je ale vidět z ^1H - ^{15}N 2D HSQC spektra (Obr. 6.17, str. 67), disperze ^1H chemických posunů se pohybuje mezi 7,5-8,5 ppm, což odpovídá nestrukturovanému proteinu. C-koncová segment FHA tak nemá definovanou terciární strukturu a je pravděpodobně vnitřně rozvolněn. Data získaná v této práci jsou v rozporu s dosavadní představou, že je MCD kompaktní globulární doména[60][62].

Představu o struktuře C-koncového segmentu FHA lze získat také pomocí počítačového modelování. Pro predikci C-koncové části FHA byl vybrán on-line server I-TASSER (Michigan, USA), pomocí kterého byla navržena sekundární a 3D struktura proteinu. Tento server predikuje strukturu proteinu na základě porovnání míry sekvenční homologie se známými proteinovými strukturami. Pro modelaci byla použita C-koncová část FHA 1700-2362 (Obr.7.1).



Obr. 7.1. Navržené trojrozměrné struktury C-koncového segmentu FHA získané počítačovým modelováním na severu I-TASSER. N-konec proteinu je v modré barvě, C-konec proteinu v červené (duhové zbarvení)

U navržených modely tvoří N-koncová část proteinu (Obr.7.1 modrá, str. 73) kompaktní celek z beta-otáček, který od pozice 1995 směrem k C-koncové části FHA (Obr. 7.1 červená, str. 73) postupně přechází do regionu s alfa-helixy a nestrukturovanými úseky. Navržené modely velmi dobře korelují s daty, získanými měřením chirálního dichroismu proteinů FHA CTBP 1995-2108 (Obr.6.10, str..59) a rFHA 1995-2228(6.16, str.65) a také s ^1H - ^{15}N 2D spektrem značeného proteinu rFHA 1995-2228. Ze získaných dat vyplývá, že je C-konec FHA z větší části nestrukturovaný s alfa-šroubovicovými regiony.

7.2. Post-transkripční regulace exprese FHA

Malé RNA (sRNA) jsou klíčovými komponenty regulačních kaskád, které koordinují produkci virulentních faktorů mnoha patogeních bakterií [77]. Velká řada regulačních sRNA byla v poslední době nalezena například u *Pseudomonas aeruginosa* [78], *Vibrio anguillarum* [70], *Staphylococcus aureus* [79] nebo *Listeria monocytogenes* [80]. Ačkoliv je sekrece FHA primárně regulována pomocí dvou komponentového BvgAS systému (Kap. 3.2, str. 14) na její regulaci by se mohly také podílet nekódující RNA molekuly. RNA sekvenace ve spolupracující laboratoři D.Hota ve Francii (nepublikovaná data) ukázala, že 5'konec *fhaB* transkriptu je komplementární s malou regulační RNA molekulou (asFhaB). Pro potlačení transkripce asFhaB nemohla být provedena její delece, jelikož by tím byl ovlivněn i gen, který je přepisován na FHA. Transkripce této malé RNA byla potlačena mutací v oblasti jejího promotoru. V sekvenci Pribnowova boxu (5' ACTAAC 3'), na který se váže sigma podjednotka RNA polymerázy, byla provedena substituce purinových bází za pyrimidinové (5' ACGGCC 3'). Došlo tak ale v místě mutace ke změně leucinu za alanin. Obě aminokyseliny jsou hydrofobní a mají velmi podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. K záměně došlo v N-koncové signální sekvenci mimo úsek nutný pro translokaci přes vnitřní cytoplazmatickou membránu, a mutace by tak neměla mít vliv na sekreci proteinu do extracelulárního prostoru. Z Obr. 6.19, str. 70 je vidět, že byla transkripce malé RNA v mutantním kmeni *B.pertussis* Δ asFhaB skutečně potlačena. Jak je vidět z růstové křivky (Obr. 6.21, str. 69) mutace neměla vliv na růst bakterie a vliv asFhaB na sekreci FHA u divokého a mutantního kmene byly pozorovány po dobu 12ti hodin. Celková sekrece FHA u mutantního kmene Δ asFhaB byla dvakrát vyšší, než v divokém kmeni (Obr. 6.19, str. 71)

Z výsledků vyplývá, že potlačení transkripce *asFhaB* RNA vede ke zvýšení sekrece FHA a malá antisense RNA tak negativně reguluje produkci FHA.

8. Závěr

V rámci předkládané diplomové práce byla identifikována C-koncová aminokyselina degradačního produktu filamentózního hemaglutininu (FHA*) jako alanin v pozici 2228. C-koncový segment FHA z *Bordetelli pertussis*, CTBP 1995-2108, byl charakterizován pomocí CD spektroskopie a hmotnostní spektrometrie. Obsahuje alfa-šroubovicové struktury a deleční mutant *B.pertussis* FHA Δ 757-1995 je na povrchu buňky procesován odlišným způsobem, než kompletní protein. Dále byl charakterizován rekombinantní C-koncový segment FHA, rFHA 1995-2228, produkováný v *E.coli*. Podle naměřeného CD spektra je protein alfa-šroubovicového charakteru a během gelové filtrace se choval jako dobře rozpustný monomer. Následně bylo vytvořeno polyklonálního myšího sérum proti C-koncové části FHA. Povedlo se také identifikovat malou RNA (*asFhaB*) zaměřující se na 5' konec genu *fhaB*. Mutagenézí vazebného místa sigma faktoru RNA polymerázy pro *asFhaB* se podařilo vytvořit fenotyp *B.pertussis*, se zvýšenou produkcí filamentózního hemaglutininu.

9. Seznam literárních zdrojů

- [1] a C. Rodman, W. L. Bradford, and G. P. Berry, "An epidemiological study of an outbreak of pertussis in a public school.," *Am. J. Public Health Nations. Health*, vol. 36, pp. 1156–1162, 1946.
- [2] U. Heininger, "Update on pertussis in children.," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 8, pp. 163–173, 2010.
- [3] C. D. Paddock, G. N. Sanden, J. D. Cherry, A. A. Gal, C. Langston, K. M. Tatti, K.-H. Wu, C. S. Goldsmith, P. W. Greer, J. L. Montague, M. T. Eliason, R. C. Holman, J. Guarner, W.-J. Shieh, and S. R. Zaki, "Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 47, pp. 328–338, 2008.
- [4] K. M. Bisgard, F. B. Pascual, K. R. Ehresmann, C. A. Miller, C. Cianfrini, C. E. Jennings, C. A. Rebmann, J. Gabel, S. L. Schauer, and S. M. Lett, "Infant pertussis: who was the source?," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 23, pp. 985–989, 2004.
- [5] C. L. Cody, L. J. Baraff, J. D. Cherry, S. M. Marcy, and C. R. Manclark, "Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children.," 1981.
- [6] M. C. Kaczmarek, L. Valenti, H. A. Kelly, R. S. Ware, H. C. Britt, and S. B. Lambert, "Sevenfold rise in likelihood of pertussis test requests in a stable set of australian general practice encounters, 2000-2011," *Med. J. Aust.*, vol. 198, pp. 624–628, 2013.
- [7] E. Chiappini, A. Stival, L. Galli, and M. de Martino, "Pertussis re-emergence in the post-vaccination era.," *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, p. 151, 2013.
- [8] CDC Centers for Disease Control and Prevention in Morbidity and mortality weekly report, "Pertussis epidemic--Washington, 2012.," 2012.
- [9] T. A. Clark, N. E. Messonnier, and S. C. Hadler, "Pertussis control: Time for something new?," *Trends in Microbiology*, vol. 20, pp. 211–213, 2012.
- [10] L. K. Misegades, K. Winter, K. Harriman, J. Talarico, N. E. Messonnier, T. A. Clark, and S. W. Martin, "Association of childhood pertussis with receipt of 5 doses of pertussis vaccine by time since last vaccine dose, California, 2010," *JAMA*, vol. 308, pp. 2126–2132, 2012.
- [11] S. Y. Tartof, M. Lewis, C. Kenyon, K. White, A. Osborn, J. Liko, E. Zell, S. Martin, N. E. Messonnier, T. A. Clark, and T. H. Skoff, "Waning immunity to pertussis following 5 doses of DTaP.," *Pediatrics*, vol. 131, pp. e1047–52, 2013.

- [12] N. P. Klein, J. Bartlett, A. Rowhani-Rahbar, B. Fireman, and R. Baxter, "Waning Protection after Fifth Dose of Acellular Pertussis Vaccine in Children," *New England Journal of Medicine*, vol. 367, pp. 1012–1019, 2012.
- [13] R. Higgs, S. C. Higgins, P. J. Ross, and K. H. G. Mills, "Immunity to the respiratory pathogen *Bordetella pertussis*," *Mucosal Immunology*, vol. 5, pp. 485–500, 2012.
- [14] V. Bouchez, V. Caro, E. Levillain, G. Guigon, and N. Guiso, "Genomic content of *Bordetella pertussis* clinical isolates circulating in areas of intensive children vaccination," *PLoS One*, vol. 3, 2008.
- [15] S. W. Martin, L. Pawloski, M. Williams, K. Weening, C. DeBolt, X. Qin, L. Reynolds, C. Kenyon, G. Giambrone, K. Kudish, L. Miller, D. Selvage, a. Lee, T. H. Skoff, H. Kamiya, P. K. Cassidy, M. L. Tondella, and T. a. Clark, "Pertactin-Negative *Bordetella pertussis* Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 60, pp. 223–227, 2014.
- [16] P. Mastrantonio, P. Spigaglia, H. Van Oirschot, H. G. J. Van Der Heide, K. Heuvelman, P. Stefanelli, and F. R. Mooi, "Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children," *Microbiology*, vol. 145, pp. 2069–2075, 1999.
- [17] V. Bouchez, D. Brun, T. Cantinelli, G. Dore, E. Njamkepo, and N. Guiso, "First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin," *Vaccine*, vol. 27, pp. 6034–6041, 2009.
- [18] M. Wollstein, "THE BORDET-GENGOU BACILLUS OF PERTUSSIS.," *J. Exp. Med.*, vol. 11, pp. 41–54, 1909.
- [19] U. Heininger, K. Stehr, S. Schmitt-Grohé, C. Lorenz, R. Rost, P. D. Christenson, M. Uberall, and J. D. Cherry, "Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 13, pp. 306–309, 1994.
- [20] J. W. Peterson, "Bacterial pathogenesis," in *Medical Microbiology*, 1996.
- [21] B. T. Cookson, P. Vandamme, L. C. Carlson, A. M. Larson, J. V. L. Sheffield, K. Kersters, and D. H. Spach, "Bacteremia caused by a novel *Bordetella* species, 'B. hinzii,'" *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, pp. 2569–2571, 1994.
- [22] M. S. Jackwood MW1, "An Opportunistic Pathogen in Leghorn Chickens.," *Avian Dis.*, vol. 39, pp. 360–7, 1995.
- [23] A. A. Weiss, E. L. Hewlett, G. A. Myers, and S. Falkow, "Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*," *Infect. Immun.*, vol. 42, pp. 33–41, 1983.

- [24] K. B. Decker, T. D. James, S. Stibitz, and D. M. Hinton, "The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA," *Microbiol. (United Kingdom)*, vol. 158, pp. 1665–1676, 2012.
- [25] J. Herrou, C. Bompard, R. Wintjens, E. Dupré, E. Willery, V. Villeret, C. Loch, R. Antoine, and F. Jacob-Dubuisson, "Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 40, pp. 17351–17355, 2010.
- [26] P. E. Boucher, K. Murakami, A. Ishihama, and S. Stibitz, "Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter," *J. Bacteriol.*, vol. 179, pp. 1755–1763, 1997.
- [27] P. E. Stein, A. Boodhoo, G. D. Armstrong, L. D. Heerze, S. A. Cockle, M. H. Klein, and R. J. Read, "Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding.," *Nat. Struct. Biol.*, vol. 1, pp. 591–596, 1994.
- [28] C. Loch, L. Coutte, and N. Mielcarek, "The ins and outs of pertussis toxin," *FEBS Journal*, vol. 278, pp. 4668–4682, 2011.
- [29] B. L. Graf R, Codina J, "Peptide inhibitors of ADP-ribosylation by pertussis toxin are substrates with affinities comparable to those of the trimeric GTP-binding proteins.," *Mol. Pharmacol.*, no. 42, pp. 760–4, 1992.
- [30] S. I. Morse and J. H. Morse, "Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*.," *J. Exp. Med.*, vol. 143, pp. 1483–1502, 1976.
- [31] M. Pittman, "Neurotoxicity of *Bordetella pertussis*.," *Neurotoxicology*, vol. 7, pp. 53–67, 1986.
- [32] N. H. Carbonetti, "Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools.," *Future Microbiol.*, vol. 5, pp. 455–469, 2010.
- [33] I. Linhartová, L. Bumba, J. Mašín, M. Basler, R. Osicka, J. Kamanová, K. Procházková, I. Adkins, J. Hejnová Holubová, L. Sadílková, J. Morová, and P. Šebo, "RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism," *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 34, no. 6, pp. 1076–1112, 2010.
- [34] M. El-Azami-El-Idrissi, C. Bauche, J. Loucka, R. Osicka, P. Sebo, D. Ladant, and C. Leclerc, "Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18. Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 40, pp. 38514–38521, 2003.

- [35] H. Sakamoto, J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant, "Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 19, pp. 13598–13602, 1992.
- [36] P. Guernonprez, N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc, "The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18).," *J. Exp. Med.*, vol. 193, no. 9, pp. 1035–1044, 2001.
- [37] J. Vojtova, J. Kamanova, and P. Sebo, "Bordetella adenylate cyclase toxin: A swift saboteur of host defense," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, no. 1, pp. 69–75, 2006.
- [38] J. Kamanova, O. Kofronova, J. Masin, H. Genth, J. Vojtova, I. Linhartova, O. Benada, I. Just, and P. Sebo, "Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling.," *J. Immunol.*, vol. 181, no. 8, pp. 5587–5597, 2008.
- [39] S. R. Paccani, F. D. Molin, M. Benagiano, D. Ladant, M. M. D'Elis, C. Montecucco, and C. T. Baldari, "Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis," *Infect. Immun.*, vol. 76, no. 7, pp. 2822–2832, 2008.
- [40] Y. Horiguchi, N. Inoue, M. Masuda, T. Kashimoto, J. Katahira, N. Sugimoto, and M. Matsuda, "Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 94, pp. 11623–11626, 1997.
- [41] Y. Horiguchi, T. nakai, and K. Kume, "Effects of Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin on the structure and function of osteoblastic clone MC3T3-E1 cells," *Infect. Immun.*, vol. 59, pp. 1112–1116, 1991.
- [42] T. Nakai, A. Sawata, and K. Kume, "Intracellular locations of dermonecrotic toxins in Pasteurella multocida and in Bordetella bronchiseptica," *Am. J. Vet. Res.*, vol. 46, pp. 870–874, 1985.
- [43] B. T. Cookson, A. N. Tyler, and W. E. Goldman, "Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis," *Biochemistry*, vol. 28, pp. 1744–1749, 1989.
- [44] E. W. Goodell and U. Schwarz, "Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing Escherichia coli," *J. Bacteriol.*, vol. 162, pp. 391–397, 1985.

- [45] L. N. Heiss, S. A. Moser, E. R. Unanue, and W. E. Goldman, "Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis," *Infect. Immun.*, vol. 61, pp. 3123–3128, 1993.
- [46] A. Preston, A. G. Allen, J. Cadisch, R. Thomas, K. Stevens, C. M. Churcher, K. L. Badcock, J. Parkhill, B. Barrell, and D. J. Maskell, "Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Bordetellae*," *Infect. Immun.*, vol. 67, no. 8, pp. 3763–3767, 1999.
- [47] S. C. Higgins, E. C. Lavelle, C. McCann, B. Keogh, E. McNeela, P. Byrne, B. O’Gorman, A. Jarnicki, P. McGuirk, and K. H. G. Mills, "Toll-like receptor 4-mediated innate IL-10 activates antigen-specific regulatory T cells and confers resistance to *Bordetella pertussis* by inhibiting inflammatory pathology," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 6, pp. 3119–3127, 2003.
- [48] P. B. Mann, D. Wolfe, E. Latz, D. Golenbock, A. Preston, and E. T. Harvill, "Comparative toll-like receptor 4-mediated innate host defense to *Bordetella* infection," *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 12, pp. 8144–8152, 2005.
- [49] I. R. Henderson, F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, and D. Ala’Aldeen, "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 68, no. 4, pp. 692–744, 2004.
- [50] T. L. Nicholson, S. L. Brockmeier, and C. L. Loving, "Contribution of *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinin and pertactin to respiratory disease in swine," *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 5, pp. 2136–2146, 2009.
- [51] L. A. E. Ashworth, L. I. Irons, and A. B. Dowsett, "Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*," *Infect. Immun.*, vol. 37, no. 3, pp. 1278–1281, 1982.
- [52] C. A. W. Geuijen, R. J. L. Willems, P. Hoogerhout, W. C. Puijk, R. H. Melen, and F. R. Mooi, "Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 5, pp. 2256–2263, 1998.
- [53] C. Locht, P. Bertin, F. D. Menozzi, and G. Renauld, "The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp.," *Mol. Microbiol.*, vol. 9, no. 4, pp. 653–660, 1993.
- [54] S. A. Makhov AM, Hannah JH, Brennan MJ, Trus BL, Kocsis E, Conway JF, Wingfield PT, Simon MN, "Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns," *J Mol Biol.*, vol. 241(1), pp. 110–24.

- [55] S. M. Prasad, Y. Yin, E. Rodzinski, E. I. Tuomanen, and H. R. Masure, "Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*," *Infect. Immun.*, vol. 61, no. 7, pp. 2780–2785, 1993.
- [56] F. D. Menozzi, R. Mutombo, G. Renauld, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, and C. Le Locht, "Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 3, pp. 769–778, 1994.
- [57] D. Relman, E. Tuomanen, S. Falkow, D. T. Golenbock, K. Saukkonen, and S. D. Wright, "Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*," *Cell*, vol. 61, no. 7, pp. 1375–1382, 1990.
- [58] S. M. Julio, C. S. Inatsuka, J. Mazar, C. Dieterich, D. a. Relman, and P. a. Cotter, "Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and reveal a role for the mature C-terminal domain, but not the RGD motif, during infection," *Mol. Microbiol.*, vol. 71, no. 6, pp. 1574–1590, 2009.
- [59] C. R. Noël, J. Mazar, J. A. Melvin, J. A. Sexton, and P. A. Cotter, "The prodomain of the *Bordetella* two-partner secretion pathway protein FhaB remains intracellular yet affects the conformation of the mature C-terminal domain," *Mol. Microbiol.*, vol. 86, no. 4, pp. 988–1006, 2012.
- [60] B. Clantin, H. Hodak, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, and V. Villeret, "The crystal structure of filamentous hemagglutinin secretion domain and its implications for the two-partner secretion pathway," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 16, pp. 6194–6199, 2004.
- [61] F. Jacob-Dubuisson, C. Locht, and R. Antoine, "Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: A thrifty, specific pathway for large virulence proteins," *Molecular Microbiology*, vol. 40, no. 2, pp. 306–313, 2001.
- [62] A. V. Kajava, N. Cheng, R. Cleaver, M. Kessel, M. N. Simon, E. Willery, F. Jacob-Dubuisson, C. Locht, and A. C. Steven, "Beta-helix model for the filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins," *Mol. Microbiol.*, vol. 42, no. 2, pp. 279–292, 2001.
- [63] B. Clantin, A.-S. Delattre, P. Rucktooa, N. Saint, A. C. Méli, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, and V. Villeret, "Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily," *Science*, vol. 317, no. 5840, pp. 957–961, 2007.
- [64] F. Jacob-Dubuisson, C. Buisine, N. Mielcarek, E. Clément, F. D. Menozzi, and C. Locht, "Amino-terminal maturation of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin," *Mol. Microbiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 65–78, 1996.

- [65] J. Mazar and P. A. Cotter, "Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion," *Mol. Microbiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 641–654, 2006.
- [66] L. Coutte, E. Willery, R. Antoine, H. Drobecq, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson, "Surface anchoring of bacterial subtilisin important for maturation function," *Mol. Microbiol.*, vol. 49, no. 2, pp. 529–539, 2003.
- [67] L. Coutte, S. Alonso, N. Reveneau, E. Willery, B. Quatannens, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson, "Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen.," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 6, pp. 735–742, 2003.
- [68] M. W. Henderson, C. S. Inatsuka, A. J. Sheets, C. L. Williams, D. J. Benaron, G. M. Donato, M. C. Gray, E. L. Hewlett, and P. A. Cotter, "Contribution of Bordetella filamentous hemagglutinin and adenylate cyclase toxin to suppression and evasion of interleukin-17-mediated inflammation," *Infect. Immun.*, vol. 80, no. 6, pp. 2061–2075, 2012.
- [69] J. Livny and M. K. Waldor, "Identification of small RNAs in diverse bacterial species," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, no. 2, pp. 96–101, 2007.
- [70] J. Johansson and P. Cossart, "RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens," *Trends in Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 280–285, 2003.
- [71] P. P. Dennis and A. Omer, "Small non-coding RNAs in Archaea," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, no. 6, pp. 685–694, 2005.
- [72] S. Gottesman, "Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria," *Trends in Genetics*, vol. 21, no. 7, pp. 399–404, 2005.
- [73] D. Hot, S. Slupek, B. Wulbrecht, A. D'Hondt, C. Hubans, R. Antoine, C. Locht, and Y. Lemoine, "Detection of small RNAs in Bordetella pertussis and identification of a novel repeated genetic element.," *BMC Genomics*, vol. 12, no. 1, p. 207, 2011.
- [74] M. F. Willems RJ1, Geuijen C, van der Heide HG, Renauld G, Bertin P, van den Akker WM, Locht C, "Mutational analysis of the Bordetella pertussis fim/fha gene cluster: identification of a gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA.," *Mol Microbiol.*, vol. 11, no. 2, pp. 337–47, 1994.
- [75] N. Chevalier, M. Moser, H. G. Koch, K. L. Schimz, E. Willery, C. Locht, F. Jacob-Dubuisson, and M. Müller, "Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 7–18, 2004.
- [76] A. C. Méli, H. Hodak, B. Clantin, C. Locht, G. Molle, F. Jacob-Dubuisson, and N. Saint, "Channel properties of TpsB transporter FhaC point to two functional

- domains with a C-terminal protein-conducting pore," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 1, pp. 158–166, 2006.
- [77] A. Toledo-Arana, F. Repoila, and P. Cossart, "Small noncoding RNAs controlling pathogenesis," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 10, no. 2, pp. 182–188, 2007.
 - [78] J. Livny, A. Brencic, S. Lory, and M. K. Waldor, "Identification of 17 *Pseudomonas aeruginosa* sRNAs and prediction of sRNA-encoding genes in 10 diverse pathogens using the bioinformatic tool sRNAPredict2," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 12, pp. 3484–3493, 2006.
 - [79] B. Saïd-Salim, P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan, and B. N. Kreiswirth, "Global regulation of *Staphylococcus aureus* genes by Rot," *J. Bacteriol.*, vol. 185, no. 2, pp. 610–619, 2003.
 - [80] J. K. Christiansen, J. S. Nielsen, T. Ebersbach, P. Valentin-Hansen, L. Søgaaard-Andersen, and B. H. Kallipolitis, "Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*," *RNA*, vol. 12, no. 7, pp. 1383–1396, 2006.

9.1. Přehled použitých obrázků

- [1] <http://www.szu.cz/tema/prevence/tiskova-zprava-pertuse>
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 2.1, str. 12)
- [2] <http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1369527400001697-gr3.jpg>
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.1, str. 14)
- [3] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4205565/figure/F1/>
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.2, str. 14)
- [4] http://openi.nlm.nih.gov/imgs/512/200/3153263/3153263_toxins-02-01612-g005.png (Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.3, str. 15)
- [5] http://www.plospathogens.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.ppat.1000901.g008&representation=PNG_I
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.4, str. 16)
- [6] http://www.biomin.net/uploads/RTEmagicC_Toxin-Risk-Management_Figure1_06.jpg.jpg (Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.5, str. 17)
- [7] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4205565/figure/F3/>
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.6, 3.7 str. 17)
- [8] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=filamentous+hemagglutinin+villarino+romero> (Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.8, str. 18; Obr. 3.13, str. 22; Obr. 3.14, str. 23)
- [9] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=50-nm%20monomeric%20rigid%20rod%20based%20on%20> (Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.9, str. 19)
- [10] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3756990/figure/pone-0073572-g001/> (Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.11, str. 20)
- [11] <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2007/SB/fig-82.jpg>
(Aktuální ke dni 8.5.2015, Obr. 3.12, str. 22)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka