

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Daniel Štipl**

**Interakce lidského patogenu *Bordetella pertussis* s krevním sérem**

**Interaction of the human pathogen *Bordetella pertussis* with blood serum**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Branislav Večerek, CSc.

Praha, 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou 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, 1. června 2020

.....

Bc. Daniel Štípl

*Přestože jsem svou diplomovou práci zpracoval samostatně, nevznikla by bez přičinění řady lidí v mém blízkém okolí, kterým bych rád na tomto místě **poděkoval**.*

*V první řadě děkuji vedoucímu své diplomové práce, RNDr. Branislavu Večerkovi, CSc. nejen za vedení této diplomové práce, ale především za vedení celé Laboratoře post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ, AV ČR), v jejíž prostorách mi umožnil tuto práci uskutečnit. Zároveň mu spolu s Anou Dienstbier, Ph.D. patří dík za návrhy experimentů a za trpělivé zaškolení do použitých laboratorních technik. Ostatním členům laboratoře bych rád poděkoval za vytvoření příjemného a přátelského pracovního prostředí a za cenné rady a připomínky při diskuzi nad experimenty a konkrétními daty.*

*Za příjemnou spolupráci bych také rád poděkoval pracovníkům partnerské Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů prof. Ing. Petera Šeba, CSc. (MBÚ, AV ČR). V neposlední řadě patří můj dík Ing. Václavu Křišťůfkovi, CSc., který mě zasvětil a nadchl do vědecké činnosti a mikrobiologické praxe.*

*Svým rodičům a nejbližším přátelům bych rád poděkoval za morální podporu ve studiu.*

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři post-transkripční kontroly genové exprese na Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v. v. i. za finanční podpory grantových projektů AZV 16-30782A a GAČR 19-12338S.

## Abstrakt

Bakterie *Bordetella pertussis* je lidský patogen a původce černého kašle, vážné respirační nemoci, jejíž výskyt se v průmyslově rozvinutých zemích v posledních desetiletích zvýšil. Jedním z dosud málo prostudovaných faktorů virulence *B. pertussis* je sekreční systém typu 3 (T3SS) zajišťující transport efektorových proteinů produkovaných gramnegativními bakteriemi do hostitelských buněk. V této diplomové práci byly studovány faktory ovlivňující aktivitu T3SS *in vitro*. Bylo zjištěno, že T3SS laboratorního kmene Tohama I lze aktivovat kontaktem buněk s biologicky aktivními termolabilními složkami krve (např. komplement). Naopak u nedávno izolovaného kmene B1917 je T3SS aktivní i bez indukce krví. Indukce T3SS *in vitro* byla dále studována u nově připraveného kmene bakterie *B. bronchiseptica* RB50 postrádajícího gen *BB0302* kódující regulátor transkripce rodiny GntR (homolog *BP0209* bakterie *B. pertussis*). Delece genu *BB0302* však na aktivitu T3SS neměla vliv. Odolnost vůči baktericidnímu působení krevního séra je důležitým faktorem, který hraje roli v patogenezi *B. pertussis*. Bylo zjištěno, že české klinické izoláty (2008–2015) jsou vůči séru *in vitro* výrazně odolnější než původní vakcinační kmeny (1954–1965). Tento jev pravděpodobně souvisí s postupnou adaptací globální populace *B. pertussis* na lidského hostitele. Dále tato diplomová práce dokládá a diskutuje zjevné odlišnosti laboratorního kmene Tohama I a současných klinických izolátů *B. pertussis*.

**Klíčová slova:** *Bordetella*, klinické izoláty, virulence, genová exprese, T3SS, rezistence k séru, komplement, adaptace, vakcinace

## Abstract

*Bordetella pertussis* is a Gram-negative strictly human pathogen and the major causative agent of whooping cough or pertussis. The incidence of this highly contagious respiratory disease in developed countries has increased in the last decades. One of the less characterized virulence factors of *B. pertussis* is the type three secretion system (TTSS) which is responsible for the secretion of the effector proteins into host eukaryotic cells. This diploma thesis sheds light onto factors influencing TTSS *in vitro* activity. Although TTSS of laboratory strain Tohama I was induced by biologically active compounds present in blood (e. g. complement proteins), TTSS of recent clinical isolate B1917 seems to be induced permanently. Furthermore, *BB0302* encoding a GntR family transcription regulator in *B. bronchiseptica* RB50 (homologous to *BP0209* of Tohama I) was studied, however, the deletion of this gene did not affect the TTSS functionality. Serum resistance is a factor that plays a key role in the pathogenesis of *B. pertussis*. We show that Czech recent isolates (2008–2015) are significantly more resistant to serum killing *in vitro* than the original vaccine strains (1954–1965). This phenomenon seems to result from the adaptation of global *B. pertussis* population to its human host. In addition, this diploma thesis documents and discusses the obvious differences between the laboratory strain Tohama I and recent isolates of *B. pertussis*.

**Key words:** *Bordetella*, clinical isolate, virulence, gene expression, T3SS, resistance to serum killing, complement, adaptation, vaccination

## Seznam zkratek

ACT	<u>a</u> denylate <u>c</u> yclase <u>t</u> oxin	adenylát cyklázový toxin
Amp	<u>a</u> mpicillin	ampicilin (antibiotikum)
AP	<u>a</u> lternative <u>p</u> athway	alternativní cesta aktivace komplementu
ASF	<u>a</u> nti- <u>s</u> igma <u>f</u> actor	anti-sigma faktor
Bap	<u>B</u> ordetella autotransporter protein	protein rodiny autotransportérů <i>B. pertussis</i>
BG agar	Bordet-Gengou <u>a</u> gar	Bordet-Gengou agar
Bps	<u>B</u> ordetella <u>p</u> olysaccharide	polysacharid <i>B. pertussis</i>
Brk	<u>B</u> ordetella <u>r</u> esistence to <u>k</u> illing	odolnost <i>B. pertussis</i> k séru
Bvg	<u>B</u> ordetella <u>v</u> irulence <u>g</u> ene	gen virulence <i>B. pertussis</i>
cAMP	<u>c</u> yclic <u>a</u> denosin <u>e</u> monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CHA agar	<u>c</u> harcoal <u>a</u> gar	agar s aktivním uhlím
CHAB agar	<u>C</u> HA agar enriched with <u>b</u> lood	CHA agar obohacený krví
CP	<u>c</u> lassical <u>p</u> athway	klasická cesta aktivace komplementu
c-di-GMP	<u>c</u> yclic <u>d</u> iguanylate	cyklický diguanylát
CR	<u>c</u> omplement <u>r</u> eceptor	receptor komplementu
CRP	<u>C</u> - <u>r</u> eactive protein	C-reaktivní protein
dH <sub>2</sub> O	<u>d</u> istilled water	destilovaná voda
DNT	<u>d</u> ermonecrotic <u>t</u> oxin	dermonekrotický toxin
DTwP	<u>d</u> iphtheriae <u>t</u> etanus <u>w</u> hole cell <i>p</i> ertussis vaccine	celobuněčná pertusová vakcína
DTaP	<u>d</u> iphtheriae <u>t</u> etanus <u>a</u> cellular <i>p</i> ertussis vaccine	vícesložková pertusová vakcína
ESF	<u>e</u> xtracytoplasmic function <u>s</u> igma <u>f</u> actor	extracytoplasmatický sigma faktor
FHA	<u>f</u> ilamentous <u>h</u> emagglutinin	filamentózní hemagglutinin
gDNA	<u>g</u> enomic <u>D</u> NA	genomová DNA
IL	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin	interleukin
IFN	<u>i</u> nter <u>f</u> eron	interferon
IS	<u>i</u> nsertion <u>s</u> equance element	inserční element

Kan	<u>kan</u> amycin	kanamycin (antibiotikum)
LP	<u>l</u> ectin <u>p</u> athway	lektinová cesta aktivace komplementu
MAC	<u>m</u> embrane <u>a</u> ttack <u>c</u> omplex	komplex napadající bakteriální membránu
MASP	<u>M</u> BL- <u>a</u> ssoiated <u>s</u> erine <u>p</u> rotease	serinová proteáza asociovaná s MBL
MBL	<u>m</u> annose- <u>b</u> inding <u>l</u> ectin	lektin vázající manózu
MCS	<u>m</u> ultiple <u>c</u> loning <u>s</u> ite	klonovací oblast
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity	optická hustota
OMV	<u>o</u> uter <u>m</u> embrane <u>y</u> esicles	váčky vnější bakteriální membrány
pDNA	<u>p</u> lasmid <u>D</u> N <u>A</u>	plazmidová DNA
Prn	<u>p</u> ertactin	pertaktin
PT	<u>p</u> ertussis <u>t</u> oxin	pertusový toxin
SKA	<u>s</u> erum <u>k</u> illing <u>a</u> ssay	test odolnosti vůči séru
SS médium	<u>S</u> tainer- <u>S</u> cholte <u>m</u> edium	Stainer-Scholte médium
Str	<u>s</u> treptomycin	streptomycin (antibiotikum)
T3SS	<u>t</u> ype <u>III</u> <u>s</u> ecretion <u>s</u> ystem	typ 3 sekrečního systému
TCT	<u>t</u> racheal <u>c</u> ytotoxin	tracheální cytotoxin
Vag	<u>v</u> irulence <u>a</u> ctivated <u>g</u> ene	gen aktivovaný k virulenci
VS	<u>v</u> accine <u>s</u> trains	původní české vakcinační kmeny <i>B. pertussis</i>

# Obsah

1 Úvod.....	11
2 Cíle práce.....	13
3 Literární přehled.....	14
3.1 Bakterie <i>Bordetella pertussis</i> .....	14
3.1.1 <i>B. pertussis</i> a černý kašel .....	14
3.1.2 Historie očkování proti černému kašli .....	15
3.1.3 Vývoj a adaptace kmenů <i>B. pertussis</i> .....	16
3.1.4 Návrat černého kašle .....	18
3.1.5 Kultivace <i>B. pertussis</i> .....	19
3.2 Regulace virulence <i>B. pertussis</i> .....	20
3.3 Faktory virulence <i>B. pertussis</i> .....	23
3.3.1 Toxiny .....	23
3.3.2 Sekreční systém typu 3 – T3SS.....	24
3.3.3 Odolnost vůči účinkům komplementu .....	29
4 Materiál a metody.....	42
4.1 Materiál .....	42
4.1.1 Kmeny bakterií .....	42
4.1.2 Živná média.....	43
4.1.3 Plazmidy.....	45
4.1.4 Pufry a další roztoky .....	45
4.1.5 Protilátky .....	50
4.1.6 Syntetické oligonukleotidy.....	51
4.2 Metody .....	52
4.2.1 Kultivace mikroorganismů.....	52
4.2.2 Test odolnosti vůči séru – SKA.....	52
4.2.3 Aktivita T3SS v závislosti na kontaktu s krví.....	54
4.2.4 Elektroforéza SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu.....	56
4.2.5 Detekce proteinů pomocí imunoblotu .....	57
4.2.6 Izolace celkové bakteriální RNA .....	58
4.2.7 Reverzní transkripce RNA .....	59
4.2.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) .....	60
4.2.9 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu .....	61



4.2.10 Charakterizace genu <i>BB0302</i> .....	62
5 Výsledky.....	69
5.1 Aktivita T3SS bakterie <i>B. pertussis</i> v závislosti na kontaktu s krví .....	69
5.2 Role genu <i>BB0302</i> v regulaci exprese a produkce T3SS .....	75
5.2.1 Příprava kmene <i>B. bronchiseptica</i> RB50Δ0302.....	75
5.2.2 Charakterizace kmene <i>B. bronchiseptica</i> RB50Δ0302 .....	77
5.3 Odolnost klinických izolátů <i>B. pertussis</i> vůči baktericidnímu působení krevního séra. 80	
6 Diskuze.....	81
7 Souhrn .....	89
8 Seznam použité literatury .....	90

*Obsah a odkazy na obrázky, tabulky a kapitoly zmíněné v textu jsou v elektronické verzi této diplomové práce opatřeny skrytými hypertextovými odkazy.*



# 1 Úvod

Bakterie *Bordetella pertussis* je lidský patogen a původce závažné a vysoce nakažlivé choroby dýchacích cest zvané černý kašel. Po vzoru jiných závažných infekčních onemocnění byla asi v polovině 20. století do očkovacího kalendáře zavedena vakcína určená k prevenci černého kašle. Tento krok znamenal celosvětově významný pokles nemocnosti a úmrtnosti v důsledku černého kašle, který byl díky tomu ještě donedávna v zemích s vysokou proočkovaností považován za poměrně vzácnou či dokonce vymýcenou chorobu. Zhruba v posledních dvou až třech dekadách byl však zejména v průmyslově rozvinutých zemích zaznamenán celosvětový nárůst četnosti tohoto onemocnění. Jedním z řady důvodů návratu černého kašle, diskutovaných v této diplomové práci, je nedostatečná a krátkodobá účinnost vícenosložkové vakcíny používané v současnosti ve většině vyspělých zemí celého světa.

*B. pertussis* je gramnegativní výlučně lidský patogen, který disponuje celou řadou faktorů virulence, tj. biomolekul, které umožňují úspěšně infikovat hostitelský organismus, množit se v něm a současně se podílet na jeho patologických změnách. Jedním z klíčových faktorů virulence bakterie *B. pertussis* je pertusový toxin, který byl dlouho považován za zásadní faktor virulence této bakterie a zároveň za původce projevů černého kašle (především záchvatovité kašláni). Rychlý vývoj molekulárně-biologických metod umožnil v několika posledních desetiletích získat nové a přesnější poznatky o evoluci, adaptaci a patogenezi bakterie *B. pertussis*. V dnešní době je již zřejmé, že *B. pertussis* využívá k infekci hostitelského organismu širokou paletu důležitých faktorů virulence, a i přes intenzivní výzkum není dodnes jasné, které faktory jsou zodpovědné za projevy černého kašle, jakým způsobem je bakterie přenášena z člověka na člověka, ani jak by měla vypadat ideální vakcína k prevenci černého kašle. Z těchto důvodů je zcela nezbytný další podrobný výzkum zaměřený na jednotlivé faktory virulence *B. pertussis* a obecně na jejich interakci s hostitelským organismem vedoucí k pochopení infekční strategie tohoto patogenu v širším kontextu. Bez tohoto poznání není jinak možné účinně reagovat na narůstající počet diagnostikovaných onemocnění černým kašlem.

Tato diplomová práce se zaměřila na studium dvou zatím poměrně málo charakterizovaných faktorů souvisejících s virulencí bakterie *B. pertussis* – schopnost buněk *B. pertussis* přežít baktericidní působení krevního séra a funkčnost sekrečního systému typu 3 (T3SS). Zejména role T3SS v patogenezi černého kašle je u *B. pertussis* zatím nepříliš jasná, a právě proto je potřeba věnovat se i těmto doposud přehlíženým faktorům virulence *B. pertussis*.

Citlivost buněk *B. pertussis* vůči krevnímu séru je v této diplomové práci studována v kontextu evoluce a adaptace tohoto patogenu. Je zde porovnávána citlivost současných klinických izolátů s citlivostí kmenů izolovaných zhruba v 2. polovině 20. století, kdy bylo na území současné České republiky zavedeno plošné očkování proti původci černého kašle.

T3SS je makromolekulární aparát sloužící gramnegativním bakteriím v patogenezi – umožňuje jim totiž vstříkovat různé biologicky aktivní molekuly přímo do cytoplasmy eukaryotické buňky hostitelského organismu. Bakterie *B. pertussis* je jednou z řady bakterií, které tímto aparátem disponují. Dodnes však není známo, zda vůbec T3SS hraje nějakou roli v její patogenezi. V této diplomové práci jsou mimo jiné studovány podmínky, za kterých je T3SS bakterie *B. pertussis* aktivní během kultivace *in vitro*.

## 2 Cíle práce

Tato diplomová práce se zabývá odolností buněk bakterie *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra a aktivitou sekrečního systému typu 3 (T3SS) v podmínkách *in vitro*.

Dílčí cíle práce:

1. Pozorování aktivity T3SS laboratorního kmene bakterie *B. pertussis* Tohama I v souvislosti s kontaktem s krví během kultivace na pevném médiu. V případě pozorování rozdílů v aktivitě T3SS v závislosti na přítomnosti krve určit, zda je sledovaný jev závislý na přítomnosti biologicky aktivních termolabilních složek krve.
2. Příprava kmene bakterie *B. bronchiseptica* s odstraněným genem *BB0302* a jeho charakterizace s ohledem na sekreci pomocí T3SS.
3. Porovnání odolnosti vůči baktericidnímu působení krevního séra u současných českých klinických izolátů bakterie *B. pertussis* a u tzv. vakcinačních kmenů *B. pertussis* izolovaných v bývalém Československu v době zavedení plošného očkování proti této bakterii.

*Hypotézy:*

*Ad 1. T3SS laboratorního kmene B. pertussis Tohama I lze v podmínkách in vitro aktivovat kultivací na pevném médiu obohaceném beraní krví. Tepelná inaktivace biologicky aktivních termolabilních složek krve vede k oslabení aktivity T3SS.*

*Ad 2. Delece genu BB0302 změní sekreci pozorovaných proteinů pomocí T3SS bakterie B. bronchiseptica nebo ovlivní expresi pozorovaných genů souvisejících s T3SS v porovnání s divokým typem.*

*Ad 3. Buňky současných klinických izolátů bakterie B. pertussis jsou odolnější vůči baktericidnímu působení séra než původní vakcinační kmeny. Referenční kmen Tohama I vykazuje vyšší citlivost vůči séru než obě skupiny klinických izolátů.*

## 3 Literární přehled

### 3.1 Bakterie *Bordetella pertussis*

Bakterie rodu *Bordetella* patří do třídy *Betaproteobacteria*, čeledi *Alcaligenaceae*. Rod *Bordetella* je tradičně dělen na dvě části – klinicky významné druhy a ostatní druhy. Mezi klinicky významné druhy patří *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*. Tyto tzv. „klasické druhy“ mají životní cyklus spojený s hostitelským organismem a jsou původci různých infekcí dýchacího traktu savců a ptáků. Ostatní druhy, mezi které patří např. *B. hinzii* či *B. holmesii*, se na patogenezi savců a ptáků podílejí buď velmi vzácně, nebo jsou nacházeny na sliznicích jako neškodní komenzálové (Mattoo a Cherry, 2005). Teprve nedávno bylo zjištěno, že některé druhy rodu *Bordetella* nemusí mít svůj životní cyklus nutně spojený s hostitelem a jsou schopné přežívání, růstu a množení v půdě, kde má rod *Bordetella* (vč. patogenních druhů) pravděpodobně svůj evoluční původ (Hamidou Soumana *et al.*, 2017). Tyto druhy byly objeveny pomocí fylogenetické analýzy 16S rRNA klasických druhů a izolátů získaných z prostředí (půda, voda a rostliny). Je proto možné, že některé patogenní druhy mohou prostředí mimo hostitele a přežívání v něm využívat jako svého rezervoáru. Na základě stejné fylogenetické analýzy bylo několik desítek druhů rodu *Bordetella* rozděleno do deseti podskupin, z nichž pouze čtyři zahrnují druhy, které mají životní cyklus spojený s hostitelem (Hamidou Soumana *et al.*, 2017).

Z výčtu druhů rodu *Bordetella* je z klinického hlediska daleko nejvýznamnější bakterie *B. pertussis*. V roce 1906 ji izolovali francouzští vědci J. Bordet a O. Gengou jako původce černého kašle (též dávivý kašel či pertuse); (Bordet a Gengou, 1906 dle Mattoo a Cherry, 2005). *B. pertussis* je obtížně kultivovatelný, aerobní, gramnegativní kokobacil běžně nepřesahující velikost 2  $\mu\text{m}$ . Dle nejnovějších poznatků je tato bakterie schopna pohybu pomocí struktury příbuzné bičíku. Není však zřejmé, zda má tento jev nějaký význam v její životní strategii striktně vázané na lidského hostitele (Hoffman *et al.*, 2019).

#### 3.1.1 *B. pertussis* a černý kašel

Černý kašel je závažná a vysoce nakažlivá choroba dýchacího ústrojí člověka. Neproází jej zánět ani horečka a její původce, bakterie *B. pertussis*, je přenášen z člověka na člověka kapénkovou infekcí. Postihuje děti a dospělé různého věku. Lze mu předcházet řádným očkováním, které však stejně jako prodělaná nemoc nezajišťuje celoživotní ochranu daného jedince. Průběh a závažnost choroby se velmi liší a odvíjí se od věku a očkovací historie

pacienta. Nejrizikovější pacienti bývají ještě neočkované či pouze částečně očkované děti, dále pak senioři. Choroba typicky začíná po inkubační době trvající 7–10 dní tzv. katarální fází připomínající svými symptomy běžné nachlazení. Následuje tzv. paroxysmální fáze, jejíž znakem jsou silné záchvaty kašle, které mohou vést ke zvracení, zlomeninám žeber či udušení v souvislosti s plicní hypertenzí. Trvání této fáze je individuální, ale může trvat i několik měsíců, dokud se pacient spontánně zcela neuzdraví – tzv. fáze rekonvalescence. Přítomnost bakterie je pozorována zpravidla pouze v počáteční fázi infekce, kdy je sice možné ji potlačit pomocí antibiotik (erytromycin), zmírnit tak její následky a zkrátit dobu, po kterou je pacient nakažlivý, ale zároveň je náročné ji včas diagnosticky odhalit, což je nezbytné pro použití antibiotik (Mattoo a Cherry, 2005).

Vedle černého kašle s typickým průběhem je stále častěji diskutována také tzv. asymptomatická infekce, která se projevuje pouze jako nachlazení doprovázené několikadenním kašlem. Z tohoto důvodu většinou není takové onemocnění řádně diagnostikováno ani hlášeno. Dle některých údajů je však asymptomatická infekce bakterií *B. pertussis* až dvacetkrát častější než typický černý kašel. Asymptomatická infekce je pravděpodobně výsledkem nedostatečné efektivity používaných vakcín, které nebrání infekci a přenosu *B. pertussis*, ale zabraňují pouze plnému rozvoji onemocnění. Tento fakt je také jedním z důvodů opětovného celosvětového nárůstu počtu případů černého kašle v několika posledních dekadách (Cherry, 2015), jak bude diskutováno v následujících kapitolách.

### **3.1.2 Historie očkování proti černému kašli**

V 30. letech 20. století byla vyvinuta řada potenciálních vakcín s cílem snížit četnost onemocnění a výrazně omezit úmrtnost v důsledku infekce člověka bakterií *B. pertussis*. Ve 40. letech 20. století začala být v USA plošně používána tzv. celobuněčná vakcína připravená z usmrcených buněk (lyzátu) *B. pertussis*. V 50. letech 20. století začal být lyzátní buněk *B. pertussis* kombinován s toxoidem (inaktivovaným toxinem) tetanospasminu (*Clostridium tetani*, původce tetanu) a difterického toxinu (*Corynebacterium diphtheriae*, původce záškrtu) a zaváděn do praxe jako kombinovaná vakcína DTwP (*diphtheriae tetanus whole cell pertussis*). Očkování sice vedlo k zásadnímu snížení počtu případů a úmrtí v důsledku černého kašle, vakcína se však potýkala se zjevnými nežádoucími účinky – zarudnutí, bolest a svědění v místě vpichu, horečka, únava, zvracení a další. V 70. a 80. letech 20. století dokonce byly publikovány kontroverzní studie, které spojovaly očkování vakcínou DTwP s následným rozvojem různých neurologických poruch (epilepsie,

encefalopatie apod.) či syndromu náhlého úmrtí kojence u očkovaných pacientů. Všechna tato podezření byla následně prověřena a na základě řady nezávislých robustních studií vyvrácena pro zásadní nedostatky původních studií (Mattoo a Cherry, 2005).

Na druhou stranu bylo prokázáno, že ostatní již zmíněné vedlejší účinky s používáním vakcíny DTwP skutečně souvisejí. Tyto nežádoucí účinky byly připisovány velkému množství různých nežádoucích látek (zejména lipopolysacharidů), které jsou součástí buněčné stěny a jsou tak bohužel obsaženy i ve vakcíně. Zároveň ještě v 80. letech 20. století panoval názor, že jak onemocnění černým kašlem, tak i jeho fyziognomické projevy jsou způsobeny pertusovým toxinem (PT); (Pittman, 1984). Na základě těchto dvou klíčových faktů byla v Japonsku roku 1981 poprvé použita tzv. vícesložková vakcína (DTaP) obsahující namísto lyzátu buněk *B. pertussis* pouze dva faktory virulence, a to právě PT a filamentózní hemaglutinin (FHA); (Sato *et al.*, 1984). Vakcína DTaP vykazovala pochopitelně významně nižší četnost vedlejších účinků a začala být na přelomu tisíciletí používána namísto DTwP v řadě vyspělých zemí celého světa a později i v České republice, a to i přes nedostatek kvalitních statistických údajů dokazujících dostatečnou efektivitu DTaP v prevenci černého kašle. Zásadním problémem dosavadních studií posuzujících efektivitu tohoto typu vakcíny byla buď nízká četnost sledovaného statistického souboru, nebo špatně zvolené kontrolní vzorky. V původních studiích také efektivitu vakcíny DTaP uměle zvyšovala definice pozitivního případu černého kašle schválená Světovou zdravotnickou organizací. Ta černý kašel definovala jako alespoň tři týdny trvající záchvatovitý kašel při současném kultivačním či sérologickém důkazu přítomnosti bakterie *B. pertussis* v biologickém materiálu pacienta. Vzhledem k této definici byla za efektivní považována i vakcína, která zajistila pouze zmírnění průběhu nemoci, ale nezabránila infekci jako takové (včetně asymptomatické infekce) a jejímu přenosu (Mattoo a Cherry, 2005; Cherry, 2015).

### 3.1.3 Vývoj a adaptace kmenů *B. pertussis*

Genom bakterie *B. pertussis* (kmen Tohama I) obsahuje 358 pseudogenů a 261 inserčních elementů (IS); (převážně typu IS481). Pro srovnání, genom příbuzné bakterie *B. bronchiseptica* je větší asi o 1,25 MBp, navíc obsahuje pouze dvě desítky pseudogenů a neobsahuje žádný IS element. Ztráta a inaktivace velkého množství genů (v porovnání s bakterií *B. bronchiseptica*) je pravděpodobně výsledkem evoluce a zejména adaptace bakterie *B. pertussis* na jejího lidského hostitele (Parkhill *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 2004).



Rozšíření IS elementů v genomu bakterie je obecně považováno za zdroj mutací (delece, inserce, repeticce) a může být v dlouhodobé evoluci daného bakteriálního druhu chápáno jako mezikrok nezbytný k redukci velikosti genomu a k následnému přechodu k obligátně intracelulárnímu parazitismu, resp. symbióze s hostitelským organismem (Manzano-Marin a Latorre, 2016). V případě bakterie *B. pertussis* byly doposud vedle intracelulárního parazitismu, vzniku pseudogenů a redukce velikosti genomu popsány i poměrně rychlé a radikální změny v organizaci celého genomu (Weigand *et al.*, 2017). Takovéto genetické změny na úrovni celého chromozomu mohou mít značné následky – mohou ovlivnit např. regulaci a expresi genů kódujících faktory virulence, což může vést ke změně antigenního profilu daného organismu a jeho virulence (Brinig *et al.*, 2006). Bylo také pozorováno, že vedle přestaveb chromozomu mají IS elementy u *B. pertussis* vliv i na transkripci přilehlých genů díky aktivitě vlastních promotorů, které jsou součástí IS elementu (Amman *et al.*, 2018).

Jednou z konkrétních změn, ke které na této úrovni u bakterie *B. pertussis* došlo, je změna v sekvenci *ptxP*, promotoru genu kódujícího pertusový toxin. Stalo se tak v průběhu 2. poloviny 20. století pravděpodobně jako reakce bakterie na zavedení plošného očkování. Bylo zjištěno, že původní klinické izoláty nesou v drtivé většině alelu *ptxP1*, popř. *ptxP2*, zatímco současné kmeny, izolované po roce 2000, nesou z více než poloviny případů alelu *ptxP3*. Ta bývá spojována s vyšší produkcí samotného pertusového toxinu a obecně s vyšší virulencí kmenů nesoucích tuto alelu (Mooi *et al.*, 2009; Bart *et al.*, 2014). Další obdobnou adaptací je úplná ztráta produkce pertaktinu (Prn), jednoho z faktorů virulence *B. pertussis*. Nejčastějším mechanismem této adaptace je vložení IS481 do genu *prn*. Tyto mutantní kmeny začaly být izolovány na přelomu tisíciletí v zemích, ve kterých byla již dříve zavedena vakcína DTaP běžně obsahující právě Prn. Bylo také ukázáno, že pacienti očkovaní vakcínou DTaP jsou náchylnější k infekci právě těmito kmeny neschopnými produkce Prn (Pawloski *et al.*, 2014; Zeddeman *et al.*, 2014). Tyto dva konkrétní příklady jsou však pouhou špičkou ledovce obdobných adaptací.

Při studiu bakterie *B. pertussis* je proto důležité věnovat pozornost původu a historii daného kmene. Z dostupné literatury je navíc zřejmé, že dlouhodobější kultivace téhož klinického izolátu v podmínkách *in vitro*, tzv. pasážování, vede k přizpůsobení kmene na laboratorní podmínky spojené s následnou změnou exprese genů zodpovědných za řadu důležitých procesů, jako je buněčný metabolismus či virulence. Řada pracovních skupin již publikovala výsledky fylogenetických analýz a pozorování rozdílů ve fenotypu tzv. laboratorních kmenů a

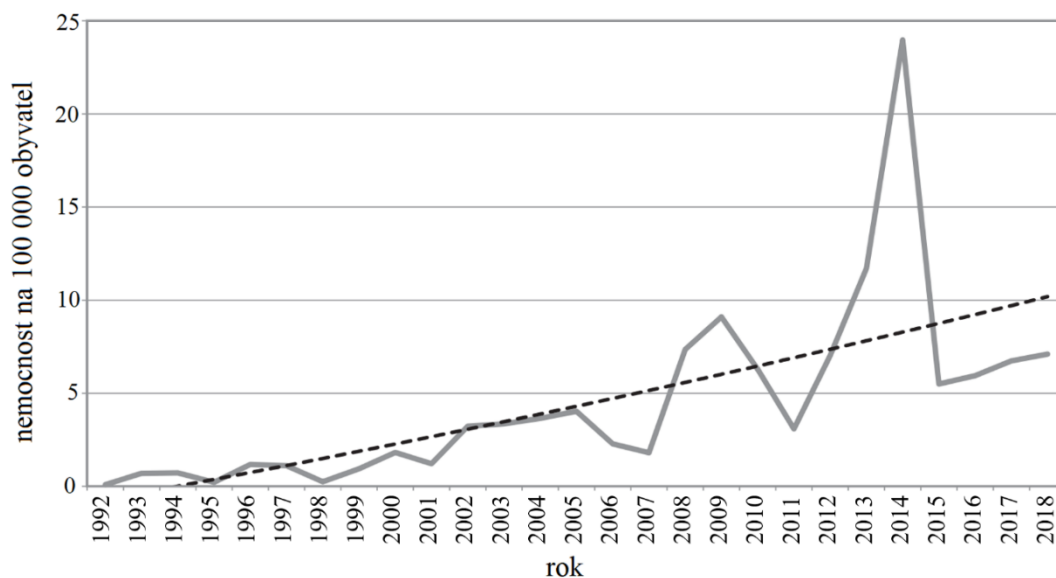
klinických izolátů bakterie *B. pertussis*, ze kterých je zřejmá adaptace referenčních kmenů Tohama I a 18323 na podmínky *in vitro* (van der Zee *et al.*, 1997). Konkrétně jde např. o rozdílnou citlivost buněk vůči baktericidnímu působení krevního séra či produkci komponent sekrečního systému typu 3 (Elder a Harvill, 2004; Gaillard *et al.*, 2011). Oba zmíněné jevy jsou v této diplomové práci dále diskutovány v příslušných kapitolách.

### 3.1.4 Návrat černého kašle

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, počet případů černého kašle je v posledních několika desetiletích v průmyslově vyspělých zemích na vzestupu. Nárůst počtu případů zaznamenala i Česká republika. Od roku 1989, kdy byl v ČR diagnostikován rekordně nízký počet případů černého kašle (pouze 5 případů celkem), má počet případů obecně rostoucí tendenci (Obrázek č. 1). V roce 2014 byl zaznamenán vůbec největší počet nemocných – 2 521 případů (nemocnost 24/100 000 obyvatel). Stejně jako v ostatních zemích světa jsou i u nás zaznamenávány dvou až pětileté cykly nárůstu a opětovného poklesu hlášené nemocnosti. V roce 2018 bylo nahlášeno celkem 752 případů černého kašle (nemocnost 7,1/100 000 obyvatel) ve všech věkových skupinách populace, nejčastěji však děti do 1 roku věku. Ačkoliv v letech 1984–2004 nebylo v ČR zaznamenáno žádné úmrtí v důsledku černého kašle, v letech 2005–2016 bylo zaznamenáno celkem 5 úmrtí dětí do 1 roku věku a úmrtí jednoho seniora. V letech 2017 a 2018 žádné úmrtí v důsledku černého kašle zaznamenáno nebylo (Fabianova *et al.*, 2019).

Návrat černého kašle, resp. narůstající počet případů je pravděpodobně výsledkem kombinace několika různých faktorů. Mezi klíčové faktory návratu černého kašle bezesporu patří již dříve diskutované zavedení šetrnější, ale méně efektivní vakcíny DTaP. Jedním z důvodů selhávání DTaP v navození dostatečné imunity a zamezení infekce patří její nevhodné složení (obsahuje 2–5 antigenů bakterie *B. pertussis* namísto několika tisíc antigenů obsažených v DTwP), navíc dodnes panují spory o tom, které antigeny a v jakém poměru používat pro její přípravu. Dále vakcína DTaP navozuje imunitní odpověď charakterizovanou produkcí T-buněk typu Th2 namísto produkce buněk typu Th1 a Th17, zpravidla indukované vakcínou DTwP, která zajišťuje účinnější obranu proti infekci a onemocnění. Vakcína DTaP kromě toho umožňuje průběh asymptomatického černého kašle, a tudíž šíření nákazy v populaci. Současně bylo pozorováno, že již několik let od očkování významně klesá imunologická paměť očkovaného pacienta, a to nezávisle na použitém typu vakcíny. Dalším důležitým již dříve diskutovaným faktorem návratu černého kašle jsou genetické změny odehrávající se v genomu bakterie

*B. pertussis*. Tyto změny zajišťují přirozenou adaptaci bakterie a umožňují jí uniknout účinkům vakcíny. Mezi další obecně známé faktory nárůstu počtu případů dané choroby patří i celosvětový nárůst cestování, resp. globalizace. Zdánlivý nárůst případů způsobuje také zlepšení kvality diagnostických metod, kterými jsou dnes v případě černého kašle kultivační záchyt patogenu, sérologie a PCR (Cherry, 2015; Cherry, 2019).



**Obrázek č. 1** Rostoucí trend hlášené nemoci černým kašlem v České republice v letech 1992–2018 ukazující nemocnost na 100 000 obyvatel. Převzato a upraveno (Fabianova *et al.*, 2019).

### 3.1.5 Kultivace *B. pertussis*

Bakterie *B. pertussis* je obecně považována za obtížně kultivovatelný mikroorganismus. Přestože se jedná o patogen striktně vázaný na lidského hostitele, je možné jej kultivovat *in vitro* jak na pevném, tak v tekutém živném médiu, a je také schopen infikovat tkáňové kultury či pokusná zvířata (myš, králík, pavián).

Pevné médium zvané *Bordet-Gengou agar* (BG agar) je komplexní živné médium, které je po přidání krve (ovčí, koňské) používáno pro izolaci a diagnostiku *B. pertussis* (Bordet a Gengou, 1906 dle Mattoo a Cherry, 2005). BG agar je dodnes nejčastěji používaným pevným živným médiem pro kultivaci této bakterie v podmínkách *in vitro*. V průběhu 20. století byla provedena řada pokusů o úpravu složení BG agaru s cílem zjednodušit jeho přípravu a zvýšit rychlost růstu buněk *B. pertussis*. Dalším používaným pevným médiem je *Charcoal agar* (CHA agar) obsahující aktivní uhlí. Toto médium umožňuje kultivaci *B. pertussis* bez přídavku krve a je dnes vedle BG agaru běžně používáno v diagnostických laboratořích pro záchyt *B. pertussis* (Powell *et al.*, 1951). Buňky *B. pertussis* jsou schopné růstu jak na CHA agaru obohaceném beraní krví, tak na standardním CHA agaru bez přídavku krve, což neplatí o BG agaru.

V průběhu 20. století byla také popsána řada tekutých živných médií určených pro kultivaci buněk *B. pertussis*. Nejčastěji používaným tekutým živným médiem je tzv. *Stainer-Scholte* (SS) médium popsané v roce 1970 jako chemicky definované médium vhodné pro přípravu celobuněčné pertusové vakcíny (Stainer a Scholte, 1970). Složení SS média vychází zejména z poznatku, že *B. pertussis* nevyužívá jako zdroj uhlíku cukry, nýbrž aminokyseliny. Úpravou složení SS média (např. použitím pouze minimálního, resp. limitujícího množství vybraných minerálů) lze simulovat podmínky podobné podmínkám *in vivo* které vedou ke změně fenotypu buněk kultivovaných v těchto podmínkách (Brickman *et al.*, 2011; Hanawa *et al.*, 2016).

### 3.2 Regulace virulence *B. pertussis*

Na základě zatím blíže necharakterizovaných vnějších vlivů střídá bakterie *B. pertussis* dvě základní životní fáze odlišné především schopností produkovat faktory virulence. Avirulentní fáze je označována jako **Bvg<sup>-</sup>** (z anglického *Bordetella virulence genes*), virulentní fáze jako **Bvg<sup>+</sup>**. Přechod mezi fází Bvg<sup>+</sup> a Bvg<sup>-</sup> zajišťuje dvoukomponentový systém signální transdukce **BvgAS**. Tento systém se skládá z transmembránové sensorické kinázy BvgS a solubilního cytosolického proteinu BvgA. N-koncová část proteinu BvgS zasahuje do periplasmatického prostoru, kde vnímá různé chemické a fyzikální podněty z okolí. Po aktivaci této tzv. sensorické domény je signál přenášen přes membránu na cytosolickou C-koncovou část proteinu, která je následně autofosforylována. Tento signál je fosforylační kaskádou předán na solubilní cytosolický protein BvgA, který se následně spojuje do dimerů a váže se přímo na DNA jako aktivátor transkripce celé řady genů podílejících se na virulenci bakterie. Souhrnně jsou tyto geny označovány jako **geny vag** (z anglického *virulence activated genes*); (Chen a Stibitz, 2019).

Naopak geny, které jsou exprimovány charakteristicky ve fázi Bvg<sup>-</sup>, jsou souhrnně označovány jako **geny vrg** (z anglického *virulence repressed genes*). Aktivátorem transkripce těchto genů *vrg* je protein **RisA**, který je nepřetržitě fosforylován, resp. aktivován sensorovou kinázou **RisK**. Aktivovaný RisA ale zároveň vyžaduje k aktivaci genů *vrg* dostatečnou koncentraci cyklického diguanylátu (c-di-GMP). V tom spočívá regulační funkce fosfodiesterázy BvgR, která je exprimována ve fázi Bvg<sup>+</sup> (*bvgR* patří mezi geny *vag*) a štěpí c-di-GMP na GMP. Tímto mechanismem je zajištěno, aby geny *vrg* byly exprimovány pouze ve fázi Bvg<sup>-</sup>, kdy v buňce není produkován protein BvgR a hladina c-di-GMP je na dostatečné úrovni. Signální systém Ris ještě doplňuje sensorová kináza/fosfatáza RisS zajišťující defosforylaci proteinu RisA, jak bylo pozorováno v případě bakterie *B. bronchiseptica*. Gen *risS* je však v genomu *B. pertussis*

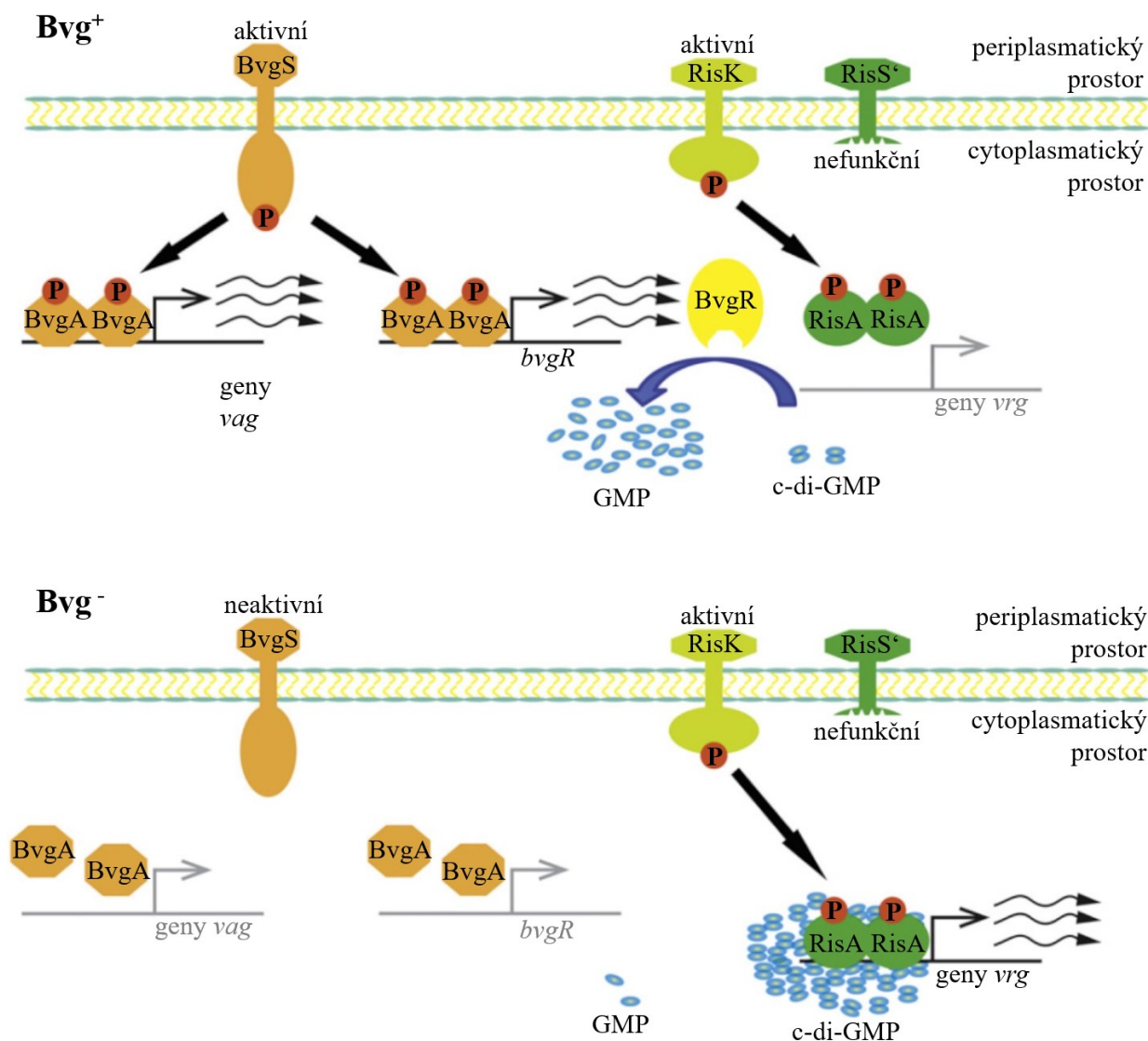
poškozený a jeho produkt postrádající fosfatázovou aktivitu pravděpodobně nemá žádnou regulační funkci (Merkel *et al.*, 1998; Stenson *et al.*, 2005; Coutte *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Chen a Stibitz, 2019). Molekulární mechanismus přechodu mezi oběma fázemi znázorňuje následující obrázek (Obrázek č. 2).

Zároveň je potřeba dodat, že přechod mezi virulentní a avirulentní fází je způsoben pouze změnou regulace exprese velkého množství genů, a proto tento přechod není skokovou záležitostí. Postupnou změnou koncentrace fosforylovaného BvgA se spolu s množstvím proteinu BvgR a c-di-GMP různě mění úroveň exprese jednotlivých genů skupiny *vrg* i *vag*. Z toho důvodu bývá v literatuře popisována i tzv. fáze přechodu (z anglického *intermediate*) mezi oběma fázemi virulence označovaná jako **Bvg<sup>i</sup>** (Boulangier *et al.*, 2013).

Souhra více různých dvoukomponentových systémů signální transdukce má obecně v regulaci genové exprese v říši bakterií často zásadní kontrolu nad celkovým fenotypem a životní strategií dané bakterie. Mutací jednoho z genů kódujícího regulační protein může na takovéto úrovni znamenat pro daný organismus zásadní evoluční výhodu. Je možné, že konkrétně mutace genu *risS* umožnila v evoluci bakterii *B. pertussis* po inaktivaci systému BvgAS expresi genů *vrg*, které se zdají být důležité mimo jiné i pro přenos z hostitele na hostitele formou aerosolu. V porovnání s bakterií *B. bronchiseptica* (produkující funkční fosfatázu RisS) je regulace genové exprese po inaktivaci systému BvgAS značně složitější a v případě opuštění hostitele obnáší expresi genů souvisejících mimo jiné s pohybem pomocí bičíku a chemotaxí namísto exprese genů *vrg* (Chen a Stibitz, 2019).

Dalším faktorem, který by mohl hrát roli v účinnosti přenosu infekce z hostitele na hostitele je fakt, že bakterie *B. pertussis* (na rozdíl od bakterie *B. bronchiseptica*) nijak zásadně nereaguje na snížení teploty ve svém životním prostředí ani změnou složení buněčné membrány na úrovni mastných kyselin, ani poklesem fosforylovaného proteinu BvgA, resp. produkcí faktorů virulence. To bylo pozorováno v podmínkách *in vitro* při změně teploty kultivace v SS médiu ze standardních 37 °C na 24 °C (Seydlova *et al.*, 2017). V této souvislosti zůstává otázkou, jaké vnější faktory mají vliv na spuštění, resp. vypnutí sensorové kinázy BvgS v podmínkách *in vivo*. Již dříve však bylo pozorováno, že v podmínkách *in vitro* lze navodit inaktivaci systému BvgAS přidáním síranu či kyseliny nikotinové do živného média a uměle takto *modulovat* produkci faktorů virulence (Melton a Weiss, 1989; Melton a Weiss, 1993).

Další mechanismy regulace virulence bakterie *B. pertussis* úzce související s produkcí a sekrecí pomocí T3SS jsou diskutovány v kapitole 3.3.2.3.



**Obrázek č. 2** Senzorická kináza BvgS je ve fázi Bvg<sup>+</sup> aktivní, autofosforyluje se a přenáší fosfát na solubilní protein BvgA. Ten následně v cytoplasmě dimerizuje a aktivuje transkripci genů *vag* vč. genu *bvgR*. Protein BvgR má fosfodiesterázovou aktivitu a štěpí c-di-GMP na GMP, čímž znemožňuje proteinu RisA aktivovat transkripci genů *vrg*.

V druhém případě je senzorická kináza BvgS neaktivní a buňka se nachází ve fázi Bvg<sup>-</sup>. Regulátor transkripce BvgA není fosforylován a transkripce genů *vag* neprobíhá. Proto není přítomen ani protein BvgR a vyšší hladina c-di-GMP umožňuje expresi genů *vrg* pomocí aktivátoru RisA. Gen *risS* je v genomu *B. pertussis* (na rozdíl od bakterie *B. bronchiseptica*) trvale poškozený. Jeho produkt postrádá fosfatázovou aktivitu, a proto zřejmě nemá žádný význam v regulaci virulence bakterie *B. pertussis*. Převzato a upraveno (Chen a Stibitz, 2019).

### 3.3 Faktory virulence *B. pertussis*

Bakterie *B. pertussis* disponuje poměrně velkým množstvím různorodých faktorů virulence. Tato kapitola je věnována základnímu popisu pertusového toxinu (PT) a adenylátcyklázového toxinu (ACT) – doposud nejlépe prostudovaným faktorům virulence. Dále se podrobně věnuje vlastnostem úzce související s virulencí, které byly prakticky studovány v této diplomové práci. Jedná se o sekreční systém typu 3 a odolnost bakterie *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra.

#### 3.3.1 Toxiny

Jednou z odlišností bakterie *B. pertussis* v porovnání s ostatními druhy rodu *Bordetella* je produkce PT. Jde o exotoxin typu AB<sub>5</sub>, který bakterie uvolňuje do okolního prostředí pomocí sekrečního systému typu 4. PT následně vstupuje endocytózou do hostitelských buněk. V endoplazmatickém retikulu je podjednotka A (nebo též S1) oddělena od zbytku toxinu a vstupuje do cytoplasmy, kde významně narušuje metabolismus a signalizační dráhy buňky zamezením produkce cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Touto cestou *B. pertussis* ovlivňuje imunitní odpověď ve svůj prospěch. PT je připisována řada klinických projevů černého kašle, mimo jiné bývá spojován i s typickým dlouhotrvajícím kašlem. Zároveň je PT protektivním antigenem a jeho detoxifikovaná forma je proto v různých podobách používána pro přípravu vakcíny DTaP (Parker a Morse, 1973; Sato *et al.*, 1974; Kotob *et al.*, 1995; el Baya *et al.*, 1997; Carbonetti *et al.*, 2003).

ACT (též CyaA nebo hemolyzin) je významný faktor virulence všech „klasických druhů“ rodu *Bordetella* vč. *B. pertussis*. Jedná se o exotoxin rodiny RTX (*repeats in toxin*) vylučovaný sekrečním systémem typu 1. Toxin se skládá z dvou klíčových domén s různou biologickou aktivitou. C-koncová doména zvaná RTX doména je zodpovědná za vnoření ACT do membrány hostitelské buňky, kde je schopna oligomerizovat a tvořit póry, což může mít za následek lyzi napadené buňky (proto hemolyzin). Mimo to je nezbytná pro translokaci N-koncové domény do cytoplasmy. N-koncová doména zvaná adenylát-cyklázová doména má po translokaci schopnost vázat v eukaryotických buňkách cytoplasmatický kalmodulin a následně katalyzovat přeměnu ATP na cAMP. Tím obdobně jako PT narušuje signalizační dráhy a metabolismus hostitelských buněk (Glaser *et al.*, 1988; Ehrmann *et al.*, 1991; Iwaki *et al.*, 1995; Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009).

Mezi následky působení ACT v organismu patří vedle již zmíněné hemolýzy narušení řádné funkce T-lymfocytů (aktivace a chemotaxe) a makrofágů (fagocytóza). Dalším pozorovaným účinkem ACT je rozpad těsných spojů (z anglického *tight junctions*) buněk epitelu dýchacích cest, čímž narušuje přirozenou obranyschopnost řasinkového epitelu vůči respiračním patogenům. Přestože je ACT protektivním antigenem, není v současnosti detoxifikovaný ACT součástí vakcíny DTaP (Kamanova *et al.*, 2008; Paccani *et al.*, 2008; Hasan *et al.*, 2018).

Dalšími toxiny produkoványi bakterií *B. pertussis* jsou dermonekrotický toxin (DNT) a tracheální cytotoxin (TCT). V porovnání s PT a ACT nejsou příliš detailně prostudovány a není zcela jasný ani jejich význam ve virulenci a patogenezi *B. pertussis*.

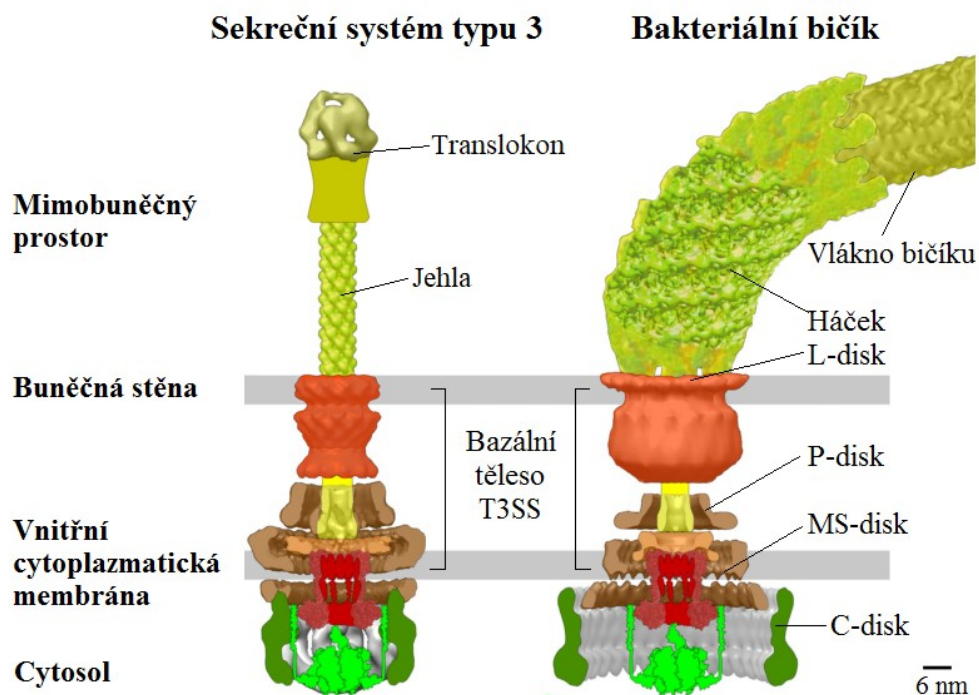
### 3.3.2 Sekreční systém typu 3 – T3SS

#### 3.3.2.1 Obecná charakteristika a význam T3SS ve virulenci

Transport proteinů z buňky gramnegativní bakterie do jejího okolí (tzv. sekrece) je zajištěn různými mechanismy. Jedním z nich je sekreční systém typu 3 (T3SS), který je hojně využíván v interakci bakterií s hostitelskými buňkami. Tvoří jej robustní komplex proteinů, který bývá pro svůj tvar a funkci označován jako *injektozom*. T3SS je velký asi 3,5 MDa. Svým tvarem a podobným principem výstavby je T3SS také nápadně podobný bičíku gramnegativních bakterií. Obě struktury totiž pro svou výstavbu v buněčné stěně využívají právě sekreci typu 3. Geny zodpovědné za tvorbu obou struktur sdílejí homologie zřejmě díky společnému evolučnímu původu. Bazální těleso T3SS tvoří kanál procházející celou buněčnou stěnou. Z bazálního tělesa vystupuje z povrchu buňky relativně dlouhá, dutá struktura připomínající jehlu, která je na své špičce ukončena komplexem proteinů zvaným *translokon* (Obrázek č. 3). Ten v podmínkách *in vivo* zajišťuje interakci s hostitelskou eukaryotickou buňkou, do které může bakterie přímo vstříkovat efektorové proteiny (proto *injektozom*) a ovlivňovat tak její fyziologii a životaschopnost. Tento mechanismus bývá gramnegativními bakteriemi využíván v patogenezi i symbióze (Green a Meccas, 2016; Portaliou *et al.*, 2016). Geny kódující T3SS bývají zpravidla kódovány společně v rámci velkých genetických lokusů buď na chromozomu, nebo na plazmidu. Díky tomu jsou často přenášeny i mezidruhově pomocí horizontálního přenosu. Efektorové proteiny však bývají kódovány na jiném místě v chromozomu a horizontálního přenosu se proto neúčastní (Gophna *et al.*, 2003) a bývají proto rodově specifické. T3SS je faktorem virulence využívaným řadou gramnegativních patogenních bakterií, včetně bakterií rodu *Bordetella*.



T3SS je kódován lokusem *bsc* a patří do výbavy všech klasických druhů rodu *Bordetella*. Jako faktor virulence byl doposud nejvíce studován u bakterie *B. bronchiseptica*, u které bylo již dříve zřejmé, že využívá T3SS v patogenezi (Yuk *et al.*, 1998). Význam T3SS ve virulenci dané bakterie byl zjištěn porovnáváním divokých typů bakterií a kmenů s mutací v genu *bscN*, který kóduje ATPázu nezbytnou pro funkci T3SS. V podmínkách *in vitro* byl pozorován cytotoxický vliv T3SS na různé buněčné linie včetně makrofágů. Význam T3SS pravděpodobně tkví v navození cytotoxických účinků na řadu buněčných typů a v komplexním rozvratu imunitní odpovědi hostitelského organismu. Bylo ukázáno, že *B. bronchiseptica* pomocí T3SS narušuje funkci dendritických buněk, které následně v hostitelském organismu namísto řádné funkce navozují imunosupresivní odpověď snížením produkce interferonu (IFN)- $\gamma$  nezbytného pro aktivaci makrofágů a současným zvýšením produkce protizánětlivého interleukinu (IL) 10. Zároveň bylo ukázáno, že T3SS v synergii s ACT stimuluje imunitní odpověď založenou spíše na buněčné linii Th17 (Stockbauer *et al.*, 2003; Skinner *et al.*, 2005; Siciliano *et al.*, 2006).



**Obrázek č. 3** Grafické znázornění přibližné struktury T3SS na molekulární úrovni. Obrázek popisuje základní struktury T3SS, porovnává je s bičíkem gramnegativní bakterie a znázorňuje průnik a orientaci bazálního tělesa obou struktur skrz celou buněčnou stěnu. Převzato a upraveno (Portaliou *et al.*, 2016).

Přestože bakterie *B. pertussis* nese v genomu kompletní lokus *bsc* a sdílí významné homologie s lokusem *bsc* bakterie *B. bronchiseptica*, nebylo ještě donedávna zřejmé, jestli *B. pertussis* také využívá T3SS jako faktoru virulence v podmínkách *in vivo* a do jaké míry (či zda vůbec) je aktivní v podmínkách *in vitro* (Kerr *et al.*, 1999; Fauconnier *et al.*, 2001).

Fennelly *et al.* (2008) následně popsali funkční T3SS u bakterie *B. pertussis* a pozorovali u kmenů s inaktivovaným T3SS v porovnání s divokým typem sníženou schopnost kolonizovat dýchací ústrojí myši. Tento jev však nebyl pozorován u laboratorních kmenů *B. pertussis* (kmen Tohama I), ale pouze u klinických izolátů. Jedná se však o ojedinělé pozorování, T3SS totiž není jako faktor virulence bakterie *B. pertussis* věnováno v literatuře příliš pozornosti.

Bylo také prokázáno, že exprese genů lokusu *bsc* je závislá na podmínkách, ve kterých je *B. pertussis* kultivována. V případě pasážování klinických izolátů *B. pertussis* v podmínkách *in vitro* přestává být T3SS funkční, ačkoliv podstata tohoto jevu nebyla na molekulární úrovni doposud objasněna. Některé studie však ukazují, že k obnovení funkce T3SS stačí kontakt s hostitelskou buňkou či s krví, resp. s krevním sérem hostitele. Přímý důkaz tohoto jevu, či definice konkrétních faktorů ovlivňujících sekreci pomocí T3SS, chybí. Jako znak používaný pro důkaz sekrece pomocí T3SS je běžně používána imunochemická detekce proteinu Bsp22, který je sekretován výhradně pomocí T3SS (Gaillard *et al.*, 2011; Bibova *et al.*, 2015; Gestal *et al.*, 2018). Mimo to bylo pozorováno, že aktivitu T3SS bakterie *B. pertussis* (vč. laboratorního kmene Tohama I) lze v podmínkách *in vitro* pozitivně ovlivnit i kultivací této bakterie v živném médiu obsahujícím limitující množství iontů železa či glutamátu (Brickman *et al.*, 2011; Hanawa *et al.*, 2016).

### 3.3.2.2 Proteiny sekretované pomocí T3SS

Doposud nebylo objasněno, jaké všechny proteiny jsou transportovány pomocí T3SS a jakou mají funkci v hostitelském organismu. Mezi sekretované proteiny bezesporu patří **BopB**, **BopD** a **Bsp22**. Tyto strukturní proteiny pravděpodobně hrají roli pouze ve výstavbě *translokonu*, póru spojujícího špičku T3SS s cytolem hostitelské buňky. Jsou proto nezbytné pro správnou funkci T3SS, ale nemají funkci efektorových proteinů. Protein Bsp22 byl u bakterie *B. bronchiseptica* popsán jako protektivní antigen, proti kterému v myším modelu vznikají specifické protilátky účinné v potlačení infekce. V případě proteinu Bsp22 bakterie *B. pertussis* (97% homologie s *B. bronchiseptica*) však tyto imunogenní vlastnosti pozorovány nebyly (Nogawa *et al.*, 2004; Medhekar *et al.*, 2009; Villarino Romero *et al.*, 2013).

Jediným doposud známým efektozem sekretovaným pomocí T3SS je u bakterií rodu *Bordetella* cytotoxický protein **BopC** (též BteA). V případě bakterie *B. bronchiseptica* byl pozorován negativní vliv tohoto proteinu na fagocytózu zprostředkovanou makrofágy. Děje se tak narušením signální dráhy zajišťující polymerizaci aktinu. Bakterie tímto způsobem narušuje funkci imunitního systému a vyhýbá se fagocytóze (Panina *et al.*, 2005; Kuwae *et al.*,

2016). Není však vyloučeno, že efektor BopC a obecně T3SS hraje ve virulenci v případě druhu *B. pertussis* rozdílnou roli než u druhu *B. bronchiseptica*.

Dalším, poněkud kontroverzním proteinem, sekretovaným pomocí T3SS, je protein **BopN**, který je v různém kontextu považován za efektor. Přestože již bylo prokázáno, že je protein BopN sekretován pomocí T3SS, nebylo doposud jednoznačně popsáno, jaká je jeho biologická funkce. V literatuře mu byly doposud přiřazeny různé funkce: regulace sekrece pomocí T3SS; samostatně působící cytotoxický efektor; protein podílející se na cytotoxické aktivitě v synergii s efektem BopC. Navzdory těmto nejasnostem je zřejmé, že se v hostitelském organismu přímo či nepřímo podílí na navození zvýšené produkce IL-10 (což má za následek potlačení zánětlivé odpovědi) a na cytotoxicitě zprostředkované pomocí T3SS (Nagamatsu *et al.*, 2009; Abe *et al.*, 2017).

Mezi proteiny sekretované pomocí T3SS je potřeba zařadit také protein **BtrA** (též BspR). V souvislosti s mutací genu *btrA* byl u bakterie *B. bronchiseptica* pozorován zajímavý fenotyp. Tento kmen nebyl schopen produkovat důležité faktory virulence (ACT, FHA a Prn) a vykazoval obecně nižší virulenci, na druhou stranu tento kmen vykazoval v porovnání s divokým typem masivní sekreci pomocí T3SS a jeho cytotoxicita závislá na T3SS byla vyšší (Kurushima *et al.*, 2012). Protein BtrA byl však později charakterizován jako regulační protein (diskutováno v následující kapitole) a jeho sekrece proto může být součástí mechanismu regulace jím zprostředkované.

### 3.3.2.3 Regulace T3SS

Sekreční systém typu 3 spadá do regulonu BvgAS. Tak jako u řady jiných faktorů virulence, exprese a funkce T3SS je regulována dalšími mechanismy podřadnými systému BvgAS. Jedním z nedávno popsaných mechanismů regulace T3SS u *B. bronchiseptica* i *B. pertussis* je řízen na principu extracytoplasmatického sigma faktoru (ESF), konkrétně BtrS a jeho anti-sigma faktoru (ASF), BtrA. Oba proteiny jsou kódovány v lokusu *btr*, který přímo navazuje na lokus *bsc*. Regulační systém BtrS-BtrA ovlivňuje pozitivně i negativně expresi několika desítek až stovek genů, které většinou souvisejí s T3SS nebo s jinými povrchovými strukturami. Nedávno byl také popsán význam ASF BtrA pro navození kašle v krysím modelu infekce. Výzkum kmenů *B. pertussis* mutantních v genu *btrA* dále prokázal cytotoxickou aktivitu závislou na T3SS a efektoru BopC. Zdá se tedy, že ASF BtrA je mimo jiné do značné míry zodpovědný za potlačení funkce T3SS u *B. pertussis*. Zůstává však otázkou, které faktory mají

vliv na ustanovení rovnováhy systému BtrS-BtrA jak v podmínkách *in vitro*, tak *in vivo*, a které geny tento regulační systém ovlivňuje (Ahuja *et al.*, 2016; Nakamura *et al.*, 2019).

Vedle systémů BvgAS a BtrS-BtrA hraje roli v regulaci T3SS pravděpodobně také regulace genové exprese na post-transkripční úrovni zprostředkovaná malými nekódujícími RNA (sRNA). To bylo zjištěno při studiu RNA chaperonu Hfq, který obecně v bakteriální buňce váže různé molekuly sRNA a mRNA a zprostředkovává jejich specifickou interakci, čímž ovlivňuje míru translace daného genu. V případě *B. pertussis* byl pozorován význam chaperonu Hfq mimo jiné v produkci některých faktorů virulence (PT, ACT, či FHA), odolnosti vůči komplementu či přežívání během infekce v myším modelu. Zároveň byla u kmene *B. pertussis* neprodukujícího Hfq pozorována neschopnost sekrece pomocí T3SS (Bibova *et al.*, 2013; Bibova *et al.*, 2015; Dienstbier *et al.*, 2019). Konkrétní molekuly sRNA a jejich úloha v regulaci virulence či sekrece pomocí T3SS však doposud identifikovány nebyly.

Na základě současného poznání je patrné, že většina výsledků ohledně funkce T3SS byla získána u příbuzné bakterie *B. bronchiseptica* a význam, regulace či role T3SS v patogenezi *B. pertussis* nejsou jasné. V tomto kontextu měl být v této diplomové práci studován gen *BP0209* bakterie *B. pertussis*, jehož produktu byla bioinformatickými metodami přiřazena role regulátoru transkripce patřícího do rodiny GntR, nicméně tato hypotéza nebyla doposud experimentálně ověřena. Na základě studia transkripčního profilu *B. pertussis* Tohama I po předchozí infekci v myším modelu byla vytvořena hypotéza dávající do souvislosti tento gen s funkcí T3SS. Je také možné, že samotný gen *BP0209* vyžaduje ke své vlastní expresi chaperon Hfq, jelikož jeho mRNA byla identifikována v nadbytku pouze v divokém typu po infekci myšího modelu, ne však u mutantního kmene s delecí genu *hfq* (Bibova *et al.*, 2015; Amman *et al.*, 2018). Hypotézu navíc podporují nedávná zjištění, že exprese genů v lokusu kódujícím T3SS patogenních bakterií rostlin (označovaný jako *hrp*) je regulována transkripčním faktorem patřícím právě do rodiny GntR (Tsuge *et al.*, 2006). V genomu kmene *B. pertussis* Tohama I je však gen *BP0209* obklopen sekvencemi IS481 a delece tohoto genu je proto technicky náročná, ne-li vyloučená. Z toho důvodu byla souvislost *BP0209* s aktivitou T3SS studována na jeho homologu *BB0302* bakterie *B. bronchiseptica* RB50.

### 3.3.3 Odolnost vůči účinkům komplementu

#### 3.3.3.1 Komplement

Krevní sérum je nebuněčná složka krve obsahující širokou paletu anorganických a organických látek, mezi které patří i komplement. Komplement je součástí humorální složky nespecifické imunity lidského organismu. Konkrétně se jedná o několik desítek sérových proteinů, které jsou standardně označovány velkým písmenem „C“ (z anglického *complement*) s následnou arabskou číslicí „1-9“, za kterou může ještě následovat další specifikace, o jakou podjednotku proteinu se jedná (např. C3a). Proteiny komplementu spolu za daných podmínek vzájemně interagují a tvoří jakousi síť zvanou kaskáda komplementu. Přestože je funkce komplementu na molekulární úrovni dnes již kvalitně prostudována, pro stručný popis jeho složení, funkce a významu pro imunitní odpověď hostitelského organismu vychází tato diplomová práce převážně z dnes již obecně známých faktů publikovaných v souhrnných odborných učebnicích Janeway's Immunobiology (Murphy K. M. *et al.*, 2008) a Immunology (Male D. *et al.*, 2006) místy doplněných o některé současné poznatky.

Přestože je komplement obsažen v krevním séru, je potřeba si uvědomit, že sérum je v lidském organismu vylučováno z krve mimo jiné i na sliznice dýchacího ústrojí, které přicházejí do styku s patogenními mikroorganismy. Mezi klíčové funkce komplementu patří opsonizace, tvorba lytického póru v membráně mikroorganismů a chemotaxe některých leukocytů k místu zánětu. V kontextu této diplomové práce je nejdůležitější funkcí komplementu tvorba lytického póru běžně označovaného zkratkou MAC (*membrane attack complex*), přestože hlavní význam komplementu v obraně hostitelského organismu proti infikujícím mikroorganismům tkví především v opsonizaci a chemotaxi.

Pro dosažení zmíněných funkcí musí být nejprve komplement aktivován. Děje se tak buď vazbou na různé antigenní struktury, nebo samovolně. Doposud byly popsány tři způsoby aktivace komplementu. Schematicky jsou znázorněny na straně č. 32 (Obrázek č. 4). Chronologicky první byla popsána tzv. **klasická cesta** (CP z anglického *classical pathway*), která je aktivována proteinovým komplexem C1. Tento komplex je tvořen hexamerem C1q a dvěma dvojicemi proteinů C1r a C1s. Celý komplex vyžaduje pro svou funkci a stabilitu vápenaté kationty. Protein C1q má schopnost vázat se na povrchy opsonizované pomocí protilátek (především IgA a IgM), nebo pomocí tzv. proteinů akutní fáze (C-reaktivní protein (CRP), či sérový amyloid P). Vazba proteinového komplexu C1 k opsoninu vede ke konformační změně kvartérní struktury proteinu, jejíž výsledkem je aktivace serinových

proteáz C1r a C1s. Takto aktivovaný komplex C1 dále štěpí proteiny C2 a C4. Vzniklé fragmenty C4b a C2a se vážou na napadený antigenní povrch a vytvářejí komplex C4bC2a, též zvaný klasická C3-konvertáza, který dále efektivně štěpí proteiny C3. Vzniklé fragmenty C3b se následně ve velkém množství přichytávají k antigennímu povrchu, zatímco fragmenty C3a slouží k chemotaxi fagocytů. Kombinací klasické C3-konvertázy a proteinu C3b vzniká enzym C4bC3bC2a neboli klasická C5-konvertáza.

**Lektinová cesta** aktivace komplementu (LP z anglického *lectin pathway*) je svým mechanismem velice podobná CP. Namísto komplexu C1 však na jejím počátku stojí komplex vázající se na antigenní sacharidové struktury mikroorganismů. Tento komplex je strukturně a funkčně velice podobný komplexu C1. Sestává se ze sérového lektinu vázajícího manózu (MBL) a dvou dvojic serinových proteáz asociovaných s MBL (MASP-1 a MASP-2). Vazbou MBL na cílové místo jsou proteázy aktivovány a štěpí proteiny C2 a C4 za vzniku C3-konvertázy a následně C5-konvertázy.

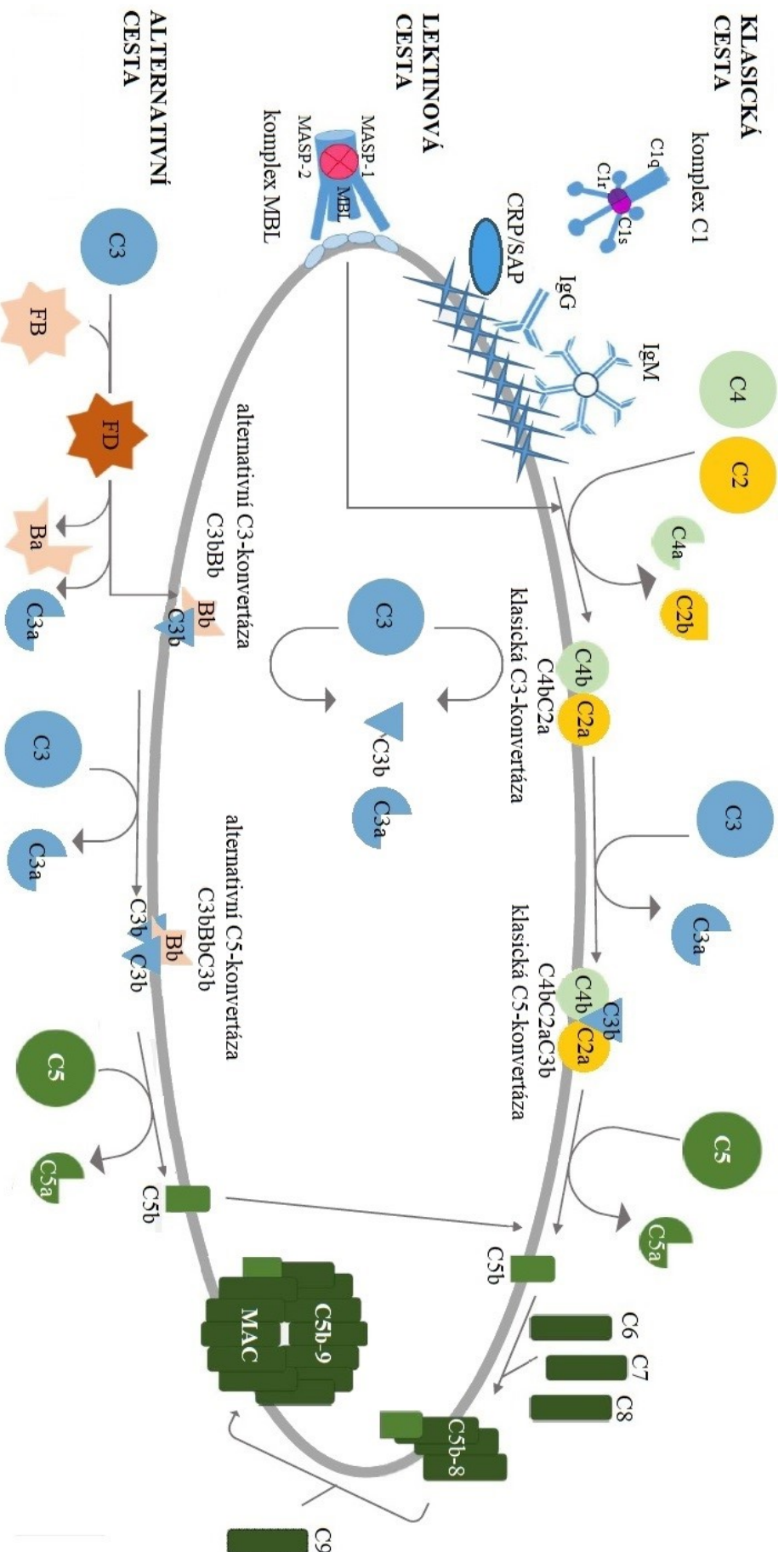
Na rozdíl od CP a LP **alternativní cesta** (AP z anglického *alternative pathway*) nepotřebuje ke své aktivaci přítomnost protilátek ani jiných antigenních struktur. Protein C3 totiž může být štěpen spontánně za přítomnosti tzv. faktorů B a D. Fragment C3b se po rozštěpení váže na antigenní povrch spolu s faktorem B, který je faktorem D štěpen na fragmenty Bb a Ba za vzniku komplexu C3bBb neboli alternativní C3-konvertázy. Přichycením dalšího fragmentu C3b k alternativní C3-konvertáze vzniká analogicky jako v případě CP enzymatický komplex C3bBbC3b neboli alternativní C5-konvertáza.

Výsledkem štěpení proteinů komplementu bývají zpravidla dva fragmenty. Větší fragment bývá dále vázán na antigenní povrch, zatímco menší zůstává solubilní a slouží následně jako chemoatraktant, zprostředkovatel zánětu či spouštěč fagocytové aktivity makrofágů apod. Ať už je komplement aktivován jakýmkoliv způsobem, výsledkem je vždy sestavení C3-konvertázy a následně C5-konvertázy, která stojí na počátku tvorby MAC.

Přestože je **MAC** a jeho fatální účinky na buňku známé již několik desetiletí, teprve nedávno byl detailně popsán způsob, jakým MAC vzniká. Protein C5 je štěpen C5-konvertázou za vzniku fragmentu C5a a C5b. Pro narušení bakteriální buněčné stěny je nezbytně nutné, aby byl fragment C5b v místě štěpení C5-konvertázou ihned včleněn do membrány a neprodleně interagoval s proteiny C6 a C7 za vzniku komplexu C5bC6C7 umístěného v membráně. Následně je ke komplexu C5bC6C7 připojen i proteinový komplex C8, který v membráně

umožňuje následnou polymeraci 10–16 molekul proteinu C9. Polymerací proteinu C9 vzniká v membráně pór o průměru asi 100 Å, což je pro představu zhruba 10x více, než je průměr běžných porinů gramnegativních bakterií. V případě gramnegativních bakterií vzniká MAC pouze ve vnější membráně a následkem jeho tvorby je pravděpodobně narušena i vnitřní membrána bakterie. Navzdory nedávným diskusím není pro překonání vrstvy peptidoglykanu zapotřebí lysozymu ani jiných obdobných enzymů. Vznik takto robustního kanálu vedeného oběma membránami znamená pro napadenou buňku smrt v důsledku rozvratu iontové rovnováhy a protonového gradientu mezi cytoplasmou a vnějším okolím buňky (Heesterbeek *et al.*, 2019). Tvorba MAC byla prokázána i u různých grampozitivních bakterií, přestože byly donedávna pro svou silnou vrstvu peptidoglykanu považovány vůči tvorbě MAC za odolné. Bylo prokázáno, že se protein C3b přichytává náhodně po celém povrchu grampozitivních bakterií, ale tvorba MAC je pro každý studovaný bakteriální druh místně specifická. Není však doposud jisté, jestli má tento jev přímo vliv na ničení grampozitivních buněk v podmínkách *in vivo*, ani není zřejmé, jak k vystavění MAC v membráně pod vrstvou peptidoglykanu dochází (Berends *et al.*, 2013). Je ale nutno podotknout, že díky odolnosti řady patogenních bakterií vůči působení komplementu pravděpodobně ve skutečnosti k tvorbě MAC nedochází příliš často. Větší význam komplementu v obraně hostitelského organismu proti infikujícím mikroorganismům pravděpodobně tkví především v jeho osponizační a chemotaktické funkci.

Pro svou širokou účinnost a omezenou specifitu musí být aktivita komplementu hostitelským organismem **regulována** na mnoha úrovních. Zejména v případě AP může docházet k aktivaci komplementu a vzniku zánětu na libovolných površích organismu, ať už se jedná o buňky organismu vlastní, buňky mikroorganismů či různé implantáty apod. Tělu vlastní tkáně jsou proto vybaveny ochrannými mechanismy, které brání rozvoji kaskády komplementu. Pro představu jeden z prvních popsaných mechanismů regulace komplementu je zprostředkován pomocí tzv. faktoru urychlujícího rozklad (DPF), který je v membráně hostitelských buněk ukotven pomocí glykofosfatidylinositolové (GPI) kotvy. DPF významně urychluje rozpad spontánně vznikajících C3 a C5-konvertáz, čímž zabraňuje nežádoucímu rozvoji kaskády komplementu, tvorbě MAC a následnému autoimunitnímu poškození tkáně (Medof *et al.*, 1984; Fujita *et al.*, 1987). Na obdobném principu funguje řada dalších regulátorů. Mezi nejběžnější z nich patří C4BP, faktor-H a C1inh, které budou v kontextu odolnosti buněk *B. pertussis* dále diskutovány v kapitole 3.3.3.3.



**Obrázek č. 4**

Schema kaskády komplementu aktivované klasickou (CP), lektinovou (LP) i alternativní (AP) cestou zakončené sestavením lytického póru (MAC) v buněčné stěně bakterie. **CP** je aktivována komplexem C1, který rozeznává protilátky či reaktanty akutní fáze vázané na povrchu bakterie. Komplex C1 štěpí proteiny C2 a C4 za vzniku klasické C3-konvertázy (C4bC2a). Ta dále štěpí protein C3. Fragment C3a se uvolňuje do okolí jako chemoatraktant buněk IS; fragment C3b opsonizuje buňku, nebo dává vzniknout klasické C5-konvertáze (C4bC2aC3b). **LP** má totožný průběh jako CP, namísto komplexu C1 však začíná komplexem MBL, který na povrchu bakterie rozeznává antigenní sacharidové struktury obsahující manózu. **AP** začíná samovolným štěpením proteinu C3 za účasti faktorů B a D (FB a FD). Kombinací C3 a FB vzniká alternativní C3-konvertáza (C3bBb), která je svou funkcí totožná s klasickou C3-konvertázou. Přidáním dalšího fragmentu C3b vzniká alternativní C5-konvertáza. C5-konvertáza (nezávisle na cestě aktivace) štěpí protein C5. Fragment C5b následně v buněčné stěně bakterie interaguje s proteiny C6, C7 a C8. Vzniklý komplex C5b-8 umožňuje polymerizaci 10–16 molekul proteinu C9 za vzniku **MAC**. Převzato a upraveno (Thiriar *et al.*, 2018).



Kromě molekulární podstaty přímé baktericidní funkce komplementu a jeho regulace se výzkum v posledních několika desetiletích hojně soustředí také na studium významu komplementu pro hostitelský organismus, jako je udržování homeostázy, regenerace tkání a v neposlední řadě na autoimunitní choroby a patologie spojené s jeho disfunkcí, jako je astma, nemoci ledvin, revmatoidní artritida a další. Pozornost je věnována také souvislostem mezi komplementem a nádorovými nemocemi i možnostem využití komplementu k jejich léčbě (Ricklin *et al.*, 2010; Mathern a Heeger, 2015).

### 3.3.3.2 Test odolnosti vůči séru – SKA

Test odolnosti vůči účinkům séra (SKA z anglického *serum killing assay*) je laboratorní metoda běžně užívaná ke zjištění míry citlivosti bakteriálních buněk vůči baktericidním účinkům krevního séra, resp. komplementu v podmínkách *in vitro*. Tato metoda je založena na kultivaci buněk pozorované bakterie v tekutém médiu, následné inkubaci známého množství těchto buněk s krevním sérem v určitém časovém období a zjištění množství přeživších buněk provedené nejčastěji kultivací na pevném médiu.

V rámci experimentů ověřujících citlivost bakterií vůči séru se lze v literatuře setkat s různými obměnami této metody. Lze např. upravit vstupní množství bakterií nebo dobu, koncentraci a složení séra, kterému jsou bakterie vystaveny. Metoda SKA použitá pro vypracování této diplomové práce vychází z protokolu, který popsaly Fernandez a Weiss (1994), které jako první pozorovaly změny citlivosti *B. pertussis* vůči séru v různých podmínkách *in vitro*. Přesný postup metody SKA použitý pro vypracování této diplomové práce je včetně schématu popsán v kapitole 4.2.2.

### 3.3.3.3 Odolnost *B. pertussis* vůči komplementu

Patogenní bakterie jako např. *B. pertussis* vyvinuly v průběhu evoluce řadu strategií, jak se během infekce hostitelského organismu vyhnout nežádoucím účinkům komplementu a tvorbě MAC. Nejčastěji se jedná o produkci vlastních biologicky aktivních látek blokujících řádnou funkci komplementu a maskování svého povrchu pomocí různých polysacharidů či glykoproteinů s cílem zamezit rozeznávání antigenních struktur imunitním systémem. Často také bakterie využívají funkci hostitelských proteinů regulujících rozvoj kaskády komplementu. V průběhu posledních tří desetiletí bylo u bakterie *B. pertussis* popsáno hned několik mechanismů založených na těchto principech a budou diskutovány v této kapitole. Pro přehled slouží souhrnný obrázek na straně č. 41 (Obrázek č. 5).

## Autotransportéry

Vůbec poprvé byla schopnost *B. pertussis* odolat působení krevního séra připsána proteinům **BrkA** a **BrkB** kódovaných lokusem *brk* (*Bordetella resistance to killing*). Protein **BrkB** je velký 32 kDa a obsahuje šest hydrofobních domén, díky kterým slouží jako kanál umístěný ve vnitřní membráně bakterie. Pomocí tohoto kanálu je protein **BrkA** transportován do periplazmatického prostoru. Protein **BrkA** je velký 103 kDa a patří do proteinové rodiny autotransportérů. Na svém N-konci má signální peptid velký 42 aminokyselin, za kterým následuje  $\alpha$ -doména velká 73 kDa. Na C-konci se nachází  $\beta$ -doména velká 30 kDa, která se (typicky pro autotransportéry) zanořuje do vnější membrány bakterie a vytváří kanál ve tvaru beta-barelu. Takto vzniklý pór zajišťuje přenos  $\alpha$ -domény na vnější stranu membrány, k níž zůstává  $\alpha$ -doména pevně ukotvena. Bylo také zjištěno, že pro transport a ukotvení  $\alpha$ -domény na vnější stranu membrány je nezbytný 31–39 aminokyselin velký peptid, který spojuje obě domény dohromady. Bližší bioinformatická charakterizace proteinu **BrkA** odhalila sekvenční a strukturní podobnosti s pertaktinem (Prn), dalším povrchovým faktorem virulence *B. pertussis*. Oba proteiny např. obsahují adhezivní motiv RGD (Arg-Gly-Asp), ale v případě Prn nebyl prokázán vliv na citlivost *B. pertussis* vůči působení komplementu. Dále bylo prokázáno, že oba geny, *brkA* a *brkB*, mají v promotorové oblasti místo pro vazbu transkripčního regulátoru BvgA a spadají tak do regulonu BvgAS (Fernandez a Weiss, 1994; Shannon a Fernandez, 1999; Oliver *et al.*, 2003).

Co se týče biologické aktivity a vlivu proteinu **BrkA** na funkci komplementu, bylo pozorováno, že mutantní kmen *B. pertussis*, u kterého byl gen *brkA* odstraněn, vykazoval v myším modelu v porovnání s divokým typem nižší schopnost virulence. Obdobný fenotyp pochopitelně vykazoval i kmen neschopný produkce kanálu **BrkB** zajišťujícího transport proteinu **BrkA** na povrch buňky, kde **BrkA** působí. Dále bylo kromě odlišné citlivosti k séru při pokusech s tkáňovými kulturami buněčných linií HeLa (buňky lidského epitelu) a MRC-5 (lidské plicní fibroblasty) prokázáno, že tyto mutantní kmeny jsou k hostitelským buňkám méně adhezivní a hůře do nich pronikají. Byla také prověřena možnost společného účinku proteinu **BrkA** v kombinaci s jiným faktorem virulence *B. pertussis* (ACT, PT, FHA, DNT, TCT a Vag8), u žádného z nich však synergie účinku pozorována nebyla. Naopak vyšší odolnost vůči baktericidnímu účinku séra byla pozorována u kmene s přidanou kopií genů *brkA* a *brkB* na plazmidu a u současných klinických izolátů *B. pertussis*. Na základě těchto výsledků je protein **BrkA** považován za faktor virulence důležitý pro kolonizaci dýchacího ústrojí hostitelského organismu (Fernandez a Weiss, 1994; Fernandez a Weiss, 1998).

Selektivním vycytáváním vápenatých kationtů (nezbytných pro funkci komplexu C1) bylo zjištěno, že protein BrkA má negativní vliv právě na CP. Později bylo blíže specifikováno, že protein BrkA nebrání vazbě proteinového komplexu C1, ale přichycení proteinu C4b k membráně, čímž zamezuje vzniku klasické C3-konvertázy a následnému rozvoji kaskády komplementu – bakterie se tak vyhne nejen tvorbě MAC, ale i opsonizaci a produkci chemoatraktantů ve svém okolí. Přestože doposud nebyl objasněn mechanismus funkce proteinu BrkA, nabízí se hypotéza vazby proteinu BrkA s proteiny C4BP či C1inh, což jsou sérové proteiny hostitelského organismu účinkující v negativní regulaci rozvoje kaskády komplementu (Fernandez a Weiss, 1994; Barnes a Weiss, 2001). Je potřeba dodat, že autoři těchto studií nebrali v potaz LP, o níž se začalo uvažovat teprve na konci 20. století. Má-li tedy protein BrkA negativní vliv na ukládání proteinu C4b na membránu, je možné, že blokuje současně CP i LP. To bylo ověřeno později, kdy stejný výzkumný tým prokázal aktivaci kaskády komplementu v podmínkách *in vitro* pouze pomocí specifických protilátek. Byla tak vyloučena jak AP a LP, tak CP vedená vazbou proteinu C1 na povrch bakterie bez přítomnosti specifických protilátek. Současně byla opět potvrzena již diskutovaná funkce proteinu BrkA (Barnes a Weiss, 2003). Všechny dosavadní poznatky o odolnosti *B. pertussis* vůči komplementu však byly získány na základě pokusů vedených v podmínkách *in vitro* za použití kmenů *B. pertussis* dlouhodobě adaptovaných na laboratorní podmínky.

Jiná studie se proto zaměřila na porovnání funkce proteinu BrkA v podmínkách *in vitro* a *in vivo* v myším modelu. V těchto pokusech byla použita sada mutantů *brkA* zkonstruovaných v současných klinických izolátech *B. pertussis* i v laboratorním kmeni Tohama I. V podmínkách *in vitro* byla u všech mutantních kmenů pozorována zvýšená citlivost k séru, a to nezávisle na přítomnosti specifických protilátek. V podmínkách *in vivo* byly mutantní kmeny současných klinických izolátů schopné infekce dýchacích orgánů překvapivě stejně účinně, jako původní divoké typy. Mutantní kmeny odvozené od kmene Tohama I však byly v porovnání s divokým typem významně omezené co do schopnosti infekce myších dýchacích orgánů. Tento rozdíl mezi mutantním a divokým typem kmenů odvozených od kmene Tohama I byl ale pozorován i u myší neprodukcujících protein C3. Je proto otázkou, jaký má protein BrkA význam pro tyto kmeny v infekci dýchacích orgánů. Současně bylo touto cestou zpochybněno, jestli má protein BrkA význam v odolnosti vůči séru v podmínkách *in vivo* v případě současných klinických izolátů *B. pertussis* (Elder a Harvill, 2004). Otázkou je také vypovídací hodnota pokusů provedených na myším modelu v případě striktně lidské patogenní bakterie, jakou je *B. pertussis*. Obecně však platí, že citlivost *B. pertussis* k baktericidnímu

působení komplementu je v podmínkách *in vitro* závislá na řadě okolností a může se proto významně lišit od podmínek *in vivo*. V podmínkách *in vitro* mimo jiné záleží na způsobu kultivace buněk, koncentraci a typu použitého séra, přizpůsobení daného kmene na laboratorní podmínky kultivace a také na fázi růstu, ve které se buněčná kultura použitá pro zjištění citlivosti daného kmene *B. pertussis* k séru nachází. Buňky ve stacionární fázi růstu jsou totiž o dva až tři řády odolnější než buňky v exponenciální fázi růstu. Tento jev však není závislý ani na produkci proteinu BrkA, ani na tom, v jaké fázi virulence ( $Bvg^{+/i/-}$ ) se buňky nacházejí (Barnes a Weiss, 2002; Pishko *et al.*, 2003).

Kromě proteinu BrkA byly v nedávné době popsány další dva autotransportéry, BapC a Vag8, které mají vliv na vyšší odolnost buněk *B. pertussis* vůči působení séra. Protein **BapC** (*Bordetella autotransporter protein-C*) byl objeven a následně studován díky sekvenční podobnosti s ostatními autotransportéry, přestože byl gen *bapC* původně anotován jako pseudogen. Vlastnosti tohoto proteinu zatím nebyly příliš detailně studovány, připomínají však vlastnosti připisované proteinu BrkA. Protein BapC je regulován dvoukomponentovým systémem BvgAS. Je ukotven ve vnější membráně buněčné stěny *B. pertussis* a stejně jako protein BrkA pravděpodobně blokuje doposud neobjasněným mechanismem aktivaci komplementu klasickou cestou závislou na přítomnosti specifických protilátek. Kromě odolnosti vůči séru má protein BapC pravděpodobně vliv i na adhezi k povrchu makrofágů (buněčná linie P-388 D-1) a podporuje virulenci *B. pertussis* v myším modelu (Noofeli *et al.*, 2011; Bokhari *et al.*, 2012; Riaz *et al.*, 2015).

Posledním z doposud popsaných autotransportérů, které mají pozitivní vliv na odolnost bakterie *B. pertussis* vůči séru, je protein **Vag8** (*virulence activated gene-8*). Jedná se o 95 kDa velký protein spadající do regulonu BvgAS. První pokusy o charakterizaci tohoto proteinu ukázaly sekvenční podobnost s autotransportéry, jako jsou např. BrkA a Prn, a to především v C-koncové doméně kotvící protein do vnější membrány buněčné stěny. Původně však význam ve virulenci *B. pertussis* včetně odolnosti vůči séru pozorován nebyl (Fernandez a Weiss, 1998; Finn a Amsbaugh, 1998). Později bylo ukázáno, že protein Vag8 má schopnost vázat protein C1inh, inhibitor serinových proteáz. Tento sérový protein v hostitelském organismu zajišťuje negativní regulaci proteinů C1 a MBL, iniciátorů aktivace CP a LP. *B. pertussis* váže protein C1inh ke svému povrchu pomocí proteinu Vag8 a zneužívá jeho regulační funkce k narušení aktivace komplementu (Marr *et al.*, 2011). Další výzkum přiblížil způsob, jakým *B. pertussis* pravděpodobně využívá interakce proteinu Vag8 s proteinem

C1inh. Buňky *B. pertussis* jsou schopny vylučovat tzv. váčky vnější bakteriální membrány (OMV z anglického *outer membrane vesicles*), v jejichž membráně jsou nejpočetněji zastoupeny proteiny Vag8 (34 %) a BrkA (24 %). Současně může být  $\alpha$ -doména autotransportéru Vag8 jednoduše uvolněna z membrány do okolního prostředí. Těmito dvěma způsoby se protein Vag8 dostává do blízkého okolí buněk *B. pertussis*, kde vlivem proteinu C1inh vázaného s proteinem Vag8 dochází k rozpadu proteinových komplexů C1 a MBL. Rozpad těchto komplexů znamená uvolnění a aktivaci proteolytických podjednotek C1r a C1s, resp. MASP-1 a -2, které následně „v bezpečné vzdálenosti“ od bakterie aktivují proteiny C2 a C4. Díky tomu dochází k celkovému snížení koncentrace zmíněných proteinů komplementu v blízkém okolí buněk *B. pertussis*, které jsou tak chráněny před vznikem C3-konvertázy a rozvojem kaskády komplementu na svém povrchu (Raeven *et al.*, 2015; Hovingh *et al.*, 2017).

### Hostitelské regulační proteiny komplementu

Jeden z mechanismů, pomocí kterého bakterie *B. pertussis* využívá hostitelských proteinů regulujících rozvoj kaskády komplementu v obraně proti baktericidnímu působení séra, byl popsán v předchozí kapitole. Kromě OMV a proteinu Vag8, který váže regulační protein C1inh, bylo pozorováno, že *B. pertussis* váže regulační sérový protein blokující vznik klasické C3-konvertázy, C4BP, pomocí dalšího faktoru virulence, **filamentózního hemagglutininu** (FHA). FHA je povrchový protein spadající do regulonu BvgAS. Přestože FHA váže protein C4BP, nebyla v podmínkách *in vitro* u mutantního kmene *B. pertussis* neprodukujícího FHA pozorována zvýšená citlivost k působení séra. Přesná role proteinu FHA v odolnosti *B. pertussis* vůči séru tak zůstává neobjasněna (Berggard *et al.*, 1997; Fernandez a Weiss, 1998; Berggard *et al.*, 2001).

Dalším hostitelským regulátorem komplementu, který pravděpodobně *B. pertussis* váže ke svému povrchu a následně používá v obraně vůči alternativní cestě aktivace komplementu, je faktor-H, jehož funkcí je odstranění proteinu C3b z povrchu bakterie. Až na nepodložené spekulace však doposud nebyl popsán mechanismus, kterým *B. pertussis* faktor-H váže, ani molekula, která by tuto vazbu zajišťovala (Amdahl *et al.*, 2011; Meri *et al.*, 2013). Tato fakta popisující využívání hostitelského aparátu regulujícího aktivaci komplementu jdou také ruku v ruce s pozorováním, že *B. pertussis* zvyšuje v průběhu infekce v myším modelu svou odolnost vůči komplementu aktivovanému alternativní cestou (Pishko *et al.*, 2003).

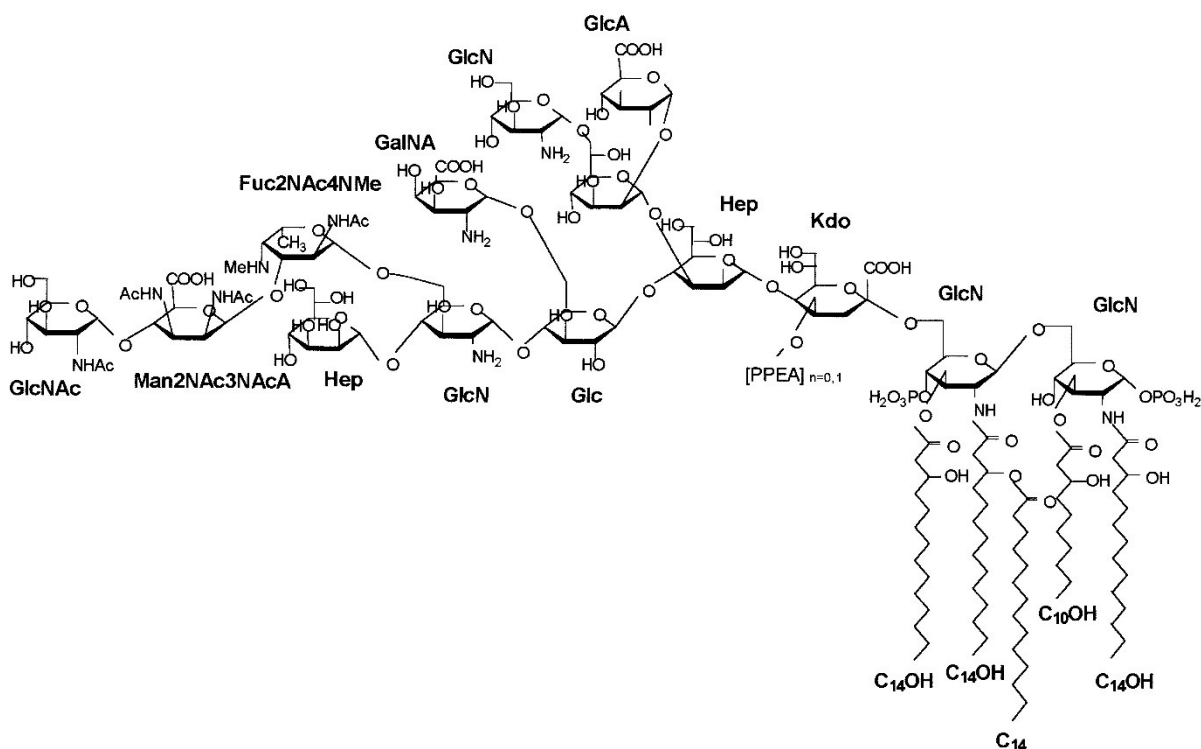
## Struktura buněčné stěny – lipopolysacharidy, kapsule a biofilm

V současnosti je odolnost *B. pertussis* vůči působení komplementu považována spíše za komplexní vlastnost, kterou zajišťuje souhra různých faktorů virulence s odlišnou biologickou aktivitou. Významný vliv na odolnost této bakterie vůči séru mají i lipopolysacharidy (LPS) a další polysacharidy vyskytující se na povrchu vnější membrány buněčné stěny *B. pertussis*.

Na rozdíl od bakterií *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*, které produkují kompletní LPS typický pro vnější membránu gramnegativních bakterií (tj. lipid A sloužící k ukotvení LPS do vnější membrány pomocí mastných kyselin; jádro polysacharidu tvořené několika různými sacharidy a variabilní O-antigen, který je zpravidla tvořen opakujícím se motivem oligosacharidů), buňky *B. pertussis* produkují pouze zkrácený LPS bez O-antigenu. Tento rozdíl má relativně komplexní význam pro vlastnosti buněk a hraje mimo jiné roli v jejich citlivosti k baktericidnímu působení séra. Zatímco *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis* jsou díky produkci O-antigenu v podmínkách *in vitro* odolné vůči působení 90% naivního králíčího séra (tzn. bez specifických protilátek) po dobu 1 hodiny, divoký typ *B. pertussis* neprodukuje O-antigen v těchto podmínkách nepřežívá. Použití séra obsahujícího specifické protilátky však prokázalo, že O-antigen nehraje roli v ochraně proti rozvoji kaskády komplementu aktivované pomocí protilátek, tzn. CP. Stejně tak nebyl v citlivosti vůči séru pozorován význam ani koncového trisacharidu, který na konci LPS produkuje i *B. pertussis*. V případě bakterie *B. bronchiseptica* bylo pozorováno, že přechod do virulentní fáze Bvg<sup>+</sup> provází zkrácení O-antigenu. Výhodou zkrácení či úplné absence O-antigenu (jako je tomu v případě *B. pertussis*) může být umožnění kontaktu jiných faktorů virulence nacházejících se na povrchu buňky s buňkami hostitelského organismu (adheziny, sekreční systémy, imunomodulační proteiny apod.). Buňka s netradičním LPS (např. bez O-antigenu) se může také snáz vyhnout vazbě méně specifických opsoninů, jako jsou proteiny akutní fáze (CRP či sérový amyloid P) apod. (Preston *et al.*, 1999; Harvill *et al.*, 2000; Barnes a Weiss, 2003; Burns *et al.*, 2003).

Konkrétně LPS bakterie *B. pertussis* je tvořen sadou atypických sacharidů a neobsahuje manózu (Obrázek č. 6). Neumožňuje proto aktivaci komplementu lektinovou cestou. Tato struktura je v jistém smyslu dvousečnou zbraní, jelikož může sloužit jako obrana proti AP a LP, ale současně může být cílem specifických protilátek, čili CP (Caroff *et al.*, 2000). Někteří autoři navíc v podmínkách *in vitro* pozorovali citlivost *B. pertussis* i vůči naivnímu séru (Harvill *et al.*, 2000). Tato rozdílná pozorování lze do značné míry vysvětlit drobnými odchylkami v podmínkách, za kterých byly pokusy prováděny, jak již bylo diskutováno dříve.

Nedávno bylo také pomocí elektronové mikroskopie potvrzeno, že buňky *B. pertussis* produkují v avirulentní fázi (Bvg<sup>-</sup>) kolem své buněčné stěny tenké pouzdro, tzv. kapsuli. Nebylo však pozorováno, že by přítomnost kapsule zlepšovala adhezi k savčím buňkám nebo že by chránila buňky před fagocytózou či baktericidním působením séra (Neo *et al.*, 2010). Význam kapsule v patogenezi *B. pertussis* je tak stále neobjasněn. Není ani vyloučeno, že by kapsule hrála roli v krátkodobém přežívání mimo hostitele.



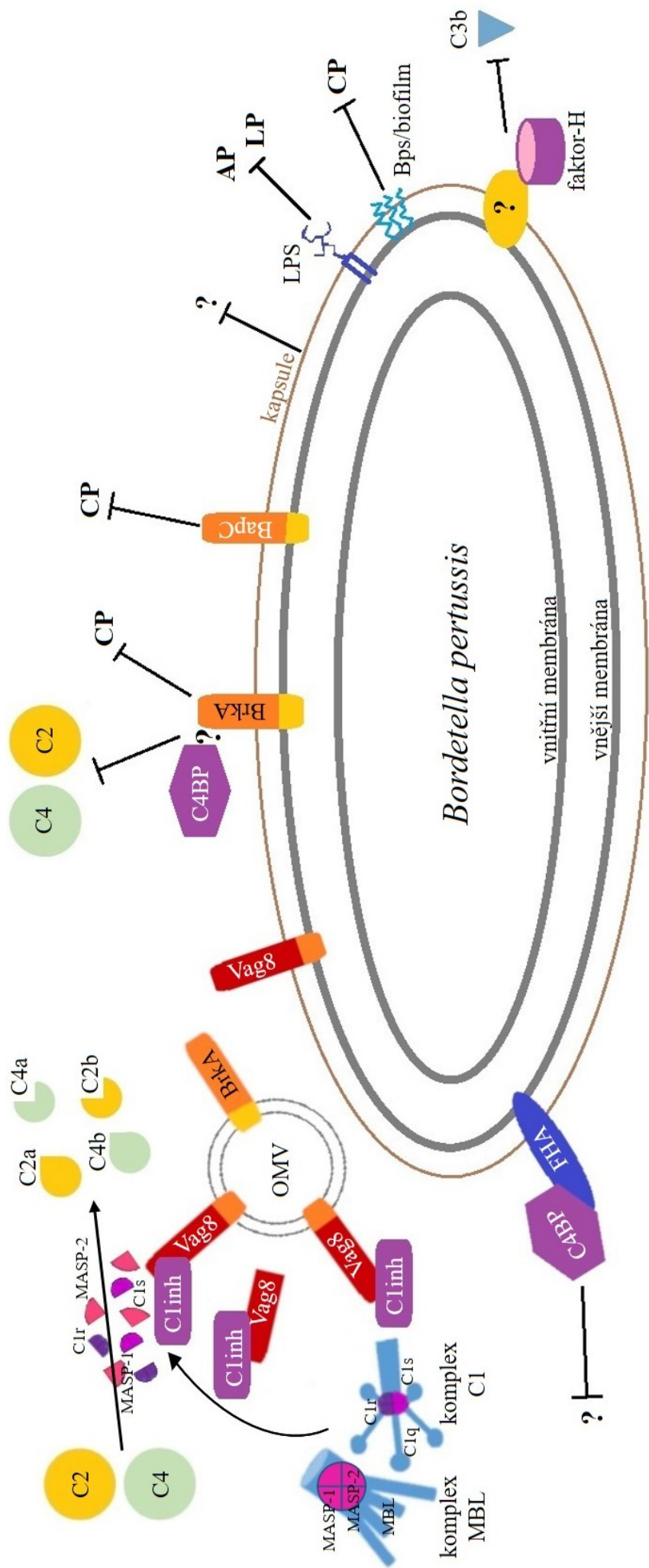
**Obrázek č. 6** Struktura LPS bakterie *B. pertussis* kmen 1414. Narozdíl od typických gramnegativních bakterií je molekula LPS poměrně krátká, neobsahuje totiž O-antigen. Převzato a upraveno (Caroff *et al.*, 2000).

Bakterie *B. pertussis* také produkuje polysacharid zvaný **Bps** (*Bordetella polysaccharide*). Svou strukturou je podobný poly-β-1,6-N-acetylglukosaminům produkovaným dalšími druhy bakterií. Jeho produkce je u bakterie *B. pertussis* nezbytná pro tvorbu biofilmu a kolonizaci horního dýchacího ústrojí v myším modelu. Biofilm se zdá být důležitý jak v počáteční fázi infekce, tak pro dlouhodobější přežívání i v imunizovaném hostiteli, kterého může bakterie využívat jako svého rezervoáru. Produkce biofilmu tvořeného polysacharidem Bps také zvyšuje odolnost *B. pertussis* vůči baktericidnímu účinku komplementu aktivovaného klasickou cestou. Tento obranný mechanismus pravděpodobně zabraňuje usazování proteinů C3b a C4b k bakteriálnímu povrchu a následnému rozvoji kaskády komplementu závislé na přítomnosti proteinového komplexu C1 (Sloan *et al.*, 2007; Conover *et al.*, 2010; Ganguly *et al.*, 2014).

Zajímavostí je, že aparát produkující polysacharid Bps je kódován operonem *bpsABCD*, který nespadá do regulonu BvgAS. Negativní regulace transkripce tohoto operonu je řízena proteinem BpsR, který se váže přímo do oblasti promotoru *bpsABCD*, kde působí jako represor transkripce. Význam BpsR v regulaci genové exprese je však u klasických druhů *Bordetella* pravděpodobně podstatně širší. V posledních letech je protein BpsR hojně studován v bakteriálním modelu *B. bronchiseptica*, kde ovlivňuje nejen produkci biofilmu zajišťujícího schopnost přežívání v savčím hostiteli, ale má také vliv na pohyblivost, virulenci a schopnost adheze bakterie. Aktivita BpsR je přímo závislá na přítomnosti kyseliny nikotinové (vitamin B<sub>3</sub>), která je současně úzce spojená s energetickým metabolismem a regulací virulence buňky (Conover *et al.*, 2012; Guragain *et al.*, 2018; Booth *et al.*, 2019).

Vzhledem k dosavadnímu výzkumu není zatím význam LPS a biofilmu v obraně proti IS hostitelského organismu zcela pochopen. Je však zřejmé, že přítomnost LPS ve vakcínách zásadně zhoršuje jejich vedlejší účinky. Proto nejsou LPS vhodným antigenem k očkování navzdory potenciálnímu vzniku protilátek specifických proti *B. pertussis* v očkovaném organismu (Mattoo a Cherry, 2005). Přestože se některé studie rozcházejí v názoru na citlivost různých kmenů *B. pertussis* vůči naivnímu séru, obecně se všechny shodují na podstatném zvýšení citlivosti vůči séru obsahujícímu specifické protilátky. Na základě těchto znalostí je zřejmé, že jednou z klíčových vlastností vakcíny proti bakterii *B. pertussis* musí být navození tvorby dostatečného množství specifických protilátek v hostitelském organismu.





**Obrázek č. 5**

Přehled mechanismů, pomocí kterých bakterie *B. pertussis* uniká baktericidnímu působení komplementu. Autotransportéry **BapC** a **BrkA** brání neznámým mechanismem aktivaci komplementu pomocí CP. Autotransportér **Vag8** je buď volně sekretován do okolí buňky, ukotven ve vnější membráně nebo v membráně OMV. Váže sérový protein C1inh, jehož působením dochází k rozpadu komplexu C1 a MBL. Uvolněním jejich proteolytických podjednotek C1r a C1s, resp. MASP-1 a MASP-2 dochází ke štěpení C2 a C4 mimo dosah buněčné stěny buňky, která je tak chráněna před aktivací komplementu pomocí CP a LP. **LPS** má zřejmě pozitivní vliv na odolnost *B. pertussis* vůči komplementu aktivovanému AP a LP, může se však zřejmě stát cílem specifických protilátek. Polysacharid **Bps** zajišťuje tvorbu biofilmu a brání aktivaci CP. Protein **FHA** sice váže regulační protein C4BP, ale není zřejmé, zda má vliv na aktivaci komplementu. Obdobně je tomu v případě **kapsule**. Buňka *B. pertussis* je také schopna vázat sérový **faktor-H**, který brání interakci proteinu C3b s buněčnou stěnou bakterie, není však zřejmé, jak je tato interakce zprostředkována a jaký má vliv na odolnost *B. pertussis* vůči séru. Inspirováno (Thiriard *et al.*, 2018).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Kmeny bakterií

Kmen bakterie *B. pertussis* Tohama I (Kasuga *et al.*, 1954) a byl použit pro studium aktivity T3SS a jako referenční kmen pro SKA. Kmen B1917 byl použit jako referenční současný klinický izolát při studiu aktivity T3SS (Bart *et al.*, 2014). Kmeny českých klinických izolátů bakterie *B. pertussis* použité k analýze SKA jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka č. 1).

Kmen	Rok izolace	Kmen	Rok izolace
<i>Vakcinační kmeny</i>		<i>Současné klinické izoláty</i>	
VS401	1954	Bp155	2008
VS366	1957	Bp312	2008
VS67	Před 1966	Bp6242	2012
VS377	Před 1966	Bp6260	2012
VS393	Před 1966	Bp6384	2012
		K10	2012
		Bp46	2014
		Bp82	2014
		Bp318	2015

**Tabulka č. 1** Seznam vakcinačních kmenů a klinických izolátů bakterie *B. pertussis* použitých k analýze SKA.

- **Vakcinační kmeny** – kmeny označené jako VS (z anglického *vaccine strain*) jsou kmeny, které byly izolovány na území bývalého Československa v letech 1954–1965 před zavedením, nebo v době zavádění plošného očkování proti *B. pertussis*. Tyto kmeny byly v minulosti použity pro přípravu celobuněčných vakcín (DTwP). Vakcinační kmeny poskytli k dalšímu výzkumu Dr. Boštík a Dr. Vávrová (Sevapharma).
- **Současné klinické izoláty** – kmeny, které byly izolovány na území dnešní České republiky v počátku 21. století. Tyto kmeny poskytla k dalšímu výzkumu Národní referenční laboratoř pro pertusi a difterii (Mgr. Zavadilová; SZÚ).

Kmen bakterie *B. bronchiseptica* RB50 (Cotter a Miller, 1994) byl použit pro přípravu mutantního kmene s delecí genu *BB0302* a jeho další charakterizaci. Kmeny druhu

*bronchiseptica* jsou přirozeně rezistentní k antibiotiku streptomycin (Str), čehož bylo využito v klonovací strategii během přípravy zmíněného mutantního kmene.

Kmen bakterie *Escherichia coli* SM10  $\lambda$ pir (Biomedal) byl použit pro konstrukci vektoru pSS4245\_26DG nezbytného k delecí genu *BB0302* v chromozomu bakterie *B. bronchiseptica* RB50. Kmen SM10  $\lambda$ pir je rezistentní vůči antibiotiku kanamycin (Kan) a je schopen mezidruhov $\acute{e}$  konjugace pomocí genů *Tra*, čehož bylo využito v klonovací strategii. Tento kmen byl dlouhodobě uchováván v uměle navozeném stavu kompetence.

Buňky všech použitých kmenů bakterií byly dlouhodobě uchovávány ve 20% roztoku glycerolu při teplotě -80 °C.

#### 4.1.2 Živná média

Kultivace bakterií rodu *Bordetella* byla prováděna za použití pevných živných médií Bordet-Gengou agar (BG agar) a Charcoal agar (CHA agar). Pro kultivaci v tekutém médiu bylo použito Stainer-Scholte (SS) médium. Destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O) použitá pro přípravu všech živných médií byla deionizována systémem Ultrapur (Watrex).

**BG agar** byl připraven jako 3% roztok (w/v) BG agaru (Difco™) a 1% roztok (v/v) glycerolu v dH<sub>2</sub>O. Roztok byl sterilizován autoklávováním (0,12 MPa, 20 min). Před použitím bylo médium temperováno na 50 °C a následně byla přidána předem temperovaná (37 °C) defibrinovaná beraní krev (LabMediaServis s.r.o.) na výslednou koncentraci 15 % (v/v). Médium bylo rozléváno do Petriho misek (Ø 90 mm) po 20–25 ml.

Pro přípravu **CHA agaru** byl připraven 5,1% roztok (w/v) Charcoal agaru (Oxoid™) v dH<sub>2</sub>O. Roztok byl sterilizován autoklávováním (0,12 MPa, 20 min). Před použitím bylo médium temperováno na 50 °C a následně bylo rozléváno do Petriho misek (Ø 90 mm) po 20–25 ml. Obohacení CHA agaru defibrinovanou beraní krví bylo provedeno totožným postupem, jako v přípravě BG agaru. CHA agar obohacený beraní krví je v této diplomové práci označován jako **CHAB agar** (z anglického *blood*).

Pro přípravu **SS média** byly připraveny zvlášť dva zásobní koncentrované roztoky označované jako *frakce A* a *frakce B*. Oba roztoky byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -25 °C. Roztok *frakce B* byl před zmražením sterilizován filtrací (0,22  $\mu$ m). Složení obou roztoků je uvedeno v následující tabulce (Tabulka č. 2).

Složení	Množství [g]
<i>Frakce A (10x koncentrovány)</i>	
Tris-HCl (VWR)	63,6
Tris-báze (Carl Roth)	11,8
L-glutamát sodný (Sigma)	107,2
L-prolin (Sigma)	2,4
NaCl (Sigma)	25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Penta)	5
KCl (Sigma)	2
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Sigma)	1
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,2
dH <sub>2</sub> O	výsledný objem 1 L
<i>Frakce B (100x koncentrovány)</i>	
L-cystein (Sigma)	0,4
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,1
L-kyselina askorbová (Sigma)	0,2
Kyselina nikotinová (Sigma)	0,04
L-glutathion (red.); (Sigma)	1
dH <sub>2</sub> O	výsledný objem 0,1 L

**Tabulka č. 2** Seznam látek použitých pro přípravu zásobních roztoků SS média.

Kompletní SS médium bylo připraveno smícháním příslušného množství zásobního roztoku *frakce A* s destilovanou vodou a přidáním hydrolyzátu kaseinu (Sigma) v množství 5 % (w/v) a cyklodextrinu (Sigma) v množství 1 % (w/v). Po rozpuštění byla celá směs sterilizována filtrací (0,22 µm) a krátkodobě uchovávána při teplotě 4 °C. Těsně před použitím bylo kompletní SS médium (pH ~ 7) připraveno přidáním požadovaného objemu roztoku *frakce B*.

Kultivace bakterií *E. coli* byla prováděna za použití živného média Luria-Bertani (LB). K přípravě **LB média** byl použit bakto-trypton (Oxoid) 1 % (w/v), kvasničný autolyzát (Oxoid) 0,5 % (w/v) a NaCl ve výsledné koncentraci 171 mM. Hodnota pH média byla upravena na 7,0 pomocí 5M roztoku NaOH (Lachema). Roztok byl sterilizován autoklávováním (0,12 MPa, 20 min). Pevné LB médium bylo připraveno přidáním bakteriologického agaru v množství 18 g v 1 L média před sterilizací autoklávováním. Médium s obsahem agaru bylo před použitím temperováno na 50 °C a následně bylo rozléváno do Petriho misek (Ø 90 mm) po 20–25 ml.

Různé varianty obohacených živných médií byly dle potřeby připraveny přidáním látek uvedených v následující tabulce těsně před použitím daného média (Tabulka č. 3). Obohacená pevná média byla rozlévána do Petriho misek (Ø 90 mm) po 20 ml.

Obohacující látka	Výsledná koncentrace
Ampicilin (Amp)	100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Kanamycin (Kan)	50 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
Streptomycin (Str)	500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	50 mM

**Tabulka č. 3** Seznam látek použitých pro přípravu obohacených živných médií.

#### 4.1.3 Plazmidy

Plazmid pSS4245 (Inatsuka *et al.*, 2010) byl použit pro konstrukci vektoru pSS4245\_26DG určeného k delecí genu *BB0302* v chromozomu bakterie *B. bronchiseptica*. Plazmid velký 8 286 bp obsahuje klonovací oblast (MCS), jejíž sekvence DNA je vyhledávána řadou specifických restrikčních endonukleáz, což umožňuje vložení libovolného fragmentu DNA právě do této oblasti. Ve směru *upstream* bezprostředně od oblasti MCS je gen kódující restrikční endonukleázu I-SceI. Mezi tímto genem a oblastí MCS je specifické místo štěpení vyhledávané touto endonukleázou. Celý tento systém je řízen promotorem *ptxA*, který spadá do regulonu BvgAS, a jeho aktivitu lze v podmínkách *in vitro* kontrolovat změnou koncentrace síranových aniontů v živném médiu. Plazmid dále kóduje geny rezistence vůči řadě antibiotik, např. Amp a Kan. Není však v buňkách *B. bronchiseptica* schopen autonomní replikace a z buněk vymizí, pokud není začleněn do chromozomu na principu homologní rekombinace. Těchto vlastností bylo využito v selekční strategii v průběhu klonování. Pro vložení fragmentu DNA 26DG byla použita předem linearizovaná forma plazmidu. Štěpení bylo provedeno pomocí restrikční endonukleázy Eco53kI štěpící DNA v místě MCS za vzniku tupých konců (MBÚ, Praha).

#### 4.1.4 Pufry a další roztoky

V této kapitole je popsáno složení všech připravovaných pufřů a jiných roztoků nezbytných v různých metodách použitých pro vypracování této diplomové práce. Destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O) použitá pro přípravu všech vodných roztoků byla deionizována systémem Ultrapur (Watrex). V případě potřeby byla hodnota pH upravena pomocí roztoků 5M NaOH a 1M HCl.

### **BFB vzorkovací pufr**

BFB pufr určený pro rozdělení vzorků nukleových kyselin v agarózovém gelu byl připraven jako 0,25% roztok (w/v) bromfenolové modři ve 40% roztoku (v/v) glycerolu.

### **Blokační pufr**

Pufr určený pro nespecifickou blokaci nitrocelulózkové membrány použité při metodě imunoblotu byl připraven jako 5% roztok (w/v) sušeného mléka v TBST.

### **BSA**

Roztok určený pro ředění protilátek použitých v metodě imunoblotu byl připraven jako 10% roztok (w/v) sérového albuminu (BSA; VWR) v TBST. Roztok byl konzervován azidem sodným ve výsledné koncentraci 0,2 % (v/v).

### ***Colloidal Coomassie G-250*** (Tabulka č. 4)

Složení	Výsledná koncentrace
CBB G-250 (Thermo Fisher Scientific)	0,02 % (w/v)
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 18H <sub>2</sub> O (MP Biomedicals)	5 % (w/v)
Etanol (96%)	10 % (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (85%)	2 % (v/v)
<i>pH = 7,4</i>	

**Tabulka č. 4** Seznam látek použitých pro přípravu *Colloidal Coomassie G-250*.

Roztok *Colloidal Coomassie G-250* určený k rychlé vizualizaci proteinů rozdělených v polyakrylamidovém gelu připravila Dr. Petráčková (Dyballa a Metzger, 2009).

### EDTA v PBS (Tabulka č. 5)

Složení	Výsledná koncentrace [mM]
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22
NaCl	138
KCl	3
EDTA (Sigma)	10
<i>pH = 7,4</i>	

**Tabulka č. 5** Seznam látek použitých pro přípravu EDTA v PBS.

### *Laemli* vzorkovací pufr (Tabulka č. 6)

Složení	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	50 mM
DTT	100 mM
Bromfenolová modř	0,1 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
Glycerol	10 % (v/v)
β-merkapt ethanol	10 % (v/v)
<i>pH = 6,8</i>	

**Tabulka č. 6** Seznam látek použitých pro přípravu *Laemli* vzorkovacího pufru.

### *Mild stripping* pufr (Tabulka č. 7)

Složení	Výsledná koncentrace
Glycin	200 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Tween® 20	1 % (v/v)
<i>pH = 2,2</i>	

**Tabulka č. 7** Seznam látek použitých pro přípravu *Mild stripping* pufru.

### Polyakrylamidový gel (Tabulka č. 8)

Složení	Množství [ $\mu$ l]
<i>Zaostřovací gel</i>	
dH <sub>2</sub> O	1 230
Tris-base (1M; pH 6,8)	200
SDS 10% (Carl Roth)	60
Akrylamid 30% (Carl Roth)	266
APS 25% (Sigma)	20
TEMED (MP Biomedicals)	5
<i>Rozdělovací gel</i>	
dH <sub>2</sub> O	980
Tris-base (1M; pH 6,8)	1 870
SDS 10%	50
Akrylamid 30%	2 070
APS 25%	10
TEMED	5

**Tabulka č. 8** Seznam látek použitých pro přípravu polyakrylamidového gelu.

### TAE pufr (Tabulka č. 9)

Složení	Výsledná koncentrace [mM]
Tris-base	40
Kyselina octová	20
EDTA	1
<i>pH = 8,4</i>	

**Tabulka č. 9** Seznam látek použitých pro přípravu TAE pufru.



**TBS pufr** (Tabulka č. 10)

Složení	Výsledná koncentrace [mM]
Tris-HCl	50
NaCl	150
<i>pH = 7,6</i>	

**Tabulka č. 10** Seznam látek použitých pro přípravu TBS pufru.

Pufr TBST byl připraven jako 0,1% roztok (v/v) přípravku Tween® 20 v pufru TBS.

**TE pufr** (Tabulka č. 11)

Složení	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
Lysozym (Sigma)	~ 1 mg · ml <sup>-1</sup>
<i>pH = 8,0</i>	

**Tabulka č. 11** Seznam látek použitých pro přípravu TE pufru.

Lysozym byl do pufru přidán vždy těsně před použitím pufru.

**Transferový pufr** (Tabulka č. 12)

Složení	Výsledná koncentrace
Tris-base	2 mM
glycin	20 mM
SDS	0,01 % (w/v)
metanol	20 % (v/v)
<i>pH = 8,3</i>	

**Tabulka č. 12** Seznam látek použitých pro přípravu Transferového pufru.

### Tris-glycinový pufr (Tabulka č. 13)

Složení	Výsledná koncentrace
Tris-HCl	25 mM
Glycin (VWR)	250 mM
SDS	0,1 % (w/v)
$pH = 8,3$	

**Tabulka č. 13** Seznam látek použitých pro přípravu Tris-glycinového pufru.

### Tris-Urea pufr (Tabulka č. 14)

Složení	Výsledná koncentrace
Tris-base	50 mM
Močovina	8 M
$pH = 8,0$	

**Tabulka č. 14** Seznam látek použitých pro přípravu TU pufru.

#### 4.1.5 Protilátky

Protilátky použité pro specifickou detekci proteinů pomocí imunoblotu jsou uvedeny v následující tabulce (Tabulka č. 15):

Název	Ředění	Typ protilátky	Původ/zdroj
Anti-Bsp22	1 : 10 000	Primární, myš	MBÚ, Praha
Anti-BopN	1 : 8 000	Primární, myš	MBÚ, Praha
Anti-BopC	1 : 30 000	Primární, myš	MBÚ, Praha
Anti-myší IgG	1 : 10 000	Sekundární	GE Healthcare

**Tabulka č. 15** Seznam protilátek použitých pro detekci proteinů pomocí imunoblotu.

Primární protilátky byly používány opakovaně. Jejich roztok byl konzervován azidem sodným ve výsledné koncentraci 0,2 % (v/v). Pro vizualizaci dané protilátky na membráně byla použita sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou. Její enzymatická činnost je inhibována azidem sodným, proto jím roztok sekundární protilátky nebyl konzervován a byl vždy připraven a použit jednorázově.

#### 4.1.6 Syntetické oligonukleotidy

Všechny syntetické oligonukleotidy použité k různým účelům vypracování této diplomové práce jsou uvedeny v následující souhrnné tabulce (Tabulka č. 16).

Název	Gen	V [bp]	Sekvence [5'–3']	RE
<i>Primery pro konstrukci vektorů</i>				
Fw1_26D		28	ATAAAGCTTACGTGGTCGAACTCAGCAA	
Rev1_26E		28	ATAG CTAGCGCGGGGATTATAGGCTGAT	NheI
Fw2_26F		30	ATAG CTAGCCAGCTCGACATGAACCTTTGA	NheI
Rev2_26G		27	ATAAAGCTTTGAGGTCGTAGCCGGTGT	
<i>Sekvenační primery</i>				
Seq_f1_26H		19	ATGGCATAGCGTCAACGTG	
Seq_r1_26I		19	CGATCTGGCTCGAATCCTC	
<i>Primery pro qPCR</i>				
BprpoB_fw		18	GCTGGGACCCGAGGAAAT	
BprpoB_rev	<i>rpoB</i>	19	CGCCAATGTAGACGATGCC	
Bsp22_F2		20	GTGTATGTGCAGGGTCGTCG	
Bsp22_R2	<i>bsp22</i>	18	GGATTGGGCGGAAACTCG	
bopNfw		19	GCAATGCCCTGAAACAACG	
bopNrev	<i>bopN</i>	19	GTCCTCGCTGATTCCCACA	
bteA_fw		18	CGACGCCTACAAGCAGCA	
BteA_R2	<i>bopC</i>	18	CCATCCAGCCATTTACAG	
bscN_R1		18	ATGAATGCCGTGGTGTCG	
bscN_F1	<i>bscN</i>	20	GCGTTCGTCGGTTAGTTGTC	

**Tabulka č. 16** Seznam všech použitých syntetických oligonukleotidů (Sigma). Zásahová místa konkrétních restričních endonukleáz jsou v sekvenci označena podtržením a svíslou čárou. Navržení a kontrolu efektivity *primerů* provedly Dr. Bíbová a Dr. Dienstbier (MBÚ, Praha); RE = restriční endonukleáza, V = velikost oligonukleotidu.

## 4.2 Metody

Všechny pracovní postupy popsané v této kapitole citlivé na kontaminace nežádoucími mikroorganismy byly prováděny v laminárním boxu. Sterilizace pracovního prostoru a laboratorního náčiní byla dle možností prováděna pomocí 70% vodného roztoku etanolu, plamenem kahanu a UV zářením (15 min).

### 4.2.1 Kultivace mikroorganismů

Kultivace bakterií *B. pertussis* na pevném médiu byla provedena na BG agaru, nebo na CHA agaru při teplotě 37 °C v atmosféře obohacené o oxid uhličitý (~ 5 %). Standardní doba růstu na BG agaru byla 3–5 dní, na CHA agaru 2–4 dny v případě *B. pertussis*, resp. 2–3 dny na BG agaru v případě *B. bronchiseptica*. Pro kultivaci v tekutém médiu bylo použito SS médium při teplotě 37 °C a vzdušnění třepáním o rychlosti 160 rpm. V případě kultivace *B. pertussis* byla z pevného do tekutého média očkována biomasa o počátečním  $OD_{600} = 0,05–0,1$ , v případě *B. bronchiseptica* byla očkována biomasa ~ 3 hemolytických kolonií. Pro zamezení tepelného šoku buněk bylo živné médium před očkováním vždy temperováno na teplotu kultivace, tj. 37 °C.

Kultivace bakterií *E. coli* na pevném i v tekutém médiu byla provedena pomocí LB média při teplotě 37 °C. Standardní doba růstu byla do 24 hod.

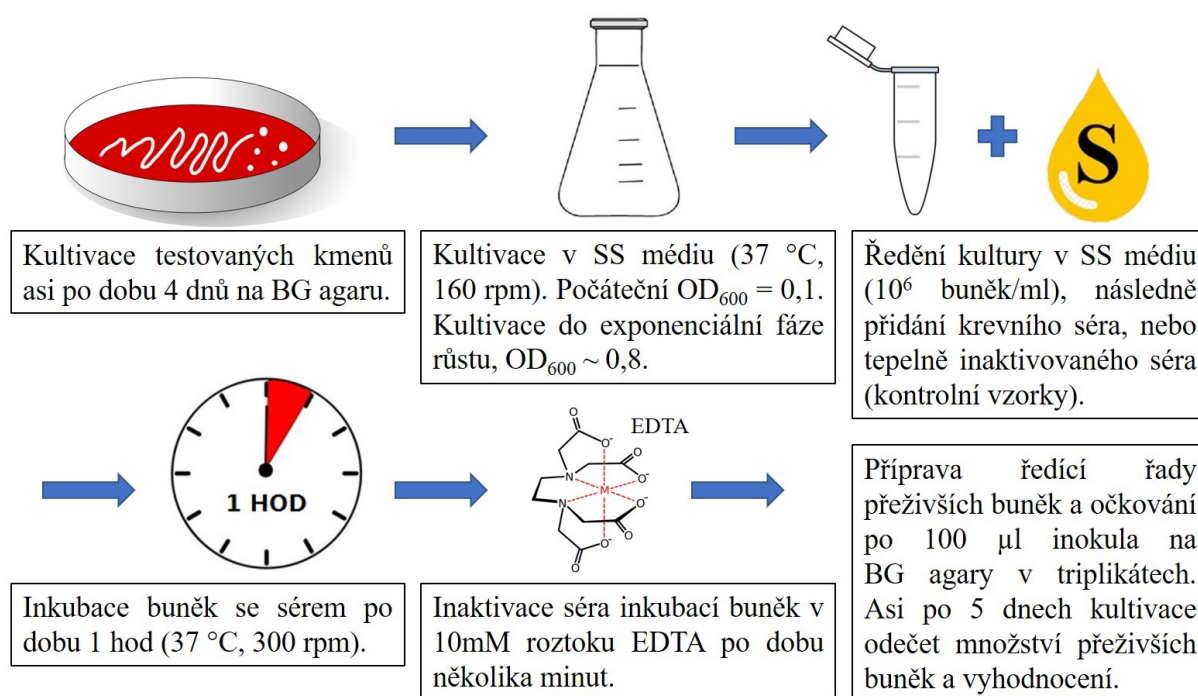
### 4.2.2 Test odolnosti vůči séru – SKA

Metoda SKA (viz 3.3.3.2) byla použita pro zjištění citlivosti buněk *B. pertussis* současných klinických izolátů a původních vakcinačních kmenů. Tato mikrobiologická metoda je založena na inkubaci daného množství buněk s krevním sérem a následné kultivaci přeživších buněk na pevném médiu pro zjištění jejich množství.

Buňky byly nejprve kultivovány asi 4 dny na BG agaru a následně byly přeočkovány do 20 ml SS média při  $OD_{600} = 0,1$ . Buňky byly ponechány růst po dobu asi 12–16 hod do pozdní exponenciální fáze růstu a při  $OD_{600} \sim 0,8$  byla odebrána část suspenze, která měla po zředění v SS médiu do objemu 1 ml  $OD_{600} = 0,05$ . Dalším ředěním v SS médiu byla získána suspenze obsahující ~  $10^6$  buněk/ml v objemu 450  $\mu$ l. K této suspenzi bylo přidáno 50  $\mu$ l lidského krevního séra (Sigma; H4522). Takto připravená směs byla ponechána v mikrozkušavkách po dobu 1 hod při 37 °C a vzdušněna třepáním při 300 rpm. Neprodleně po uplynutí doby inkubace bylo 50  $\mu$ l suspenze ošetřeno 450  $\mu$ l 10mM roztoku EDTA v PBS (viz Tabulka č. 5), čímž byla

zastavena baktericidní funkce krevního séra, resp. komplementu. Po několika minutách inkubace byly buňky zředěny v SS médiu do požadované koncentrace a byly očkované v triplikátech na BG agary po 100  $\mu$ l inokula. Po uplynutí doby 4–5 dní byly z misek odečteny počty přeživších buněk.

Stejným způsobem byly připraveny kontrolní vzorky, které byly inkubovány s tepelně inaktivovaným krevním sérem. To bylo předem inkubováno při teplotě 57 °C po dobu 30 min. Buňky inkubované s inaktivovaným krevním sérem nepodléhají jeho baktericidnímu působení. Celý postup SKA pro přehlednost znázorňuje následující schéma (Obrázek č. 7).



**Obrázek č. 7** Pracovní schéma metody SKA.

Metoda SKA je velice citlivá na jakékoliv změny pracovního postupu. Proto byl kladen důraz, aby byla všechna opakování provedena totožným postupem za použití stejného laboratorního náčiní a biologického materiálu. Práce s buňkami mimo inkubátor byla vždy provedena co možná nejrychleji s cílem zabránit tepelnému šoku buněk. Každému odběru buněk ze suspenze předcházela její řádná homogenizace.

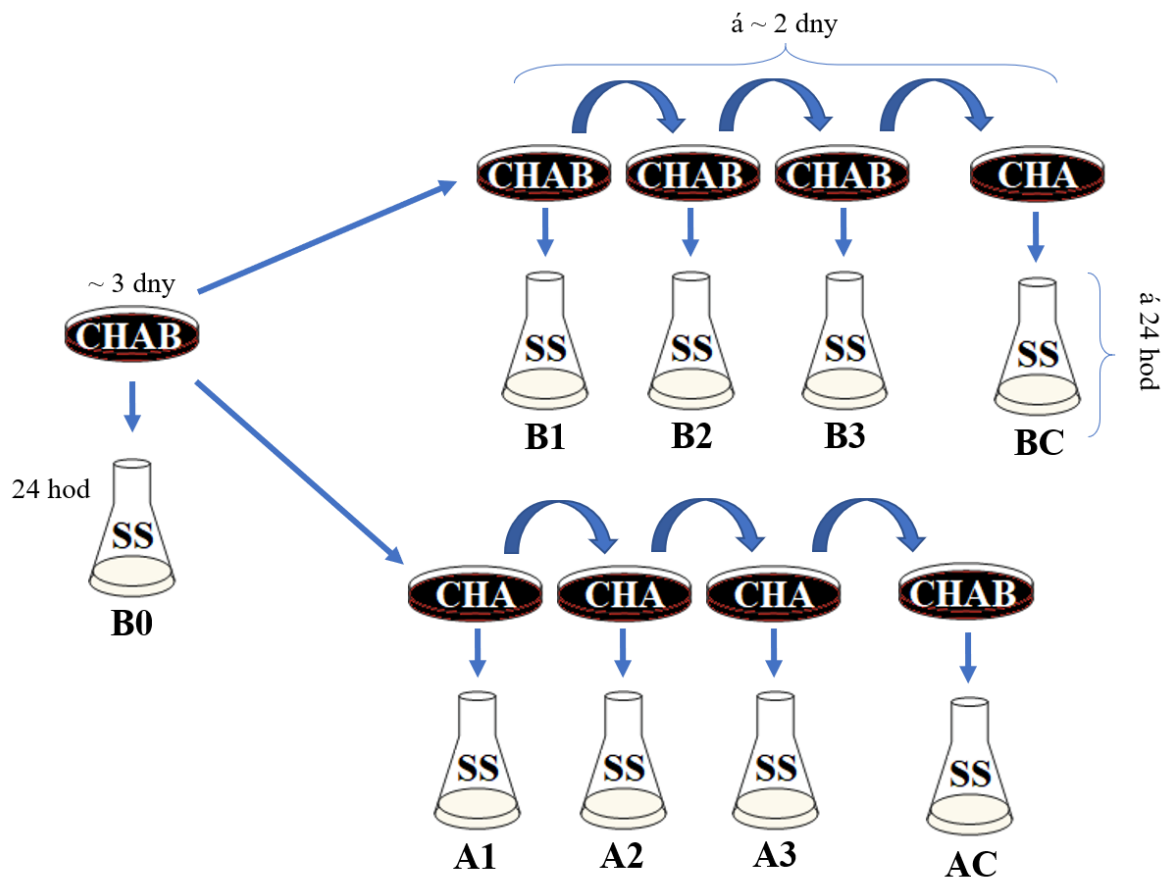
Všechny studované kmeny bakterií byly testovány metodou SKA alespoň ve třech biologických opakováních. Při každém biologickém opakování bylo testováno několik kmenů současně spolu s referenčním kmenem Tohama I. V rámci jednotlivých skupin (tj. Tohama I, současné klinické izoláty a vakcinační kmeny) byl ze získaných dat určen aritmetický průměr a směrodatné odchytky od průměru v 95% konfidenčním intervalu. Data všech tří skupin byla mezi sebou

porovnána jednosměrnou statistickou analýzou rozptylu (ANOVA) při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  s výsledkem  $p < 0,0001$ . Následně byla data jednotlivých skupin porovnána mezi sebou ve všech třech možných kombinacích statistickou metodou nepárového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$ . Statistické vyhodnocení dat a grafické znázornění výsledků bylo provedeno pomocí programu GraphPad Prism (verze 8.4.0; GraphPad Software)

#### 4.2.3 Aktivita T3SS v závislosti na kontaktu s krví

Pro sledování aktivity T3SS bakterie *B. pertussis* Tohama I v závislosti na kontaktu s krví při kultivaci v podmínkách *in vitro* bylo využito kultivace buněk na standardním CHA agaru a na CHA agaru obohaceném beraní krví (CHAB agar) s následnou kultivací ve standardním SS médiu dle následujícího schématu (Obrázek č. 8): buňky byly nejprve kultivovány na CHAB agaru, odkud byly po získání dostatečného množství biomasy (~ 3 dny) přeočkovány jak na CHAB agar, tak na CHA agar. Přeočkování na stejný typ média bylo následně dvakrát zopakováno (~ 2 dny). Čtvrté následné přeočkování bylo provedeno na opačný typ média (CHA agar ne/obohacený beraní krví). Z každé provedené kultivace byla připravena tekutá kultura ve standardním SS médiu (20 ml, počáteční  $OD_{600} = 0,1$ ), ze které byly po 24 hod kultivace (konečná  $OD_{600} \sim 2$ ) odebrány vzorky supernatantu média pro následnou precipitaci souboru sekretovaných proteinů a vzorky buněčného peletu pro následnou izolaci celkové RNA.

Soubor proteinů sekretovaných do SS média jednotlivých vzorků byl následně analyzován pomocí elektroforézy SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu (4.2.4). Pomocí imunoblotu (4.2.5) byly následně detekovány proteiny Bsp22, BopN a BopC, které patří mezi proteiny sekretované pomocí T3SS. Současně bylo pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (4.2.8) určeno poměrné množství mRNA těchto genů v příslušných vzorcích. Na základě získaných dat byl pozorován význam kontaktu bakterie *B. pertussis* Tohama I s beraní krví při kultivaci na CHAB agaru v kontextu sekrece proteinů pomocí T3SS do SS média.



**Obrázek č. 8** Schéma pasážování buněk *B. pertussis* (Tohama I) na CHA agaru a CHAB agaru. Výchozí kultura byla kultivována na CHAB agaru ~ 3 dny. Každé přeočkování bylo provedeno po ~ 2 dnech. Každá kultura byla současně z agaru přeočkována do standardního SS média pro odběr vzorků supernatantu média a peletu buněk po 24 hod kultivace.

Značení vzorků: **B0** = původní kultura; **B1-3** = pasážované kultury na CHAB agaru; **BC** = kultura přeočkovaná na CHA agar po předchozím pasážování na CHAB agaru; **A1-3** = pasážované kultury na CHA agaru; **AC** = kultura přeočkovaná na CHAB agar po předchozím pasážování na CHA agaru.

V návaznosti na výše popsaný experiment byla dále studována aktivita T3SS bakterie *B. pertussis* Tohama I v závislosti na kontaktu s biologicky inaktivovanou beraní krví. K tomu bylo využito kultivace buněk na CHAB agaru obohaceném buď standardní beraní krví, nebo beraní krví, která byla před použitím inkubována po dobu 30 min při teplotě 56 °C, čímž byla zajištěna inaktivace biologicky aktivních termolabilních látek obsažených v krvi, jako jsou např. proteinové složky komplementu. Po získání dostatečného množství biomasy (~ 3 dny) byly obě kultury přeočkovány do SS média (20 ml, počáteční  $OD_{600} = 0,1$ ) a kultivovány po dobu 24 hod (konečná  $OD_{600} \sim 2$ ). Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky supernatantu média pro následnou precipitaci souboru sekretovaných proteinů a vzorky buněčného peletu pro následnou izolaci celkové RNA. Soubor proteinů sekretovaných do SS média obou vzorků a poměrné množství mRNA pozorovaných genů bylo následně analyzováno totožně, jako ve výše popsaném experimentu. Na základě získaných dat byl pozorován význam kontaktu bakterie *B. pertussis* (Tohama I) s biologicky aktivními termolabilními látkami obsaženými

v beraní krvi při kultivaci v podmínkách *in vitro* na CHAB agaru v kontextu sekrece proteinů pomocí T3SS do SS média.

Nakonec byla aktivita T3SS v souvislosti s kontaktem s beraní krvi pozorována u referenčního kmene současných klinických izolátů, B1917. K tomu bylo opět využito kultivace buněk na CHA agaru a CHAB agaru. Po získání dostatečného množství biomasy (~ 3 dny) byly obě kultury přeočkovány do SS média (20 ml, počáteční  $OD_{600} = 0,1$ ) a kultivovány po dobu 24 hod (konečná  $OD_{600} \sim 2$ ). Po ukončení kultivace byly odebrány vzorky supernatantu média pro následnou precipitaci souboru sekretovaných proteinů a vzorky buněčného peletu pro následnou izolaci celkové RNA. Odebrané vzorky byly analyzovány obdobně jako ve výše popsaných pokusech.

#### 4.2.4 Elektroforéza SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu

##### 4.2.4.1 Precipitace proteinů a příprava vzorků

Izolace proteinů uvolněných do supernatantu živného média byla po ukončení kultivace provedena odstředěním buněk v kultuře (8 200 g, 20 min) a následnou filtrací (0,22  $\mu$ m) daného objemu supernatantu do roztoku předem vychlazené kyseliny trichloroctové (TCA; Sigma) o výsledné koncentraci 10 % (v/v). Suspenze supernatantu média s TCA byla ponechána po dobu ~ 24 hod při teplotě 4 °C, aby došlo k vysrážení proteinů. Následně byly proteiny odstředěny (12 850 g, 50 min, 4 °C), supernatant odstraněn a vzniklý pelet byl ošetřen 5 ml vychlazeného acetonu. Po následném odstředění (12 850 g, 30 min, 4 °C) byl aceton odstraněn. Vzorky proteinů byly následně připraveny k rozdělení v polyakrylamidovém gelu rozpuštěním a denaturací v TU pufru a nakonec byly stokrát zředěny v *Laemli* vzorkovacím pufru (pětkrát koncentrovaný; ředěný TU pufr v poměru 1:4 (v/v)) oproti objemu původně odebraného vzorku kultury dle následujícího vztahu:

$$V_{TU + Laemli} = OD \times V_{kultura} \times 100$$

##### 4.2.4.2 Příprava polyakrylamidového gelu a elektroforézy

Smícháním všech složek rozdělovacího polyakrylamidového gelu samovolně započala polymerace akrylamidu. Před zatuhnutím byla směs přelita mezi skla tvořící formu gelu pomocí aparatury tomu určené (Bio-Rad). Horní hladina gelu byla převrstvena etanolem (pro zamezení přístupu vzduchu jinak bránícího polymeraci) a gel byl ~ 30 min ponechán tuhnout. Poté byl odstraněn etanol a ihned po jeho přípravě byla přidána směs zaostřovacího gelu po hranu skel formujících gel. Do gelu byl následně vložen hřeben formující jamky pro nanášení vzorků. Gel



byl ~ 15 min ponechán tuhnout. Následně byla sestavena aparatura elektroforézy za použití Tris-glycinového pufru dle instrukcí výrobce aparatury (Bio-Rad). Do gelu byly nanесeny vzorky pomocí mikrostříkačky Hamilton standardně v objemu 10  $\mu$ l. Do krajní jamky gelu byl vždy nanесen standard velikostí proteinů (PageRuler™; Thermo Fisher Scientific). Pro zajištění rovnoměrného průchodu vzorků gelem byl do nevyužitých jamek gelu nanесen samotný *Laemli* vzorkovací pufr.

#### 4.2.4.3 Průběh elektroforézy a vizualizace proteinů

Aparatura elektroforézy byla připojena ke zdroji elektřiny (Bio-Rad) a byla ponechána po dobu 45–60 min při konstantním elektrickém proudu 25 mA (na jeden gel), aby se vzorky proteinů rozdělily v celé délce gelu. Poté byl gel vyjmut z aparatury a byla odstraněna zaostřovací část gelu. Následně byl gel pro vizualizaci proteinů rozdělených v gelu očištěn pomocí dH<sub>2</sub>O a inkubován v roztoku *Colloidal Coomassie G-250* v uzavřené krabici za stálého míchání. Přestože první proteiny bylo možné pozorovat již po prvních 10 min inkubace, bylo odbarvení pozadí pomocí dH<sub>2</sub>O provedeno až po ~ 12 hod inkubace (Dybala a Metzger, 2009).

V případě potřeby specifické detekce proteinů rozdělených v polyakrylamidovém gelu byl gel namísto barvení pomocí roztoku *Colloidal Coomassie G-250* použit k přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu pro následnou detekci proteinů pomocí imunoblotu.

#### 4.2.5 Detekce proteinů pomocí imunoblotu

Specifická detekce proteinů na membráně byla provedena pomocí imunochemické metody, imunoblotu. Po rozdělení daných vzorků proteinů pomocí elektroforézy SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu byl gel vyjmut z aparatury a očištěn pomocí dH<sub>2</sub>O. Pro přenesení proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu byl do aparatury fungující na principu polosuchého imunoblotu (Trans-Blot® Turbo™; Bio-Rad) vložen nejprve savý papír předem inkubovaný (~ 5 min) v Transferovém pufru a na něj byla umístěna nitrocelulózová membrána (Amersham Protran 0,45  $\mu$ m; GE Healthcare) předem smočená na hladině dH<sub>2</sub>O (~ 5 min). Na membránu byl dále položen polyakrylamidový gel, na který byl nakonec položen savý papír inkubovaný v Transferovém pufru. Celý sloupec byl pevně uzavřen do aparatury. Použitá membrána byla v obou rozměrech o ~ 1 cm delší než gel, resp. savý papír, aby elektrický proud neprocházel po okrajích, ale rovnoměrně celým sloupcem. Proteiny byly přenášeny na membránu za konstantního napětí 15 V po dobu 50 min.

Následně byla membrána vyjmuta z aparatury a inkubována za stálého míchání v Blokačním pufru po dobu 1 hod pro nasycení membrány nespecifickými proteiny. Dále byla membrána třikrát opláchnuta pomocí pufru TBST po dobu ~ 5 min a inkubována s příslušnou primární protilátkou v závislosti na pozorovaném proteinu po dobu ~ 12 hod při 4 °C. Po následném opláchnutí membrány pomocí TBST (třikrát ~ 5 min) byla membrána inkubována s příslušnou sekundární protilátkou po dobu 1 hod. Pro zajištění kvalitní detekce byla membrána opět opláchnuta pomocí TBST (třikrát ~ 5 min). Následná detekce chemiluminiscenčního signálu vyvolaného enzymatickou aktivitou křenové peroxidázy konjugované se sekundární protilátkou byla zajištěna pomocí komerční sady SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific) a detektoru G:BOX Syngene (Biocon).

V případě potřeby detekce jiného proteinu na téže membráně byly protilátky odstraněny inkubací membrány v *Mild stripping* pufru po dobu 20 min za stálého míchání. Následně byla membrána opláchnuta pomocí pufru TBST (třikrát ~ 5 min) a celý proces vazby protilátek a detekce signálu byl zopakován.

Všechny kvalitativní trendy uvedené v kapitole 5 Výsledky pozorované pomocí elektroforézy SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu a pomocí imunoblotu byly pozorovány opakovaně u vzorků získaných z alespoň tří biologických opakování daných experimentů. Obrazová dokumentace pak vychází pouze z jednoho z těchto biologických opakování.

#### **4.2.6 Izolace celkové bakteriální RNA**

V průběhu izolace RNA z buněčného peletu byly dodržovány přísné pracovní podmínky pro zamezení kontaminace vzorků ribonukleázami: práce s RNA byla provedena v digestoři za použití nástrojů a nádobí určeného výhradně na práci se vzorky RNA; pracovní prostor a použité náčiní bylo ošetřeno pomocí přípravku RNaseZap™ (Thermo Fisher Scientific); byla použita pouze komerčně dodávaná sterilní destilovaná voda ošetřená pomocí DEPC zajišťující inaktivaci ribonukleáz (Thermo Fisher Scientific).

Pro izolaci a kvantifikaci celkové bakteriální RNA byl vzorek kultury o objemu 1 400 µl neprodleně po odebrání smíchán s 350 µl 5% roztoku fenolu v etanolu, čímž byla zastavena degradace RNA. Suspenze byla řádně promíchána a buňky bakterií byly odstředěny (21 130 g, 5 min). Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl do izolace celkové RNA krátkodobě uchováván při teplotě -80 °C.

Buněčný pelet byl po rozmrazení rozpuštěn v 250  $\mu$ l TE pufru a asi po 45–60 s bylo přidáno 750  $\mu$ l přípravku TRI Reagent® (Thermo Fisher Scientific). Celá směs byla řádně promíchána a inkubována při laboratorní teplotě po dobu 5 min. Směs byla dále odstředěna (13 500 g, 10 min, 4 °C) a supernatant byl převeden do předem připravené mikrozkušavky s 200  $\mu$ l vychlazeného chloroformu. Směs byla ponechána inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 10 min a příležitostně byla zvolna promíchána. Následně byla směs odstředěna (13 500 g, 12 min, 4 °C) a svrchní fáze oddělené emulze obsahující molekuly nukleových kyselin (~ 450  $\mu$ l) byla opatrně převedena do předem připravené mikrozkušavky s 500  $\mu$ l vychlazeného isopropanolu. Směs byla šetrně promíchána a inkubována po dobu 45 min při teplotě 4 °C. Poté byla vysrážená RNA odstředěna (13 500 g, 30 min, 4 °C) a na stěně mikrozkušavky vznikl sotva viditelný pelet. Po odstranění supernatantu byly zbytky kapalně fáze směsi znovu odstředěny (13 500 g, 1 min, 4 °C) a supernatant odstraněn. RNA byla očištěna přidáním a následným odstředěním 900  $\mu$ l vychlazeného 75% roztoku etanolu (13 500 g, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn, bylo provedeno dodatečné odstředění (13 500 g, 1 min, 4 °C) a po odstranění zbytku supernatantu byl pelet ulpělý na stěně mikrozkušavky ponechán oschnout po dobu ~ 5 min. Poté byl pelet rozpuštěn v 50  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O a byla zjištěna koncentrace získaného vzorku RNA pomocí spektrofotometru NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Takto získaný vzorek však vedle RNA obsahoval také molekuly DNA, které byly následně enzymaticky odstraněny. K tomu byla připravena směs ~ 10  $\mu$ g vzorku izolované DNA a RNA s 1  $\mu$ l deoxyribonukleázy a 5  $\mu$ l jejího desetkrát koncentrovaného pufru komerčně dodávaných v sadě TURBO DNA-free™ Kit (Thermo Fisher Scientific). Směs byla doplněna dH<sub>2</sub>O na výsledný objem 50  $\mu$ l. Poté byla směs šetrně promíchána a inkubována po dobu 1 hod při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním inaktivačního pufru (součást zmíněné sady). Po 5 min inkubace byla směs odstředěna (9 400 g, 1,5 min) a svrchní fáze oddělené emulze (~ 45  $\mu$ l) byla opatrně převedena do čisté mikrozkušavky. Koncentrace, čistota a kvalita získané RNA byla ověřena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) a pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

#### **4.2.7 Reverzní transkripce RNA**

Pro následnou kvantifikaci byla izolovaná RNA enzymaticky převedena na cDNA. V průběhu práce se vzorky RNA byly dodržovány přísné pracovní podmínky pro zamezení kontaminace vzorků nukleázami. Práce se vzorky byla prováděna v ledové lázni. Před samotnou reakcí bylo

potřeba ~ 500 ng přepisované RNA hybridizovat s *primery* (250 ng náhodné hexamery a 250 ng oligo dT) ve výsledném objemu 16,5 µl doplněném dH<sub>2</sub>O. Hybridizace byla provedena při 70 °C po dobu 5 min a vzorky byly ihned přemístěny do ledové lázně. Ke každému vzorku RNA hybridizované s *primery* bylo následně přidáno 200 U reverzní transkriptázy M-MLV v objemu 1 µl a 5 µl M-MLV pětikrát koncentrovaného reakčního pufru (Promega), 20 U inhibitoru ribonukleáz RNasin® (Promega) a směs dNTP ve výsledné koncentraci 800 µM od každého (Sigma). Celkový objem reakční směsi byl 25 µl. Reverzní transkripce probíhala po dobu 1 hod při 37 °C. Každý vzorek RNA byl přepsán do cDNA a následně analyzován v duplikátu. Kontrola případné kontaminace molekulami DNA byla provedena přidáním dH<sub>2</sub>O do reakční směsi namísto reverzní transkriptázy, bez které by ve vzorku neměla být DNA vůbec přítomna. Kontrola kontaminace použitých chemikálií a enzymů nukleovými kyselinami byla provedena reverzní transkripcí, do jejíž reakce byla namísto vzorku RNA přidána pouze dH<sub>2</sub>O.

#### 4.2.8 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)

Množství mRNA sledovaných genů v celkové bakteriální RNA přepsané do cDNA bylo určeno pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR) za použití syntetických oligonukleotidů (*primerů*) hybridizujících s cílovou cDNA, amplifikace těchto úseků DNA a detekce fluorescenčního signálu závislého na množství amplifikované DNA v reálném čase. Přesnost přípravy jednotlivých reakčních směsí byla zajištěna použitím elektronického dávkovače Multipette® E3 a vícekanálové pipety Research® plus (Eppendorf). Práce se vzorky byla prováděna v ledové lázni.

Každá reakční směs obsahovala 2 µl templátové cDNA (padesátkrát zředěný produkt reverzní transkripce RNA), 2,5 µl *primerů* v obou směrech templátu v poměru 1:1 o výsledné koncentraci 420 nM a 6 µl směsi SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (Sigma) zajišťující polymeraci DNA a vývoj fluorescenčního signálu závislého na koncentraci dvouvláknové DNA. Reakční směs byla doplněna dH<sub>2</sub>O do výsledného objemu 12 µl. Každý vzorek cDNA byl tímto postupem zpracován v triplicátu. Reakce byla provedena za použití destičky PCR Plate 384-well (Thermo Fisher Scientific) a přístroje CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) dle schématu uvedeného v následující tabulce (Tabulka č. 17).

Proces	Teplota [°C]	Doba trvání [s]	Opakování
Počáteční denaturace templátové DNA	95	120	1x
Denaturace DNA	95	15	
Hybridizace <i>primerů</i> s templátovou DNA	60	30	40x
Amplifikace DNA	72	30	
Měření křivky tání	65–95		1x

**Tabulka č. 17** Schéma jednotlivých kroků qPCR.

Při použití tohoto schématu reakce byla efektivita všech použitých syntetických oligonukleotidů ~ 100%, získaná data tak nebyla ovlivněna rozdílnou efektivitou *primerů*, kterou by jinak bylo nutné zohlednit při vyhodnocování dat. Množství sledované mRNA, resp. úroveň exprese jejího genu, proto byla určena metodou  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Principem této metody vyhodnocení dat získaných pomocí qPCR je určení okamžiku, kdy amplifikace cDNA sledovaného genu začala probíhat exponenciální řadou. Tento časový bod (běžně označovaný jako Cq) je detektorem fluorescence rozpoznán ve chvíli, kdy intenzita fluorescence vzorku přesáhne intenzitu fluorescence jeho původního pozadí. Platí, že čím větší množství sledované cDNA obsahoval původní vzorek, tím dříve je dosaženo bodu Cq. Relativní množství cDNA sledovaného genu v původním vzorku bylo vyjádřeno poměrně k množství cDNA referenčního genu, za který byl zvolen gen *rpoB* kódující  $\beta$  podjednotku bakteriální RNA polymerázy. Všechny vzorky cDNA (získané reverzní transkripcí v duplikátech; viz 4.2.7) byly analyzovány pomocí qPCR v triplikátech pro každý gen zvlášť.

Relevance získaných dat byla analyzována statistickou metodou párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$ . Výsledky qPCR uvedené v této diplomové práci (5.2 a 5.3.3.2) vycházejí pro technickou náročnost metody pouze z jednoho biologického opakování a bylo by proto vhodné je zopakovat alespoň v jednom dalším biologickém opakování. Vyhodnocení dat a grafické znázornění výsledků bylo provedeno pomocí programů CFX Maestro™ (verze 1.1; Bio-Rad), Excel 2016 (Microsoft Office) a GraphPad Prism (verze 8.4.0; GraphPad Software).

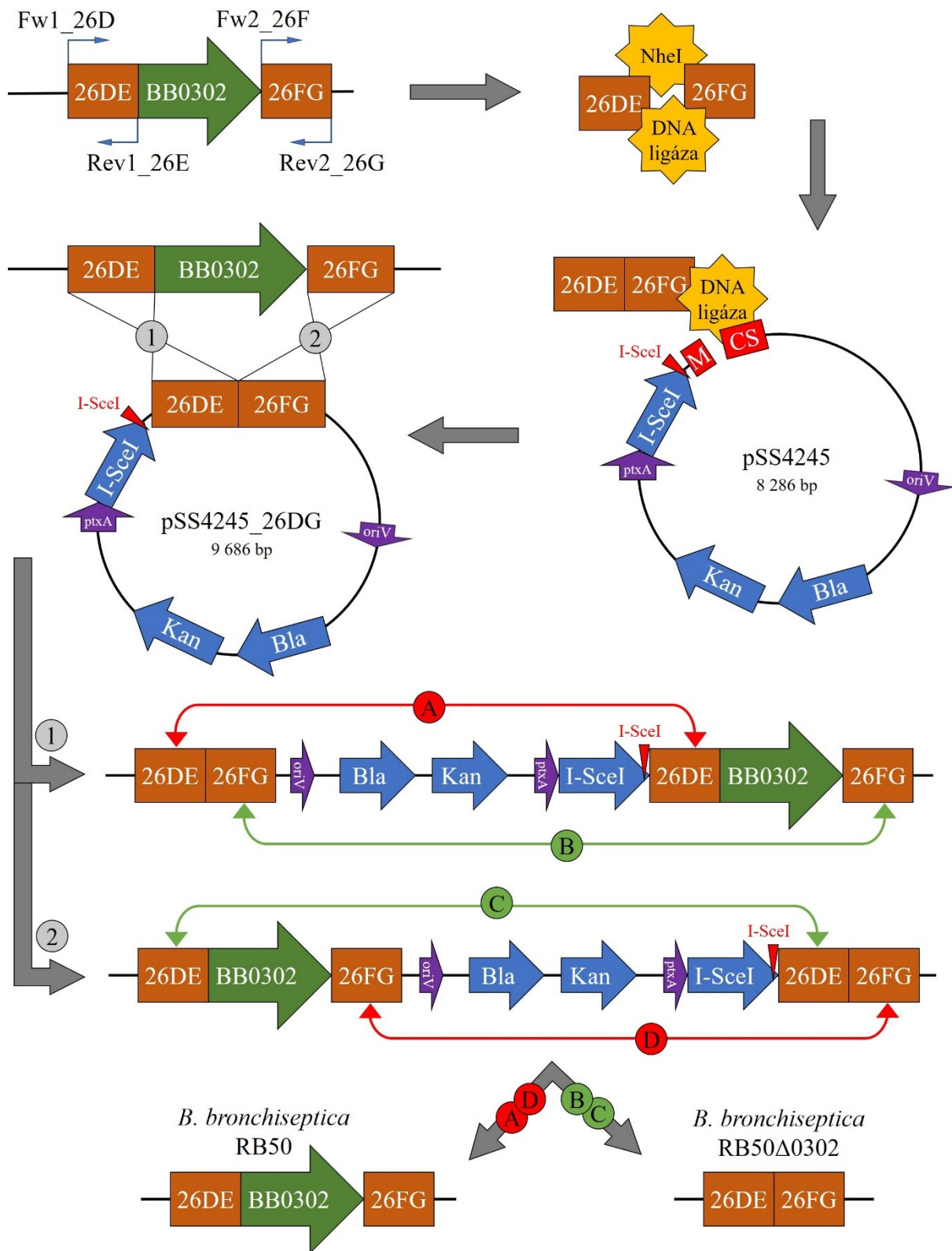
#### 4.2.9 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu byla použita pro rozdělení směsí molekul nukleových kyselin podle jejich odlišné velikosti. Agarózový gel byl připraven povařením jako 0,8–1% (w/v) roztok agarózy (Sigma) v TAE pufru. Pro detekci DNA byl do gelu dle instrukcí

výrobce (1  $\mu$ l na 50 ml gelu) přidán přípravek Midori Green Advance (Nippon Genetics Europe), v případě detekce RNA byl použit přípravek StainIN™ RED Nucleic Acid Stain (highQu) (1  $\mu$ l na 25 ml gelu a 1  $\mu$ l na 100 ml TAE pufru v elektroforetické aparatuře). Po ochlazení byl gel odléván v aparatuře tomu určené (Bio-Rad). Po ztuhnutí (~ 1 hod) byl z gelu odstraněn hřeben vytvářející jamky pro nanášení vzorků a gel byl umístěn do aparatury (Bio-Rad). Vzorky byly před nanášením na gel smíchány s BFB vzorkovacím pufrem. Jako standard velikostí nukleových kyselin byl použit  $\lambda$ -DNA štěpený restriční endonukleázou PstI. Rozdělení vzorků bylo provedeno při napětí 100 V po dobu ~ 30 min. Následná detekce DNA i RNA byla provedena pomocí detektoru G:BOX Syngene (Biocon) v rozhraní UV záření.

#### **4.2.10 Charakterizace genu *BB0302***

Strategie kompletní delece genu *BB0302* byla založena na přípravě klonovacího vektoru pSS4245\_26DG, který vznikl vložením fragmentu DNA nazvaného 26DG do MCS plazmidu pSS4245. Fragment 26DG byl připraven amplifikací a spojením dvou úseků DNA přímo navazujících na gen *BB0302* v obou směrech na chromozomu bakterie *B. bronchiseptica* RB50. Samotná delece byla provedena na principu homologní rekombinace vložením a následným vynětím vektoru pSS4245\_26DG z oblasti genu *BB0302* na chromozomu *B. bronchiseptica* RB50. Princip přípravy klonovacího vektoru a navození delece genu *BB0302* zjednodušeně znázorňuje následující schéma (Obrázek č. 9). V rámci charakterizace nově vzniklého kmene byl fenotyp kmene *B. bronchiseptica* RB50 $\Delta$ 0302 porovnán s fenotypem divokého typu (*B. bronchiseptica* RB50). Konkrétně byla porovnána generační doba a růstová rychlost v exponenciální fázi růstu obou kmenů v SS médiu (4.2.10.7) a sekrece proteinů Bsp22, BopC a BopN pomocí T3SS metodou imunoblotu. Současně byla porovnána relativní exprese genů zmíněných proteinů navíc s genem *bscN* kódujícím ATPázu, která se podílí na struktuře a funkci T3SS. Postup přípravy kmene RB50 $\Delta$ 0302 je podrobně popsán v následujících kapitolách.



**Obrázek č. 9** Pomocí PCR byly připraveny fragmenty DNA 26DE a 26FG lemující gen *BB0302* na chromozomu *B. bronchiseptica*. Oba fragmenty byly na navazujících koncích ošetřeny restriční endonukleázou *NheI* a spojeny T4 DNA ligázou do fragmentu 26DG. Ten byl vložen do MCS linearizovaného pSS4245. Vzniklý vektor byl po vložení do *B. bronchiseptica* začleněn do chromozomu na základě homologní rekombinace mezi úseky 26DE (varianta č. 1), nebo 26FG (varianta č. 2). Po aktivaci promotoru *ptxA* restriční endonukleáza *I-SceI* způsobila v jejím zásahovém místě dvouvláknový zlom, který byl následně opraven na principu homologní rekombinace. Varianty opravy A a D vedly k navrácení původního genotypu, varianty B a C vedly k delecí genu *BB0302*.

#### 4.2.10.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace DNA pomocí PCR byla použita pro přípravu fragmentů 26DE (768 bp) a 26FG (638 bp) mezi nimiž na chromozomu *B. bronchiseptica* RB50 leží gen *BB0302*. Jako templátová DNA použitá pro amplifikaci těchto fragmentů byla použita genomová DNA (gDNA) této bakterie. Ta byla získána odebráním sotva viditelného množství buněčné biomasy vykultivované na BG agaru do 15 µl dH<sub>2</sub>O. Směs byla homogenizována a inkubována při 100 °C po dobu 10 min. Následně byl odstředěn přebytečný buněčný materiál (21 130 g, 5 min) a nakonec byl odebrán supernatant obsahující gDNA.

Směs PCR obsahovala dle pokynů výrobce DNA polymerázy 1 µl templátové DNA nepřesahující 400 ng v případě gDNA, resp. 30 ng v případě plazmidové DNA (pDNA), 0,5 µl DNA polymerázy a 10 µl jejího pětikrát koncentrovaného reakčního pufru (Herculase II Fusion DNA Polymerase; Agilent Technologies), 2,5 µl *primerů* v obou směrech templátu v poměru 1:1 o výsledné koncentraci 0,5 µM, směs dNTP ve výsledné koncentraci 250 µM od každého (Sigma) a DMSO (Agilent Technologies) ve výsledné koncentraci 4 % (v/v). Celkový objem reakční směsi byl pomocí dH<sub>2</sub>O doplněn do 50 µl. V případě ověřovacích reakcí byl zachován uvedený poměr látek v reakční směsi v polovičním celkovém objemu reakce. Syntetické oligonukleotidy použité jako *primery* byly navrženy tak, aby jejich teplota tání vyhovovala následujícímu schématu, podle kterého probíhala PCR (Tabulka č. 18).

Proces	Teplota [°C]	Doba trvání [s]	Opakování
Počáteční denaturace templátové DNA	98	120	1x
Denaturace DNA	95	30	
Hybridizace <i>primerů</i> s templátovou DNA	58	30	40x
Amplifikace DNA	72	90	
Dokončení amplifikace DNA	72	480	1x

**Tabulka č. 18** Schéma jednotlivých kroků PCR.

Reakce byly provedeny pomocí přístroje T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Kvalita produktu PCR byla zpravidla ověřena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

#### 4.2.10.2 Izolace molekul DNA

Molekuly DNA získané z enzymatických reakcí (PCR, štěpení restriční endonukleázou, ligace) byly pro další použití buď izolovány přímo z reakční směsi, nebo byly produkty



rozděleny pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a fragment DNA o konkrétní velikosti byl z gelu následně extrahován. V obou případech byla DNA izolována pomocí komerční sady QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) dle protokolu předepsaného výrobcem sady. Izolace pDNA z roztoků byla provedena pomocí komerční sady GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific). Čistota a množství získané DNA bylo vždy ověřeno spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) a pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

### **Izolace DNA z reakční směsi**

Produkt DNA enzymatické reakce byl v mikrozkuhavce smíchán s pufrům PB (obohacným o indikátor pH) v poměru 1:5. Směs byla promíchána a v případě změny barvy roztoku (ze žluté na oranžovou až fialovou) bylo pH upraveno přidáním 10 µl 3M roztoku acetátu sodného (pH = 5,0). Směs byla přenesena na speciální kolonu dodávanou výrobcem. Odstředěním směsi byla kolonou zachycena cílová DNA (17 900 g, 1 min), která byla dále očištěna přidáním a odstředěním 750 µl pufru PE s etanolem (17 900 g, 1 min). Nakonec byla prázdná kolona znovu odstředěna (17 900 g, 1 min) pro odstranění veškerých zbytků kapalin. Zachycená DNA byla z kolony jímána do čisté mikrozkuhavky aplikací 50 µl dH<sub>2</sub>O (pH = 7–8,5).

### **Izolace DNA z agarózového gelu**

Fragmenty molekul DNA o příslušné velikosti byly z agarózového gelu extrahovány pomocí skalpelu. Byla zjištěna hmotnost vyjmuté části gelu, která byla dále inkubována v mikrozkuhavce s pufrům QG v poměru 1:3 po dobu 10 min při teplotě 50 °C. Po rozpuštění gelu byla směs promíchána a byla provedena kontrola pH ( $\leq 7,5$ ). Pro zvýšení efektivity extrakce byl do směsi přidán isopropanol v objemovém poměru 1:1 vůči velikosti původního fragmentu gelu a směs byla promíchána. Cílová DNA byla zachycena na speciální koloně dodávané výrobcem přenesením směsi na kolonu a následným odstředěním (17 900 g, 1 min). Zachycená DNA byla očištěna postupným přidáním a odstředěním 500 µl pufru QG (17 900 g, 1 min) a 750 µl pufru PE s etanolem (17 900 g, 1 min). Nakonec byla prázdná kolona znovu odstředěna (17 900 g, 1 min) pro odstranění veškerých zbytků kapalin. Zachycená DNA byla z kolony jímána do čisté mikrozkuhavky aplikací 50 µl dH<sub>2</sub>O (pH = 7–8,5).

### **Izolace plazmidové DNA**

Pro izolaci pDNA bylo odstředěno (12 000 g, 5 min) 10 ml kultury složené z buněk obsahujících cílový plazmid. Pelet byl opakovaným pipetováním rozpuštěn v 250 µl roztoku

*Resuspension Solution*. Dále bylo přidáno 250  $\mu$ l roztoku *Lysis Solution* a směs byla důkladně promíchána. K vzniklému viskóznímu roztoku bylo přidáno 350  $\mu$ l roztoku *Neutralization Solution* a směs byla opět důkladně promíchána. Následně byla odstředěna chromozomální DNA a pevné zbytky buněk (12 000 g, 5 min). Cílová pDNA byla zachycena na speciální koloně dodávané výrobcem přenesením supernatantu na kolonu a následným odstředěním (17 900 g, 1 min). Zachycená pDNA byla očištěna přidáním a odstředěním 500  $\mu$ l roztoku *Wash Solution* (17 900 g, 1 min). Krok čištění pDNA byl jednou zopakován a prázdná kolona byla dodatečně odstředěna (17 900 g, 1 min) pro odstranění veškerých zbytků kapalin. Zachycená pDNA byla nakonec inkubována s 50  $\mu$ l roztoku *Elution Buffer* a jímána z kolony do čisté mikrozkušavky odstředěním (17 900 g, 2 min).

#### 4.2.10.3 Sestavení klonovacího vektoru

Fragmenty DNA 26DE a 26FG použité pro přípravu klonovacího vektoru pSS4245\_26DG byly po předchozí izolaci ošetřeny každý zvlášť restriktivní endonukleázou *NheI*. Reakční směs obsahovala  $\sim$  5  $\mu$ g DNA, 50 U enzymu *NheI* a 10  $\mu$ l desetkrát koncentrovaného pufru NEB 2.1 (oboje New England Biolabs). Reakční směs byla doplněna dH<sub>2</sub>O do objemu 100  $\mu$ l. Reakce probíhala po dobu 16 hod při teplotě 37 °C, poté byla ukončena inkubací trvající 20 min při teplotě 65 °C. Oba takto ošetřené fragmenty DNA byly izolovány z reakčních směsí (4.2.10.2).

Dále byl  $\sim$  1  $\mu$ g od obou fragmentů DNA smíchán spolu s dH<sub>2</sub>O do výsledného objemu 15  $\mu$ l. Tato směs fragmentů DNA byla inkubována po dobu 5 min při teplotě 65 °C a následně byla směs inkubována v ledové lázni po dobu 5 min. Následně bylo k této směsi přidáno 5 U T4 DNA ligázy, 2  $\mu$ l jejího desetkrát koncentrovaného pufru a 2  $\mu$ l PEG (vše Thermo Fisher Scientific). Výsledná směs o objemu 20  $\mu$ l byla inkubována 16 hod při teplotě 22 °C. Reakce byla ukončena inkubací trvající 20 min při teplotě 65 °C. Oba fragmenty tak byly v místě kohezivních konců vzniklých působením restriktivní endonukleázy *NheI* spojeny ligací do jednoho fragmentu DNA označeného 26DG. Tento fragment byl následně izolován z reakční směsí (4.2.10.2), amplifikován pomocí PCR (4.2.10.1) a produkt byl rozdělen na základě velikosti molekul DNA v agarózovém gelu (4.2.9). Část gelu obsahující molekuly DNA o požadované velikosti (tj. 1 400 bp) byla vyjmuta a DNA byla extrahována (4.2.10.2). Správnost pořadí nukleotidů v izolovaném konstruktu DNA 26DG byla ověřena pomocí sekvenace DNA (4.2.10.6).

Fragment DNA 26DG byl následně vložen do místa MCS předem linearizovaného plazmidu pSS4245 s tupými konci (4.1.3). Reakční směs obsahovala  $\sim$  1,3  $\mu$ g fragmentu DNA 26DG,

20 ng pDNA, 5 U T4 DNA ligázy, 2  $\mu$ l jejího desetkrát koncentrovaného pufru a 2  $\mu$ l PEG. Směs byla doplněna dH<sub>2</sub>O do výsledného objemu 20  $\mu$ l a byla inkubována po dobu 16 hod při teplotě 22 °C. Reakce byla ukončena 20min inkubací při teplotě 65 °C. Produkt ligační reakce (pDNA) byl izolován (4.2.10.2) a následně transformována do kompetentních buněk bakterie *E. coli* SM10  $\lambda$ pir.

#### 4.2.10.4 Transformace plazmidu do kompetentních buněk

Vektor pSS4245\_26DG byl transformován do kompetentních buněk bakterie *E. coli* SM10  $\lambda$ pir metodou tepelného šoku. K transformaci byla použita veškerá izolovaná pDNA bez ohledu na její koncentraci s cílem získat co největší množství kolonií obsahujících transformovaný vektor. Bylo totiž možné, že dojde také k transformaci vektoru, který byl ligační reakcí uzavřen bez vloženého fragmentu DNA. Izolovaná pDNA o objemu 35  $\mu$ l byla smíchána s 200  $\mu$ l suspenze kompetentních buněk (OD<sub>600</sub> = 0,3). Směs byla inkubována ~ 1 hod v ledové lázni, následně byla inkubována po dobu 90 s při teplotě 42 °C a ihned byla přenesena zpět do ledové lázně. Ke směsi byl dále přidán 1 ml LB média temperovaného na teplotu 37 °C a směs byla inkubována po dobu 40 min při teplotě 37 °C za stálého vzdušnění kultury třepáním (160 rpm). Buňky byly následně očkovány v objemu 100  $\mu$ l na LB agar obohacený o Amp a Kan, zbytek buněk byl očkován jako koncentrát buněk získaný odstředěním buněk (17 900 g, 1 min), odstraněním supernatantu a rozmícháním buněčného peletu ve 100  $\mu$ l tekutého LB média. Buňky byly kultivovány po dobu 24 hod a vyrostlé kolonie byly přeočkovány na stejný typ agaru pro získání většího množství biomasy buněk. Přítomnost vektoru pSS4245\_26DG byla následně testována pomocí PCR a sekvenováním DNA. Pozitivní kmen byl konzervován v 20% roztoku glycerolu při teplotě -80 °C.

#### 4.2.10.5 Konjugace a homologní rekombinace vektoru

Metoda konjugace byla použita pro přenesení vektoru pSS4245\_26DG do buněk bakterie *B. bronchiseptica* RB50. V dostatečném předstihu před samotnou konjugací byly na LB agaru obohaceném o Amp a Kan vykultivovány buňky *E. coli* nesoucí vektor a recipientní buňky *B. bronchiseptica* na BG agaru obohaceném o MgSO<sub>4</sub>, jehož přítomnost brání transkripci z promotoru *ptxA* a následnému rozštěpení vektoru (4.1.3). Buňky obou kmenů byly pomocí bakteriologické kličky smíchány na ploše ~ 7 cm<sup>2</sup> BG agaru obohaceném o MgSO<sub>4</sub> a CaCl<sub>2</sub> v poměru přibližně 10:1 (převaha *B. bronchiseptica*). Směs buněk byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 3 hod. Následně byla buněčná kultura odebrána a resuspendována v 1 ml SS média. Byla připravena ředící řada inokula a buňky byly očkovány po 100  $\mu$ l na BG agary

obohacené o MgSO<sub>4</sub>, Str a Kan. Složení tohoto média zamezuje růstu buněk *E. coli* a *B. bronchiseptica* bez vektoru začleněného do chromozomu. Po 3 dnech kultivace byly vyrostlé kolonie přeočkovány na standardní BG agar. Snížení koncentrace MgSO<sub>4</sub> vedlo k aktivaci promotoru *ptxA*, resp. k expresi restriční endonukleázy I-SceI, která způsobila dvouvláknový zlom specificky v místě vektoru začleněného do chromozomu. Buněčný aparát opravil poškozenou DNA pomocí homologní rekombinace zdvojených úseků 26DE a 26FG (jedna kopie původní, jedna kopie vložená jako součást vektoru), což vede teoreticky v polovině případů k delecí genu *BB0302* (viz schéma – Obrázek č. 9). Jeho ne/přítomnost v buňkách izolovaných kolonií byla ověřena pomocí PCR a sekvenací DNA.

#### 4.2.10.6 Sekvence DNA

Konkrétní pořadí nukleotidů bylo zjišťováno metodou Sangerova sekvenování DNA, kterou zajistila specializovaná společnost GATC Biotech. K sekvenaci byla připravena a odeslána směs příslušného sekvenačního *primeru* o výsledné koncentraci 5 μM a templátové DNA o hmotnosti 400–500 ng v případě pDNA, resp. 100–400 ng v případě produktu PCR. Sekvenační data byla zaslána elektronicky a vyhodnocena pomocí programu SnapGene® Viewer (verze 5.0.7; GSL Biotech).

#### 4.2.10.7. Měření růstové křivky bakteriální kultury

Růst buněčné kultury v závislosti na čase byl sledován pomocí spektrofotometru Epoch 2 (BioTek), který umožňuje průběžné zaznamenávání změn OD rostoucích kultur během kultivace bakterií v tekutém médiu na mikrotitrační destičce (Nunc™, Thermo Fisher Scientific). Buňky byly nejprve kultivovány po dobu ~ 2 dnů na BG agaru a následně byly přeočkovány do SS média, kde byly kultivovány po dobu 24 hod, resp. do stacionární fáze růstu. Následně bylo 10 μl kultury přeočkováno na mikrotitrační destičku, kde byla kultivace provedena v objemu 2 ml (počáteční OD<sub>600</sub> ~ 0,001). Kultivace probíhala následujících 48 hod při teplotě 37 °C za stálého míchání. OD vzorků byly měřeny automaticky s frekvencí 20 min. Měření bylo provedeno ve třech biologických opakováních. Pro určení časového intervalu exponenciální fáze růstu buněčné kultury byla získaná data vyobrazena graficky v semilogaritmickém vynesení. Naměřené hodnoty OD náležící tomuto časovému úseku byly proloženy lineární funkcí, jejíž předpis byl následně použit pro výpočet generační doby a specifické růstové rychlosti sledovaných buněk. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí programů Fityk (verze 1.3.1.; GPL) a Excel 2016 (Microsoft Office).

## 5 Výsledky

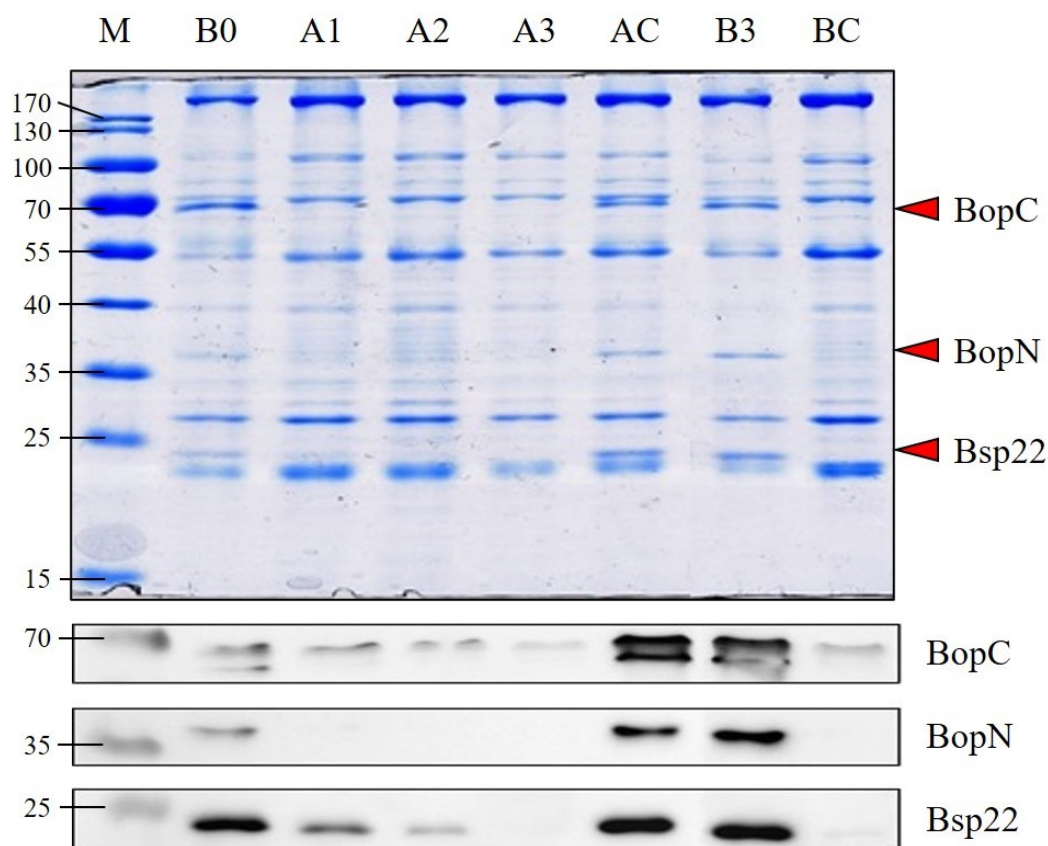
Výsledky této diplomové práce lze rozdělit do tří oddělených podkapitol, které odpovídají jejím cílům. Práce si vzala za cíl popsat aktivitu T3SS laboratorního kmene *B. pertussis* Tohama I v závislosti na kontaktu s krví během kultivace na pevném médiu (5.1), připravit a charakterizovat kmen *B. bronchiseptica* RB50Δ0302 s ohledem na sekreci pomocí T3SS (5.2) a porovnat odolnost původních českých vakcinačních kmenů a současných českých klinických izolátů bakterie *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra v podmínkách *in vitro* (5.3).

### 5.1 Aktivita T3SS bakterie *B. pertussis* v závislosti na kontaktu s krví

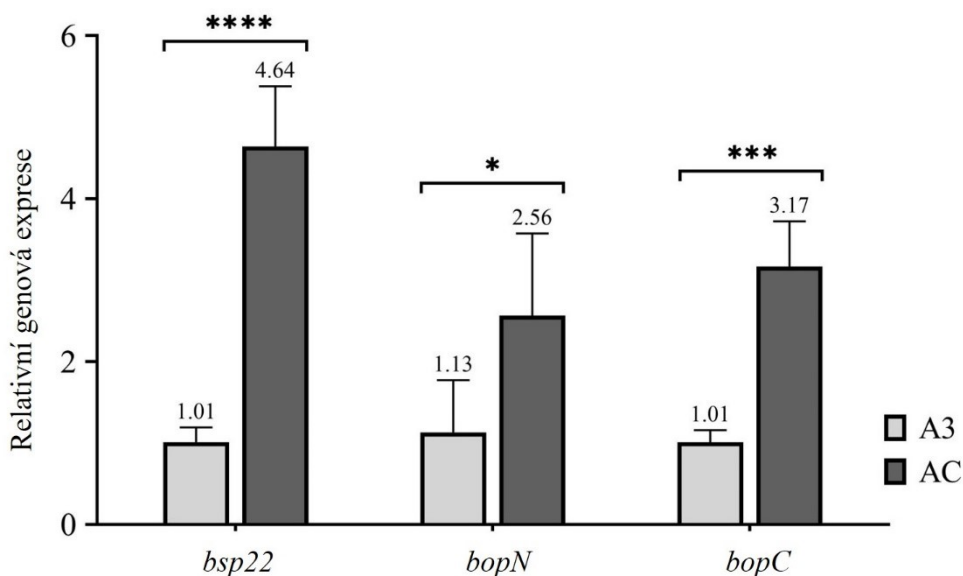
Rozdíly v produkci a sekreci proteinů T3SS u laboratorního kmene Tohama I bakterie *B. pertussis* byly pozorovány během kultivace na CHA agaru a CHA agaru obohaceném beraní krví (CHAB agar) s následnou kultivací v SS médiu (schéma pokusu viz Obrázek č. 8). Vzorky proteinů uvolněných do SS média byly nejprve rozděleny pomocí elektroforézy SDS-PAGE a poté byly ve vzorcích detekovány proteiny Bsp22, BopN a BopC pomocí imunoblotu (Obrázek č. 10). Takto byly zpracovány vzorky z původní kultury (B0), vzorky prvních dvou pasáží kultivovaných na CHA agaru (A1 a A2), vzorky třetích pasáží kultivovaných na CHA i CHAB agaru (A3 a B3) a jejich pasáží přenesených na opačný typ agaru (AC a BC).

Původní vzorek B0 ukazuje, že v počátku experimentu probíhala aktivní sekrece sledovaných proteinů. Vzorky odebrané z kultur A1, A2 a A3, které byly pasážovány na CHA agaru, ukazují postupný pokles sekrece sledovaných proteinů do média. Po přenesení třetí pasážované kultury na CHAB agar, vzorek AC, došlo k obnovení sekrece pomocí T3SS. Aktivní sekrece pomocí T3SS byla naopak pozorována v případě vzorku B3, který odpovídá třetí pasáži kultury pěstované v kontaktu s krví na CHAB agaru (sekrece na stejné úrovni byla pozorována i v případě předchozích pasáží, tj. B1 a B2). Po přenesení kultury B3 na CHA agar, vzorek BC, došlo k významnému poklesu sekrece pozorovaných proteinů T3SS do média.

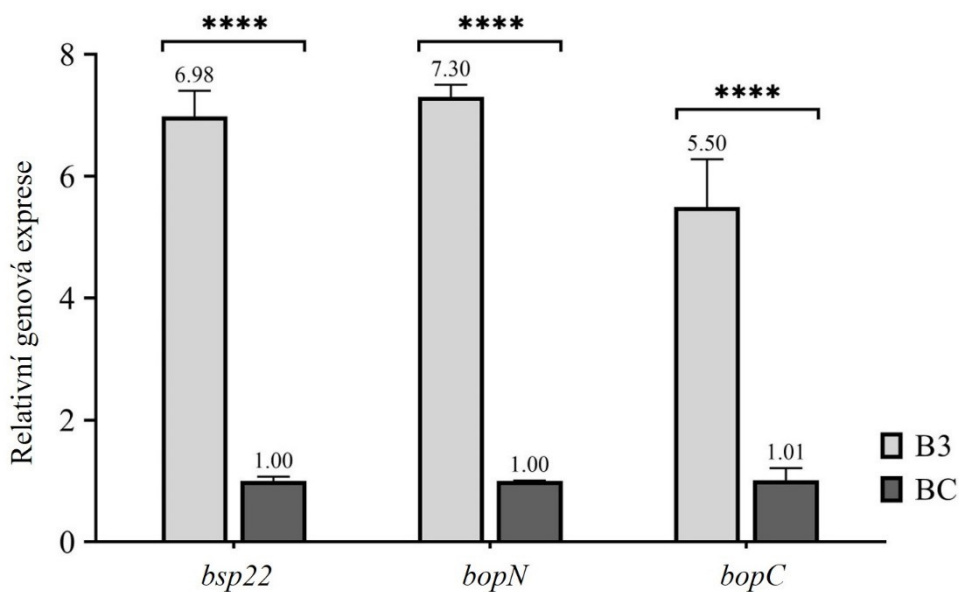
Význam přítomnosti krve v agaru na produkci a sekreci komponent T3SS byl současně sledován na úrovni exprese genů (tj. množství mRNA) kódujících sledované proteiny pomocí qPCR (4.2.8). Byla porovnána exprese genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* ve vzorcích A3 a AC (Obrázek č. 11), kde byla kultura pasážovaná na CHA agaru (A3) přenesena na CHAB agar (AC). Stejně tak byla porovnána exprese těchto genů ve vzorcích B3 a BC (Obrázek č. 12), kde byla naopak kultura pasážovaná na CHAB agaru (B3) přenesena na CHA agar (BC).



**Obrázek č. 10** Snímek gelu SDS–PAGE s rozdělenými proteiny obarvenými pomocí roztoku *Colloidal Coomassie G-250*. Obrázek ukazuje rovnoměrné množství proteinů v jednotlivých vzorcích: **M** = standard molekulových hmotností; **B0** = původní kultura pěstovaná na CHAB agar; **A1-3** = pasážované kultury na CHA agar; **AC** = kultura přeočkovaná na CHAB agar po předchozím pasážování na CHA agar. **B3** = třetí kultura pasážovaná na CHAB agar (předchozí dvě kultury, tj. B1 a B2, nejsou zobrazeny); **BC** = kultura přeočkovaná na CHA agar po předchozím pasážování na CHAB agar. Červené šipky označují předpokládanou pozici sledovaných proteinů sekretovaných pomocí T3SS, konkrétně Bsp22, BopN a BopC. Spodní část obrázku ukazuje snímky nitrocelulózové membrány získané metodou imunoblotu. Na zobrazených částech membrán je možné vidět chemiluminiscenční signál v místech navázání protilátek specificky rozeznávajících pozorované proteiny.



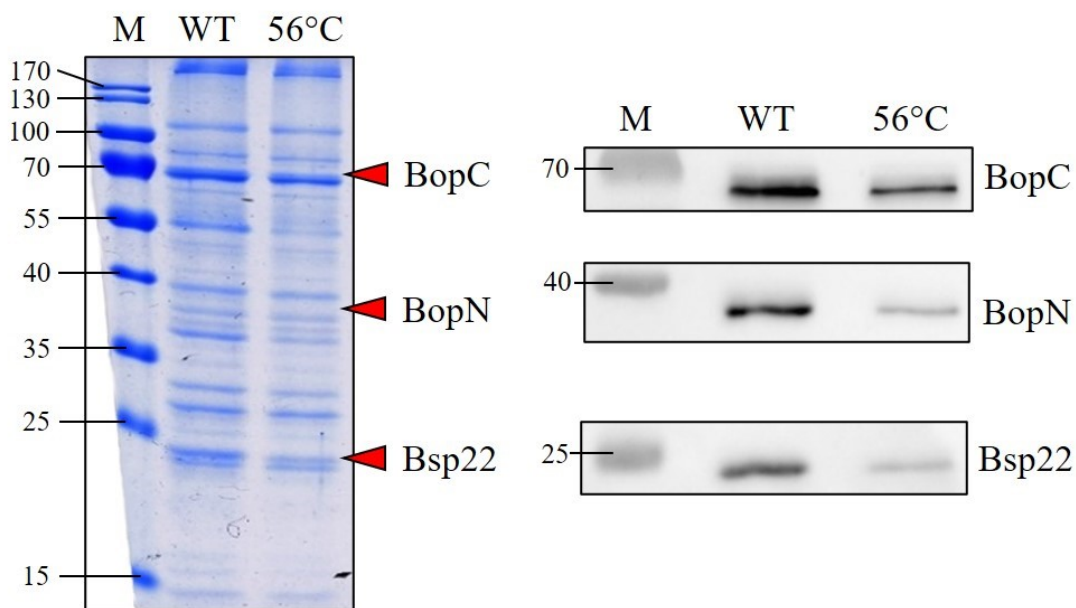
**Obrázek č. 11** Obrázek graficky znázorňuje poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* vztaženého na množství mRNA referenčního genu *rpoB*. **A3** = třetí následná kultura pasážovaná na CHA agar; **AC** = kultura přeočkovaná na CHAB agar po předchozím pasážování na CHA agar. Výsledky párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí hvězdiček: \*\*\*\* =  $0,0001$ ; \*\*\* =  $0,0003$ ; \* =  $0,0214$ .



**Obrázek č. 12** Obrázek graficky znázorňuje poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* vztaženého na množství mRNA referenčního genu *rpoB*. **B3** = třetí následná kultura pasážovaná na CHAB agar; **BC** = kultura přeočkovaná na CHA agar po předchozím pasážování na CHAB agar. Výsledky párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí hvězdiček: \*\*\*\* =  $0,0001$ .

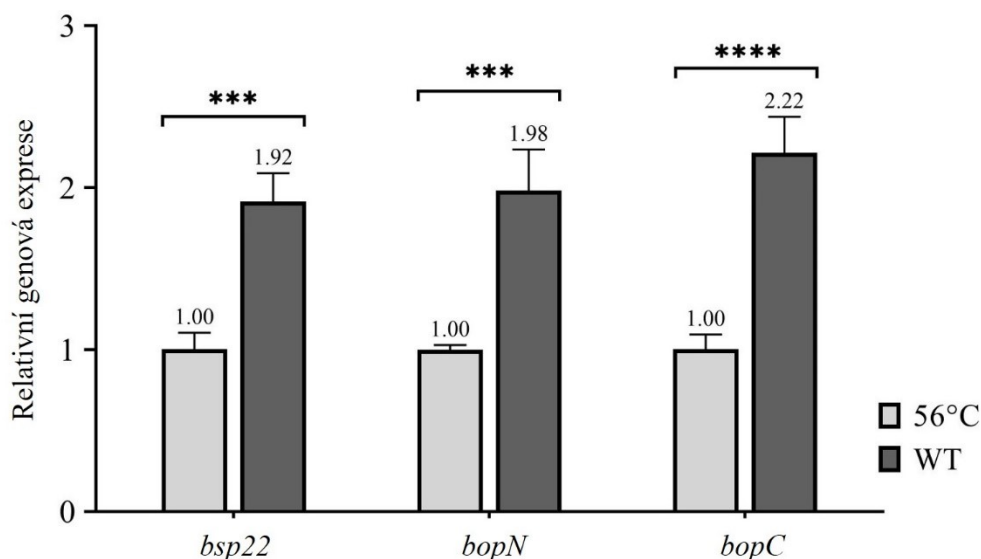
Z uvedených výsledků je zřejmé, že v případě kultur kultivovaných na CHA agaru (A3 a BC) byla exprese genů kódujících proteiny T3SS výrazně nižší než v případě kultur kultivovaných na CHAB agaru (B3 a AC).

Na základě těchto výsledků byl dále studován vliv biologicky aktivních termolabilních látek obsažených v beraní krvi na úroveň sekrece pomocí T3SS. K tomu byly buňky *B. pertussis* Tohama I kultivovány současně na CHAB agaru a CHAB agaru obohaceném tepelně ošetřenou beraní krvi s následnou kultivací obou kultur v SS médiu. Aktivita sekrece pomocí T3SS obou vzorků byla následně porovnána obdobně, jako v předchozím experimentu: získané vzorky proteinů uvolněných do SS média byly zpracovány pomocí elektroforézy SDS-PAGE a pomocí imunoblotu byly detekovány proteiny sekretované pomocí T3SS (Bsp22, BopN a BopC); (Obrázek č. 13). Poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* v obou vzorcích bylo stanoveno pomocí qPCR (Obrázek č. 14).



**Obrázek č. 13** Snímek gelu SDS-PAGE s rozděleními proteiny obarvenými pomocí roztoku *Colloidal Coomassie G-250*. Obrázek ukazuje rovnoměrné množství proteinů v jednotlivých vzorcích: **M** = standard molekulových hmotností; **WT** = soubor proteinů izolovaných z buněk *B. pertussis* Tohama I kultivovaných na CHAB agaru a následně v SS médiu; **56°C** = soubor proteinů izolovaných z buněk *B. pertussis* Tohama I kultivovaných na CHAB agaru obohaceném tepelně ošetřenou beraní krvi po dobu 30 min při 56 °C a následně kultivované v SS médiu. Červené šipky označují předpokládanou pozici sledovaných proteinů sekretovaných pomocí T3SS, konkrétně Bsp22, BopN a BopC. Pravá část obrázku ukazuje snímky nitrocelulóзовé membrány získané metodou imunoblotu. Na zobrazených částech membrán je možné vidět chemiluminiscenční signál v místech navázání protilátek specificky rozeznávajících pozorované proteiny.

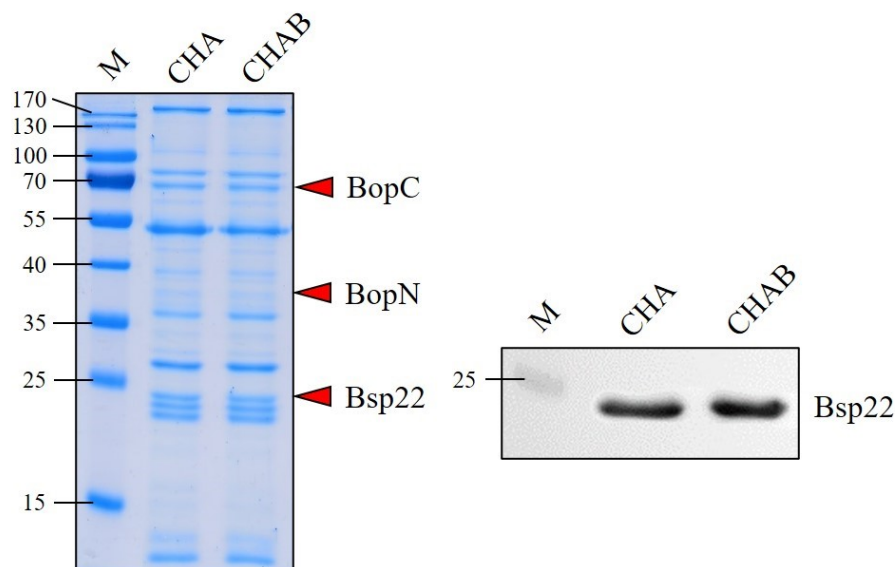




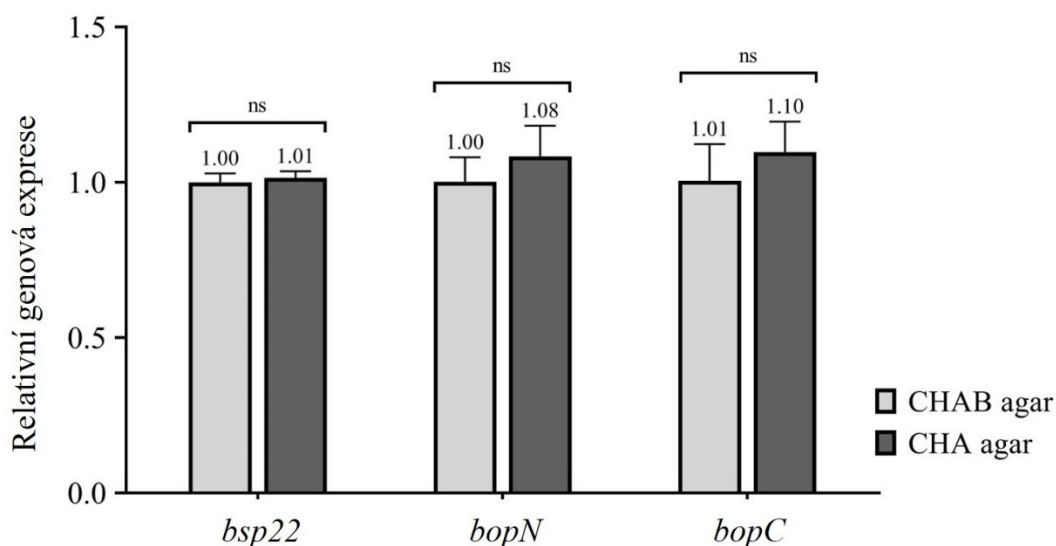
**Obrázek č. 14** Obrázek graficky znázorňuje poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* vztaženého na množství mRNA referenčního genu *rpoB*. Výsledná data jsou podílem poměrného množství mRNA těchto genů izolované z buněk *B. pertussis* Tohama I kultivovaných buď na CHAB agaru = **WT**, nebo na CHAB agaru obohaceném tepelně ošetřenou beraní krví po dobu 30 min při 56 °C = **56°C**. Výsledky párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí hvězdiček: \*\*\*  $< 0,0004$  \*\*\*\*  $< 0,0001$ .

Získaná data naznačují, že inaktivace termolabilních složek beraní krve použité pro obohacení CHA agaru způsobuje snížení exprese genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* a sekreci produktů těchto genů do SS média. Vzhledem k tomu, že referenční kmen Tohama I byl izolován v roce 1954 a byl od té doby intenzivně pasážován v laboratorních podmínkách, byl dále vliv krve na produkci a sekreci T3SS sledován v nedávno izolovaném kmeni B1917. Vzorky kultur kmene B1917 pěstovaných na obou typech agaru (CHA a CHAB) s následnou kultivací v SS médiu byly analyzovány podobně, jako v předchozích případech: ve vzorcích supernatantu SS média byl jako *marker* aktivity T3SS detekován protein Bsp22 a z buněčného peletu byla izolována celková RNA pro kvantifikaci mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC*. Výsledky jsou zobrazeny na následujících obrázcích (Obrázky č. 15 a 16).

V případě klinického izolátu B1917 nebyl pozorován signifikantní rozdíl v aktivitě T3SS při porovnání buněk kultivovaných na CHA agaru a CHAB agaru. Z těchto výsledků vyplývá, že u pasážovaného kmene Tohama I došlo k poklesu exprese a produkce T3SS komponent a k jejich opětovné aktivaci je zapotřebí kontakt s krví. U současného klinického izolátu B1917 k tomuto poklesu nedošlo a proto kontakt s krví neměl žádný indukující efekt.



**Obrázek č. 15** Snímek gelu SDS–PAGE s rozděleními proteiny obarvenými pomocí roztoku *Colloidal Coomassie G-250*. Obrázek ukazuje rovnoměrné množství proteinů v jednotlivých vzorcích: **M** = standard molekulových hmotností; **CHA** = soubor proteinů izolovaných z buněk *B. pertussis* B1917 kultivovaných na CHA agaru a následně v SS médiu; **CHAB** = soubor proteinů izolovaných z buněk *B. pertussis* B1917 kultivovaných na CHAB agaru a následně v SS médiu. Červené šipky označují předpokládanou pozici proteinů Bsp22, BopN a BopC sekretovaných pomocí T3SS. Pravá část obrázku ukazuje snímek získaný pomocí imunoblotu. Na zobrazené části membrány je možné vidět chemiluminiscenční signál v místě navázání protilátky specificky rozeznávající protein Bsp22.



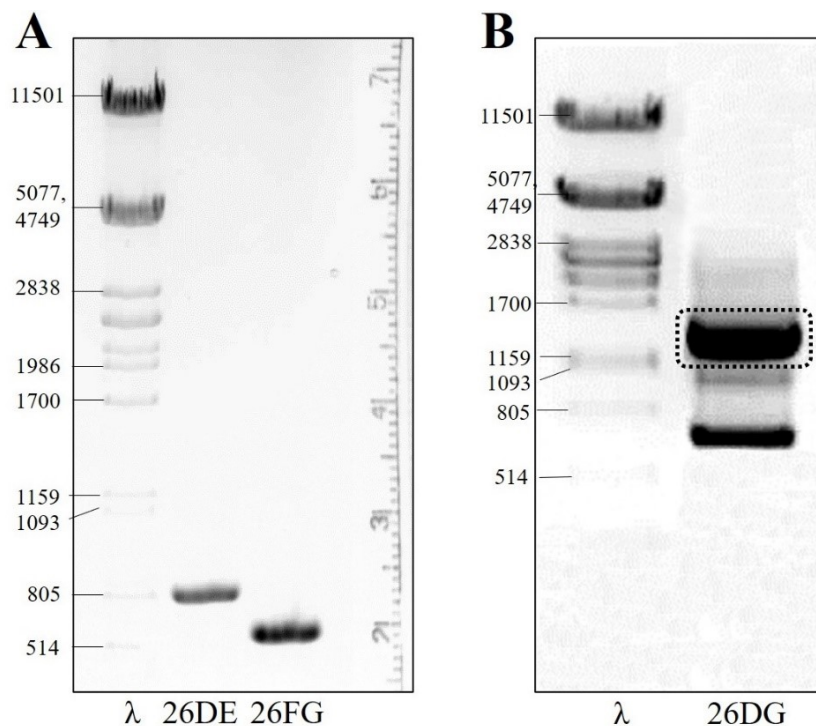
**Obrázek č. 16** Obrázek graficky znázorňuje poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN* a *bopC* vztahového na množství mRNA referenčního genu *rpoB*. Výsledná data jsou podílem poměrného množství mRNA těchto genů izolované z buněk *B. pertussis* B1917 kultivovaných buď na CHA agaru = **CHA agar**, nebo na CHA agaru = **CHAB agar**. Výsledky párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí zkratky „ns“ (nesignifikantní)  $p < 0,245$ .

## 5.2 Role genu *BB0302* v regulaci exprese a produkce T3SS

Na základě našich předchozích publikovaných výsledků (Bibova *et al.*, 2015) a jisté homologie s regulátory T3SS u rostlinných patogenů, byl gen *BP0209* vytipován jako hypotetický regulátor T3SS u *B. pertussis*. Bohužel delece genu *BP0209* se nám nepodařila, zřejmě kvůli přítomnosti IS481 elementů, které přiléhají k oběma stranám tohoto genu a které značně komplikovaly přípravu delece pomocí homologní rekombinace. Proto jsme se rozhodli použít příbuzné bakterie *B. bronchiseptica*, u které není homologní gen *BB0302* obklopen IS481 elementy a příprava delece tak byla mnohem jednodušší.

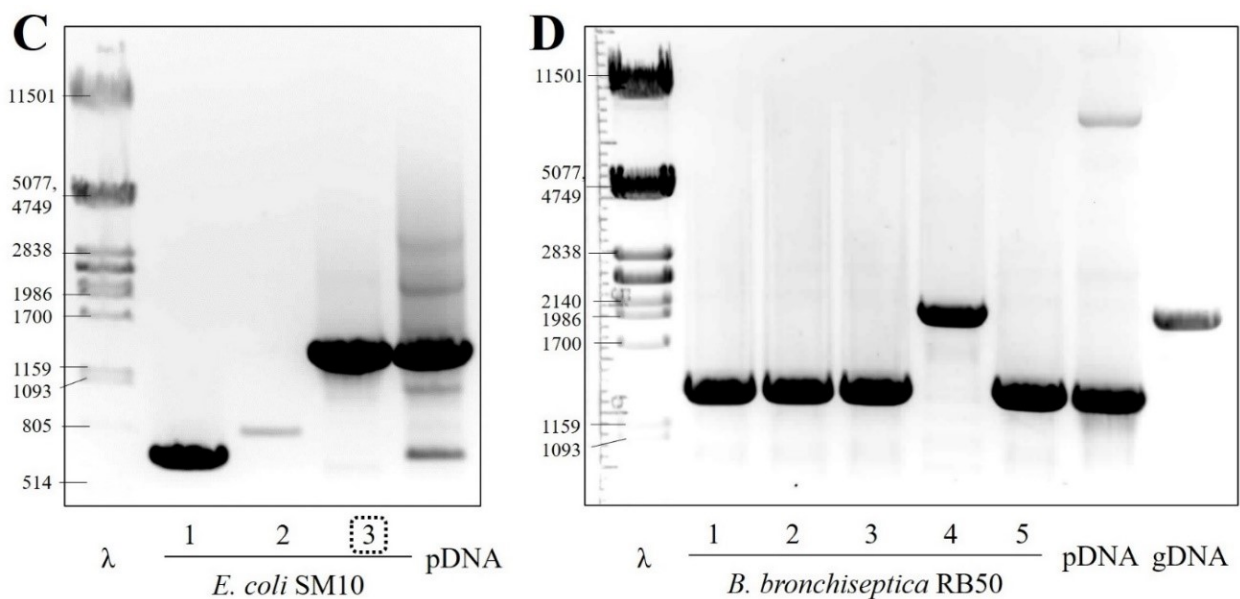
### 5.2.1 Příprava kmene *B. bronchiseptica* RB50 $\Delta$ 0302

Pro přípravu klonovacího vektoru pSS4245\_26DG byly pomocí PCR připraveny fragmenty DNA zvané 26DE (768 bp) a 26FG (638 bp) lemující gen *BB0302* na chromozomu *B. bronchiseptica* RB50 (Obrázek č. 17 A). Oba fragmenty byly spojeny ligací do jednoho fragmentu o velikosti 1 400 bp označeného jako 26DG (Obrázek č. 17 B).



**Obrázek č. 17** Příprava delece genu *BB0302*. Snímky agarózových gelů s rozdělenou DNA ukazují v obou částech v prvním sloupci zleva standard velikostí nukleových kyselin (hodnoty v bp). Panel A ukazuje přítomnost fragmentů 26DE a 26FG přibližně o předpokládané velikosti (768 bp a 638 bp) získaných pomocí PCR. Panel B ukazuje fragment 26DG (1 400 bp), resp. produkt ligace fragmentů 26DE a 26FG. Vyznačená část gelu obsahující pravděpodobně fragment 26DG byla vyjmuta pro následnou izolaci této DNA.

Fragment 26DG byl následně vyjmut z gelu, amplifikován pomocí PCR a po sekvenaci DNA byl ligací vložen do MCS plazmidu pSS4245. Vzniklý vektor pSS4245\_26DG byl transformován do buněk *E. coli* SM10  $\lambda$ pir. Po transformaci byly buňky kultivovány na LB agaru obohaceném o Amp a Kan. Jedna ze tří kolonií testovaných pomocí PCR za použití specifických *primerů* obsahovala produkt odpovídající svou velikostí (1 400 bp) fragmentu 26DG (Obrázek č. 18 C). Tento klon byl po sekvenaci izolované pDNA následně použit pro přenesení vektoru do buněk *B. bronchiseptica* RB50 pomocí konjugace. Po konjugaci byly buňky přeneseny na BG agar navozující podmínky pro vložení vektoru včetně mutovaného genu do chromozomu díky homologii s fragmenty 26DE a 26FG. Dále byly vyrostlé kolonie přeočkovány na BG agar navozující podmínky pro opětovné vyštěpení vektoru z chromozomu, během kterého dojde k rekombinaci a současnému vyštěpení jedné z kopií genu *BB0302*, tj. buď mutované, nebo původní (viz Obrázek č. 9). Přítomnost genu *BB0302* v gDNA izolované z pěti náhodně vybraných kolonií byla otestována pomocí PCR (Obrázek č. 18 D).



**Obrázek č. 18** Příprava delece genu *BB0302*. Snímky ukazují produkty PCR rozdělené podle velikosti. Pro PCR byly použity specifické *primery* ověřující přítomnost úseku DNA 26DG velkého 1 400 bp. Panel C ukazuje produkty PCR získané amplifikací z pDNA izolované ze tří kolonií *E. coli* SM10 získaných po transformaci vektoru pSS4245\_26DG. Přítomnost fragmentu o požadované velikosti byla pozorována pouze v případě klonu č. 3 (zvýrazněno rámečkem). Panel D ukazuje produkty PCR získané amplifikací z gDNA izolované z pěti kolonií *B. bronchiseptica* RB50 izolovaných po konjugaci a homologní rekombinaci s následným vyštěpením vektoru pSS4245\_26DG z chromozomu. Velikost produktů z klonů č. 1, 2, 3 a 5 odpovídala deleci genu *BB0302*, v případě klonu č. 4 došlo pravděpodobně k navrácení původního genotypu. V obou částech je v prvním sloupci zleva standard velikostí nukleových kyselin (hodnoty v bp). Kontrolní vzorek „gDNA“ byl získán amplifikací z gDNA izolované z divokého typu *B. bronchiseptica* RB50, kontrolní vzorek „pDNA“ byl získán amplifikací z vektoru pSS4245\_26DG.

V jednom případě byl pozorován návrat k původnímu genotypu (2 063 bp), ve zbylých čtyřech případech byl získán pouze produkt odpovídající svou velikostí fragmentu DNA 26DG (1 400 bp), což nasvědčovalo úspěšné deleci genu *BB0302*. Jeden z těchto klonů byl náhodně vybrán pro potvrzení delece genu *BB0302* pomocí sekvenace DNA a byl následně použit pro charakterizaci genu *BB0302*.

## 5.2.2 Charakterizace kmene *B. bronchiseptica* RB50Δ0302

V rámci charakterizace kmene RB50Δ0302 byla porovnána jeho rychlost růstu v SS médiu s rychlostí růstu divokého typu, RB50. Souvislost mezi genem *BB0302* a aktivitou T3SS byla zkoumána na úrovni transkripce některých genů T3SS do mRNA (kvantifikace pomocí qPCR; 4.2.8) a sekrece některých proteinů T3SS do SS média (detekce pomocí imunoblotu; 4.2.4 a 4.2.5) opět v porovnání s divokým typem.

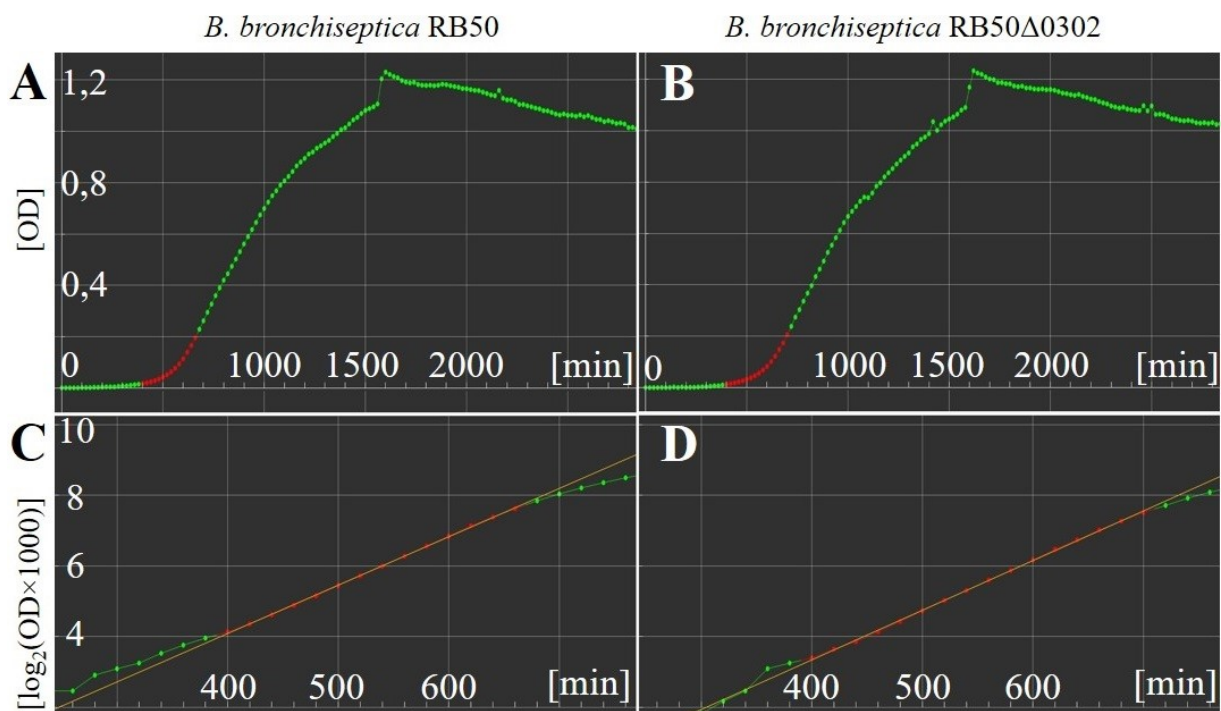
### 5.2.2.1 Růstová rychlost

V průběhu kultivace byly v sledovaných kulturách monitorovány hodnoty optické hustoty (OD). Z těchto hodnot byly získány růstové křivky a v semilogaritmickém vynesení byla částí růstové křivky odpovídající exponenciální fázi růstu proložena lineární funkce (Obrázek č. 19). Předpis takto získané funkce popisující exponenciální fázi růstu byl použit pro výpočet generační doby a růstové rychlosti v exponenciální fázi růstu buněčných kultur obou studovaných kmenů. Výsledky získané aritmetickým průměrem hodnot biologických triplikátů shrnuje následující tabulka (Tabulka č. 19).

Bakteriální kmen	RB50	RB50Δ0302
Generační doba $T_d$ [min]	74,60	73,46
Směrodatná odchylka [min]	± 4,07	± 2,03
Růstová rychlost $c$ [ $\text{hod}^{-1}$ ]	0,80	0,82
Směrodatná odchylka [ $\text{hod}^{-1}$ ]	± 0,04	± 0,02

**Tabulka č. 19** Generační doba a růstová rychlost buněk kmenů *B. bronchiseptica* RB50 a RB50Δ0302 v exponenciální fázi růstu. Výsledné hodnoty jsou aritmetickým průměrem biologických triplikátů doplněných směrodatnou odchylkou.

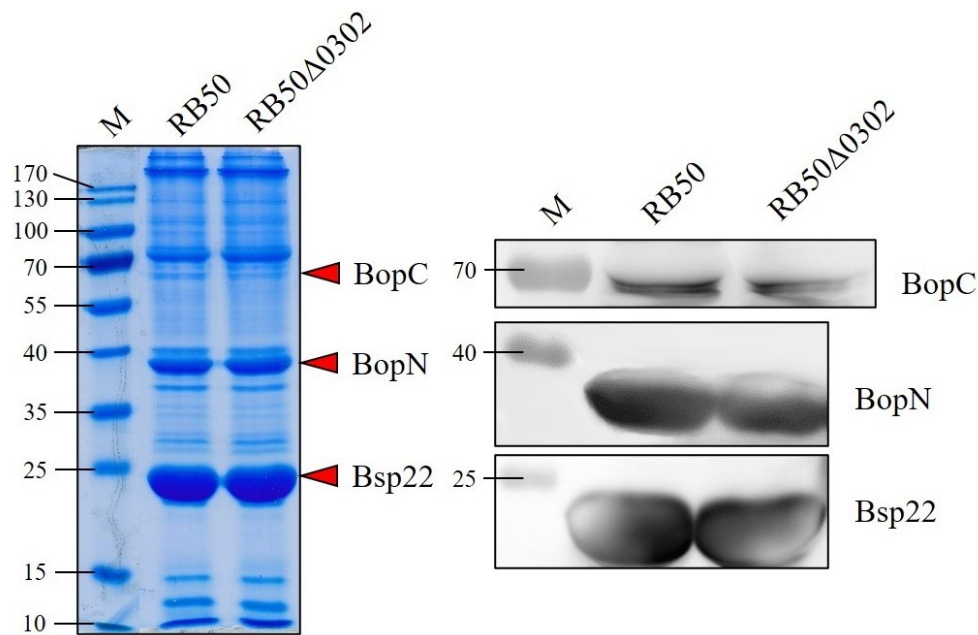
V případě obou kmenů byla zjištěna velice podobná generační doba a růstová rychlost v exponenciální fázi růstu. Generační doba byla stanovena přibližně na 74 min, růstová rychlost dosáhla hodnoty asi  $0,8 \text{ hod}^{-1}$ . Delece genu *BB0302* tedy s nejvyšší pravděpodobností neovlivnila růstové vlastnosti kmene RB50.



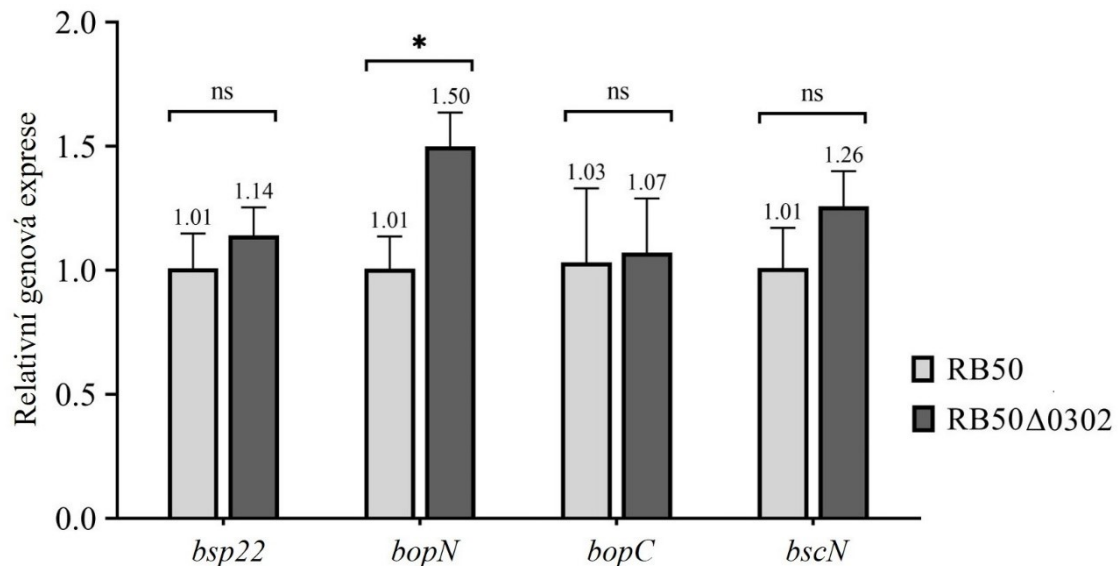
**Obrázek č. 19** Růstové vlastnosti divokého typu a kmene RB50Δ0302 *B. bronchiseptica*. Panely A a B ukazují grafické vynesení závislosti OD na čase od počátku kultivace obou studovaných kmenů bakterie *B. bronchiseptica* až do jejího ukončení. Panely C a D zachycují detail exponenciální fáze růstu vyobrazené na panelech A a B. Závislost OD na čase je zde v semilogaritmickém vynesení. Hodnotami exponenciální fáze růstu na panelech C a D je proložena lineární funkce (oranžová přímka), popisující charakter růstu buněčné kultury. Její funkční předpis byl použit pro výpočet generační doby a růstové rychlosti obou kmenů. Červenou barvou jsou zvýrazněny hodnoty exponenciální fáze růstu kultur. Obrázek ukazuje reprezentativní data jednoho ze tří biologických opakování zpracovaných v programu Fityk (1.3.1).

### 5.2.2.2 Aktivita T3SS

Sekrece proteinů Bsp22, BopN a BopC kmeny RB50 a RB50Δ0302 byla testována pomocí imunoblotu. Kvalitativní výsledky jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obrázek č. 20). Současně byla pomocí qPCR sledována exprese odpovídajících genů a také genu *bscN* kódujícího ATPázu T3SS. Výsledky tohoto pozorování byly zpracovány graficky (Obrázek č. 21). Na základě těchto výsledků se zdá, že delece genu *BB0302* neovlivnila expresi genů *bsp22*, *bopN*, *bopC* a *bscN*, ani sekreci jejich produktů.



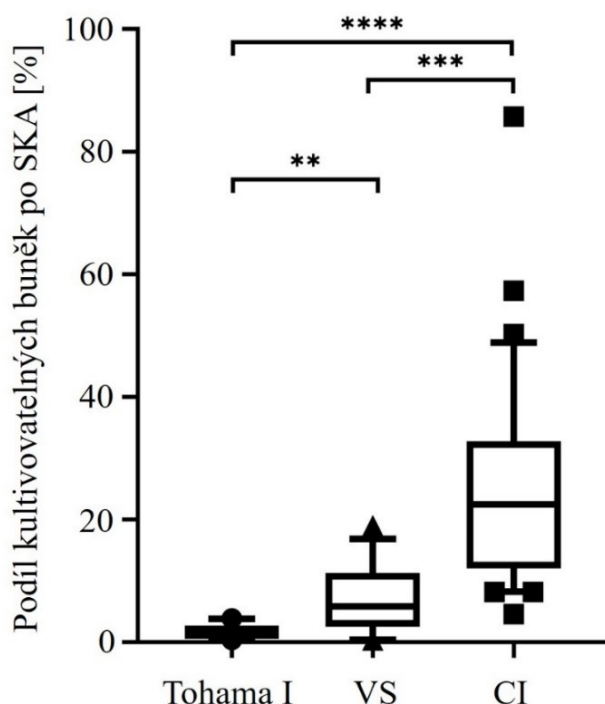
**Obrázek č. 20** Snímek gelu SDS–PAGE s rozděleními proteiny obarvenými pomocí roztoku *Colloidal Coomassie G-250*. Obrázek ukazuje rovnoměrné množství proteinů v jednotlivých vzorcích: **M** = standard molekulových hmotností; **RB50** = soubor proteinů sekretovaných do SS média kmenem RB50; **RB50Δ0302** = soubor proteinů sekretovaných do SS média kmenem RB50Δ0302. Červené šipky označují předpokládanou pozici sledovaných proteinů sekretovaných pomocí T3SS, konkrétně Bsp22, BopN a BopC. Pravá část obrázku ukazuje snímky získané pomocí imunoblotu. Na zobrazených částech membrán je možné vidět chemiluminiscenční signál v místech navázání protilátek specificky rozeznávajících pozorované proteiny.



**Obrázek č. 21** Obrázek graficky znázorňuje poměrné množství mRNA genů *bsp22*, *bopN*, *bopC* a *bscN* vztaženého na množství mRNA referenčního genu *rpoB*. Výsledná data jsou podílem poměrného množství mRNA těchto genů izolované z buněk *B. bronchiseptica* divokého typu (RB50) a kmene RB50Δ0302. Výsledky párového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí hvězdiček: \* = 0,028; ns (nesignifikantní)  $p < 0,175$ .

### 5.3 Odolnost klinických izolátů *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra

Pomocí metody SKA (3.3.3.2 a 4.2.2) byla stanovena odolnost souboru devíti současných českých klinických izolátů, pěti původních československých vakcinačních kmenů a referenčního kmene Tohama I bakterie *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra. Odolnost byla určena jako procentuální podíl kultivovatelných buněk vystavených krevnímu séru a kultivovatelných buněk vystavených tepelně inaktivovanému séru. Odolnost vůči séru, resp. průměrný podíl buněk přeživších SKA byl v případě referenčního kmene Tohama I stanoven na hodnotu ~ 1,6 %, v případě původních vakcinačních kmenů ~ 7,1 % a v případě současných klinických izolátů ~ 25,3 %. Výsledky vč. statistického vyhodnocení dat byly pro přehlednost znázorněny graficky (Obrázek č. 22).



**Obrázek č. 22** Rezistence studovaných kmenů vůči baktericidním účinkům séra. Grafické znázornění odolnosti všech tří testovaných skupin (Tohama I, původní vakcinační kmeny – VS a současné klinické izoláty – CI) metodou SKA. Odolnost byla vynesena jako podíl kultivovatelných buněk vystavených séru a kultivovatelných buněk vystavených tepelně inaktivovanému séru v procentech.

Všechny studované kmeny byly testovány metodou SKA alespoň ve třech biologických opakováních; velikost skupin  $n(\text{Tohama I}) = 10$ ,  $n(\text{VS}) = 15$ ,  $n(\text{CI}) = 33$ . Vodorovná čára uvnitř boxu znázorňuje aritmetický průměr získaných hodnot. Směrodatné odchylky byly graficky znázorněny v 95% konfidenčním intervalu a odlehlé hodnoty byly vyznačeny graficky pomocí symbolů ● = Tohama I, ▲ = VS, ■ = CI. Výsledky nepárového t-testu při hladině statistické významnosti  $p < 0,05$  byly graficky znázorněny pomocí hvězdiček: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*  $p = 0,0002$ ; \*\*  $p = 0,0052$ .



## 6 Diskuze

Sekreční systém typu 3 (T3SS) je jedním z faktorů virulence často užívaným patogenními gramnegativními bakteriemi ke vstřikování efektorových proteinů přímo do cílových buněk napadeného hostitelského organismu. Jednou z takových je i bakterie *B. bronchiseptica*, u které byl prokázán cytotoxický efekt proteinu BopC (též BteA) sekretovaného do hostitelských (eukaryotických) buněk výhradně pomocí T3SS (Panina *et al.*, 2005). Přestože blízký příbuzný druh, bakterie *B. pertussis*, je schopen produkce totožného aparátu T3SS včetně produkce efektoru BopC, význam T3SS a patogenezi *B. pertussis* nebyl doposud dostatečně objasněn. Navíc byl T3SS bakterie *B. pertussis* až donedávna považován v podmínkách kultivace *in vitro* za neaktivní (Fennelly *et al.*, 2008).

Jedním z cílů této diplomové práce bylo objasnit, za jakých podmínek je T3SS v buňkách *B. pertussis* aktivní během *in vitro* kultivace. Předem byla stanovena hypotéza založená na dosavadních nepublikovaných zkušenostech kolegů z Laboratoře post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ, Praha), že zásadní význam pro aktivitu T3SS bakterie *B. pertussis* v podmínkách kultivace *in vitro* má beraní krev běžně používaná pro obohacení BG agaru, konkrétně pak její biologicky aktivní složky. Pro ověření této hypotézy bylo navrženo pracovní schéma podrobně popsané v kapitole 4.2.3. Principem tohoto experimentu bylo kultivovat kmen bakterie *B. pertussis* Tohama I (u kterého Gaillard *et al.* (2011) již dříve potvrdili aktivitu T3SS v podmínkách *in vitro* po předchozí infekci myšího modelu) v přítomnosti a nepřítomnosti beraní krve. Pro tento typ experimentu byl namísto běžně užívaného BG agaru použit CHA agar, který je na rozdíl od BG agaru možné použít pro kultivaci *B. pertussis* nezávisle na obohacení beraní krví. Pro zjištění významu obsahu beraní krve v agaru byl použit jak standardní CHA agar, tak CHA agar obohacený beraní krví (CHAB agar) a na rozdíl od experimentálního schématu, které popsali Gaillard *et al.* (2011), nebyly buňky pasážovány pouze v prostředí tekutého SS média (které beraní krev neobsahuje), ale byly pasážovány na obou zmíněných typech agaru. Z každé pasážované kultury byla následně připravena tekutá kultura v SS médiu pro ověření aktivity T3SS.

Výsledky dokumentované v kapitole 5.1 v první řadě potvrzují výsledky, které publikovali Gaillard *et al.* (2011), totiž že pasážováním buněk *B. pertussis* v podmínkách *in vitro* bez přítomnosti krve v živném médiu (ať už se jedná o SS médium, či CHA agar) dochází k postupné ztrátě aktivity T3SS. Experimentální schéma použité v této diplomové práci však umožnilo potvrdit hypotézu, že k opětovnému navození aktivity T3SS stačí buňky přeočkovat

na CHAB agar obohacený beraní krví. Současně bylo potvrzeno, že buňky *B. pertussis*, které byly třikrát následně pasážovány na CHAB agaru, ztrácejí aktivitu T3SS až po přenesení na CHA agar. Tyto změny v aktivitě T3SS byly pozorovány jak na úrovni sekretovaných proteinů T3SS (Bsp22, BopN a BopC), tak na úrovni exprese genů kódujících tyto proteiny. Regulace aktivity T3SS kontrolovaná kontaktem bakterie s krví obsaženou v živném médiu tedy probíhá na úrovni transkripce sledovaných genů. Na základě těchto výsledků však nelze vyloučit další mechanismy na úrovni post-transkripční regulace či regulace samotné sekrece proteinů. Jak totiž popsali Bíbová *et al.* (2015), pro sekreci pomocí T3SS je u bakterie *B. pertussis* nezbytný RNA chaperon Hfq, který hraje klíčovou roli v regulaci genové exprese na post-transkripční úrovni.

Po ověření základní hypotézy, totiž že krev obsažená v agaru je zodpovědná za aktivaci T3SS v buňkách *B. pertussis* kultivovaných v podmínkách *in vitro*, byl proveden následný pokus, který si dal za cíl ověřit, zda beraní krev inkubovaná při teplotě 56 °C bude mít stejný vliv na aktivitu T3SS, jako nezahřátá krev. Tepelným ošetřením krve totiž dojde k inaktivaci jejích biologicky aktivních termolabilních složek. Výsledky uvedené v této diplomové práci naznačují, že aktivita T3SS bakterie *B. pertussis* kultivované na CHAB agaru obohaceném tepelně inaktivovanou beraní krví byla na úrovni sekrece proteinů významně nižší než u vzorku kultivovaném na CHAB agaru, k jehož obohacení byla použita nezahřátá beraní krev. Tento rozdíl v aktivitě T3SS byl pozorován i na úrovni exprese genů *bsp22*, *bopN* a *bopC*, jejichž hodnoty byly v buňkách kultivovaných na standardním CHAB agaru přibližně dvojnásobně vyšší v porovnání s buňkami kultivovanými na CHAB agaru obohaceném tepelně inaktivovanou krví.

Jelikož doposud diskutované výsledky monitorují aktivitu T3SS pouze laboratorního kmene *B. pertussis* Tohama I, byl pro ověření relevance dosažených výsledků proveden experiment pozorující aktivitu klinického izolátu B1917, který je v současnosti některými vědeckými skupinami používán jako nový referenční kmen reprezentující současné klinické izoláty (Bart *et al.*, 2014). Pro jednoduchost bylo experimentální schéma zjednodušeno a buňky kultivované buď na CHA agaru, nebo na CHAB agaru byly pro kontrolu aktivity T3SS bez dalšího pasážování očkovány do SS média. Obohacení agaru krví však v případě klinického izolátu B1917 nevedlo ke změně aktivity T3SS ani na úrovni transkripce pozorovaných genů, ani na úrovni množství proteinů sekretovaných do SS média. Zůstává otázkou, zda by se změna v aktivitě T3SS projevila, pokud by bylo zachováno původní schéma experimentu zahrnující

pasážování buněk na obou typech agaru. Faktem však je, že v případě laboratorního kmene Tohama I lze i bez pasážování sledovat signifikantní pokles aktivity T3SS buněk kultivovaných na CHA agaru v porovnání s buňkami kultivovanými na CHAB agaru, což u kmene B1917 pozorováno nebylo. Zdá se tedy, že exprese a produkce komponent T3SS u současných klinických izolátů je v porovnání s kmenem Tohama I značně vyšší a nevyžaduje indukci krví.

Vliv krve či krevního séra na produkci faktorů virulence bakterie *B. pertussis* byl pozorován již dříve. Pishko *et al.* (2003) publikovali data dokazující zvýšenou odolnost buněk *B. pertussis* (Tohama I) vůči baktericidnímu působení krevního séra v podmínkách *in vitro*, pokud byly buňky kultivovány na standardním BG agaru obohaceném beraní krví. Přestože pozorovaný jev je v souladu s naší hypotézou a s výsledky této diplomové práce, popsání experiment nelze zopakovat, jelikož buňky *B. pertussis* není možné (alespoň v našich experimentálních podmínkách) kultivovat na BG agaru bez obohacení beraní krví. Bez ohledu na tuto zjevnou nesrovnalost se Pishko *et al.* (2003) domnívají, že zvýšení odolnosti buněk vůči krevnímu séru zapříčinily blíže nespecifikované složky krve. V této diplomové práci bylo prokázáno, že tepelná inaktivace krve použité pro přípravu BG agaru vede ke snížení exprese genů a aktivity T3SS. Na základě těchto souvislostí lze stanovit hypotézu, že kultivace buněk *B. pertussis* na BG agaru obohaceném pouze tepelně inaktivovanou krví povede v porovnání s buňkami kultivovanými na standardním BG agaru k obecnému snížení schopnosti virulence těchto buněk v důsledku nepřítomnosti biologicky aktivních složek krve, jako jsou např. proteiny komplementu, sérové protilátky, globuliny, CRP, transferin a řada dalších proteinů běžně přítomných v krvi. Tuto hypotézu podporuje i nedávno publikovaná práce, ve které Gestal *et al.* (2018) dokumentují reakci buněk klasických druhů *Bordetella* na inkubaci přímo v beraní krvi či v krevním séru. Navzdory použití odlišného experimentálního schématu, kdy byly studované buňky kultivovány na standardním BG agaru a následně byly inkubovány po dobu 60 min buď v SS médiu, beraní krvi či krevním séru, došli Gestal *et al.* (2018) ke shodnému výsledku, totiž že kontakt buněk *B. pertussis* s krevním sérem vede k zvýšení produkce některých faktorů virulence. Lze předpokládat, že použití standardního CHA agaru namísto BG agaru by vedlo k pozorování ještě výraznějšího rozdílu popsáných jevů, jelikož při zachování tohoto experimentálního schématu všechny pozorované buňky přicházejí do kontaktu s krví již při kultivaci na BG agaru. V tomto výzkumu byl navíc jako jediný zástupce druhu *B. pertussis* použit kmen BP536 odvozený od kmene Tohama I, popsání jev tedy nebyl pozorován u žádného současného klinického izolátu.

Gestal *et al.* (2018) navíc připouští, že inkubace buněk v krvi komplikuje další laboratorní práci s inkubovanými buňkami bakterií, jako je např. náročnější izolace celkové RNA či kontaminace vzorků sérovými proteiny, které byly analyzovány pomocí elektroforézy SDS-PAGE a pomocí imunoblotu. Faktem také je, že během infekce dýchacího ústrojí hostitele přijdou buňky *B. pertussis* do kontaktu s podstatně nižší koncentrací krevní plazmy, než použili Gestal *et al.* (2018). Koncentrace a složení krevní plazmy vylučované na povrch dýchacího epitelu je však otázkou, na kterou nelze s jistotou odpovědět – může se totiž lišit mezi jednotlivými jedinci a odvíjí se mimo jiné od současného imunologického a zdravotního stavu daného jedince. Odhadem by koncentrace krevního séra na povrchu dýchacího traktu mohla odpovídat asi 20% roztoku čisté krevní plazmy, což je pětina koncentrace použité v diskutovaném článku (Persson, 1991; Fernandez a Weiss, 1994). Dalším faktorem, který pravděpodobně zkresluje výsledky obdobných experimentů, je použití beraní krve pro kultivaci striktně lidského patogenu.

Na základě dat uvedených v této diplomové práci bude dále kontakt kmenů *B. pertussis* Tohama I a B1917 s krví studován na úrovni celého proteomu (LC-MS/MS) a transkriptomu (RNA-seq). K studiu kontaktu buněk *B. pertussis* s krví bude dále zachován princip kultivace na CHA agaru s možností obohacení buď krví, nebo pouze jejími deriváty, jako je krevní sérum, či tepelně inaktivované krevní sérum. V návaznosti na současné výsledky jiných výzkumných skupin byly také provedeny předběžné experimenty založené na kultivaci buněk *B. pertussis* v SS médiu s upraveným složením tak, aby věrohodněji připomínalo podmínky panující v respiračním traktu. Konkrétně jde o limitaci klíčovými živinami – glutamátem a ionty železa – které by měly vést k nabuzení aktivity T3SS (Brickman *et al.*, 2011; Hanawa *et al.*, 2016). Na tomto místě je však potřeba připomenout, že fakta týkající se druhu *B. bronchiseptica* nelze automaticky aplikovat i v případě *B. pertussis* a naopak – jako tomu je v případě posledně citovaných publikací, kde při zachování stejného experimentálního schématu byly výsledky získané na modelu *B. bronchiseptica* jen vzdáleně podobné těm pozorovaným u *B. pertussis*.

Další hypotézou testovanou v této diplomové práci byla souvislost genu *BB0302* bakterie *B. bronchiseptica* RB50 s aktivitou T3SS. Pro ověření této hypotézy byl připraven deleční kmen RB50 $\Delta$ 0302 a byla porovnána rychlost růstu v SS médiu, exprese vybraných genů T3SS (*bsp22*, *bopN*, *bopC* a *bscN*) a sekrece vybraných proteinů pomocí T3SS (*Bsp22*, *BopN* a *BopC*) v porovnání s divokým typem.

Porovnání generační doby a růstové rychlosti obou kmenů vede k předpokladu, že delece genu *BB0302* pravděpodobně nemá za daných experimentálních podmínek vliv na růstové schopnosti bakterie *B. bronchiseptica* RB50 v SS médiu. Zajímavostí je jen obtížně vysvětlitelný skokový nárůst OD, který nastal v případě všech měřených vzorků na přechodu z pozdní exponenciální fáze růstu do stacionární fáze (v čase ~ 26 hod od počátku kultivace), kdy OD během dvou až tří následných měření (tj. v horizontu ~ 1 hod) vzrostla asi o dvě desetiny. K vysvětlení tohoto jevu se nabízí možnost technické chyby v průběhu měření, k zmíněnému nárůstu OD však došlo u každého měřeného vzorku všech tří biologických opakování vždy v jiném časovém intervalu v průběhu asi dvou hodin. Během kultivace bakterie *B. bronchiseptica* v tekutém médiu při kultivaci do stacionární fáze růstu zpravidla vznikají shluky buněk spojované s tvorbou biofilmu, která je vůbec nejintenzivnější ve fázi Bvg<sup>i</sup>, neboli v přechodové fázi virulence mezi fázemi Bvg<sup>+</sup> a Bvg<sup>-</sup>. (Irie *et al.*, 2004). Nelze tedy vyloučit, že skokový nárůst OD byl zaznamenán v časovém intervalu tvorby biofilmu a přechodu buněk do stacionární fáze růstu.

Ani v expresi vybraných genů, ani v sekreci proteinů pomocí T3SS jsme nepozorovali signifikantní rozdíly mezi delečním a původním kmenem. Srovnání profilů sekretovaných proteinů obou kmenů rozdělených pomocí SDS-PAGE neodhalilo žádný protein, který by byl či nebyl v jednom z kmenů sekretován v odlišném množství. Odhalení funkce produktu genu *BB0302* by mohlo být docíleno srovnáním kompletních proteomů či transkriptomů divokého typu a kmene RB50Δ0302, nicméně získané výsledky naznačují, že v regulaci T3SS u *B. bronchiseptica* žádnou funkci nemá. Nelze také vyloučit, že produkt genu hraje roli pouze v podmínkách, které nelze kultivací *in vitro* navodit.

Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo zkonstruovat Δ*BP0209* kmen *B. pertussis*, rozhodli jsme se deletovat homologní gen *BB0302* v *B. bronchiseptica*. Přestože je gen 100% homologní genu *BP0209* bakterie *B. pertussis*, je možné, že u obou bakterií hraje rozdílnou roli. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné deleci genu *BP0209* provést v takovém kmeni *B. pertussis*, který v blízkosti genu *BP0209* nemá několik IS481 elementů, jako je tomu v případě kmene Tohama I. Kandidátem splňujícím tuto podmínku by mohl být kmen B1917, u kterého je homolog *BP0209* anotován pod názvem *B1917\_RS01125*.

Odolnost bakterie *B. pertussis* vůči baktericidnímu působení krevního séra je jednou z jejích vlastností, díky které je schopna infikovat a přežívat v hostitelském organismu. Od konce 20. století, kdy začal být tento jev pozorován, byla popsána řada molekul a molekulárně-biologických mechanismů, jež tomuto patogenu umožňují přežívat v přítomnosti komplementu (viz kapitola 3.3.3.3). V současnosti se výzkum zaměřuje i na evoluci a adaptaci *B. pertussis* na celoplošné intenzivní očkování proti černému kašli. Jednou z takových adaptací, která byla studována v této diplomové práci, je zvýšení odolnosti buněk *B. pertussis* vůči působení komplementu v podmínkách *in vitro*. K pozorování tohoto jevu byly použity dvě skupiny kmenů klinických izolátů *B. pertussis*. Jednu z těchto skupin reprezentovaly kmeny izolované na území bývalého Československa v letech 1954–1965, zatímco druhá skupina sestávala ze současných (2008–2015) českých klinických izolátů. Citlivost vůči séru těchto dvou skupin byla zároveň porovnána s citlivostí laboratorního kmene Tohama I izolovaného v roce 1954.

Z dat uvedených v této diplomové práci je patrné, že skupina současných klinických izolátů je přibližně čtyřikrát odolnější vůči séru než skupina původních vakcinačních kmenů. Tato data napovídají, že v průběhu asi 50 let od zahájení vakcinace proti černému kašli došlo u současných klinických izolátů ke zvýšení odolnosti vůči baktericidnímu působení krevního séra.

Dosavadní výzkum odolnosti *B. pertussis* vůči komplementu se zabýval spíše biomolekulami a molekulárními mechanismy, které s tímto jevem souvisejí. Jednou ze studií řešící obdobnou problematiku publikovali Elder a Harvill (2004). V této studii se sice přednostně zaměřili na porovnání významu proteinu BrkA v podmínkách *in vitro* a *in vivo* v myším modelu (viz kapitola 3.3.3.3), pro svůj výzkum však použili vedle laboratorních kmenů také dva současné klinické izoláty, které i v případě delece genu *brkA* vykazovaly obecně vyšší odolnost vůči baktericidnímu působení krevního séra než laboratorní kmeny.

Na tomto místě je potřeba si uvědomit, že v této diplomové práci byla studována pouze odolnost vůči baktericidním vlastnostem samotného komplementu čili tvorbě MAC. Těžko tedy ze získaných dat usuzovat, jakou odolnost vůči séru by vykazovaly použité kmeny v podmínkách *in vivo* v relevantním biologickém modelu, ve kterém je potřeba počítat např. i s opsonizací zajištěnou interakcí buněk bakterie se složkami komplementu a s následnou činností fagocytujících buněk imunitního systému. Zároveň je potřeba zmínit, že citlivost *B. pertussis* vůči komplementu je v podmínkách *in vitro* závislá na řadě faktorů: způsob kultivace, růstová fáze buněk, použitý kmen a jeho adaptace na laboratorní podmínky, či koncentrace a typ

použitého séra. Pozorování v podmínkách *in vitro* se proto mohou mezi výzkumnými skupinami významně lišit. Zároveň bylo popsáno, že aktivace komplementu je v případě *B. pertussis* v podmínkách *in vivo* na rozdíl od podmínek *in vitro* vedena klasickou cestou a je závislá především na přítomnosti specifických protilátek produkovaných hostitelským organismem, což je další faktor, který má vliv na porovnání stavu v podmínkách *in vitro* a *in vivo* (Barnes a Weiss, 2002; Pishko *et al.*, 2003).

V kontextu opsonizace a aktivace komplementu klasickou cestou za účasti specifických protilátek se Barnes a Weiss (2002) s odkazem na předchozí studie (Weiss *et al.*, 1999; Weingart *et al.*, 2000) dovolávají vývoje a používání vakcín, které v prevenci černého kašle navozují tvorbu protilátek a paměťových buněk imunitního systému specifických proti *B. pertussis*. U naivního nebo nedostatečně očkovaného člověka (především dítěte) totiž produkce specifických protilátek při prvním setkání s daným antigenem trvá několik dní. Buňky *B. pertussis* proto pravděpodobně mohou růst v počáteční fázi infekce exponenciální rychlostí a současně bez přítomnosti opsonizujících protilátek „riskovat“ baktericidní účinek komplementu aktivovaného pomocí (chybějících) protilátek.

Mezi diskutované odpovědi na tuto výzvu v současnosti patří úprava složení současné vakcíny DTaP, která by vedla ke kvalitnější a dlouhotrvající imunitní odpovědi vůči infekci *B. pertussis*. Jednou z teoretických možností je obohacení vakcíny typu DTaP o detoxifikovaný ACT. Bylo totiž prokázáno, že během infekce *B. pertussis* vznikají proti ACT specifické protilátky stejně tak jako po očkování pomocí DTwP. Tyto protilátky jsou schopné potlačit enzymatickou aktivitu ACT a zmírnit následky infekce *B. pertussis*. Navíc pronikají přes placentu a v těle novorozence vydrží i několik měsíců, kde slouží jako dočasná ochrana od narození do řádného očkování daného jedince. I přes tato fakta doposud není detoxifikovaný ACT součástí DTaP (Farfel *et al.*, 1990; Eby *et al.*, 2017). V této souvislosti je další možností pro zlepšení kvality prevence černého kašle zavedení očkování žen mezi 27. a 36. týdnem těhotenství. Další možností je pravidelné přeočkování dospělých osob vakcínou DTaP v intervalu tří let. Některé vědecké skupiny však považují zdokonalení vakcíny typu DTaP za nedosažitelné a věnují se buď úpravě vakcíny typu DTwP s cílem dosáhnout nižší reaktogenicity, nebo vývoji alternativního typu vakcín. Jednou z takových je vakcína BPZE1 založená na živém, ale oslabeném kmeni *B. pertussis* neschopném produkce PT, DNT a TCT. V rámci klinických studií bylo doposud prokázáno, že tato vakcína na rozdíl od vakcíny typu DTaP navozuje imunitní odpověď vedenou buněčným typem Th1 (nikoliv Th2), významně navozuje produkci

specifických protilátek a paměťových buněk a zabraňuje kolonizaci nosohltanu, čímž brání i přenosu infekce (Cherry, 2019; Lin *et al.*, 2020).

Současně se na základě uvedených dat tato diplomová práce připojuje k názoru diskutovaném v odborné literatuře, že referenční kmen Tohama I je dlouholetým pasážováním v laboratorních podmínkách příliš adaptovaný na kultivační podmínky *in vitro*. V této diplomové práci bylo totiž vedle výše diskutované rozdílné aktivity T3SS laboratorního kmene Tohama I a současného klinického izolátu B1917 zároveň zjištěno, že laboratorní kmen Tohama I je výrazně citlivější k baktericidním účinkům séra než současné klinické izoláty i než původní vakcinační kmeny, které byly izolovány přibližně ve stejném období jako Tohama I. Ať už jsou důvody k vysvětlení těchto pozorování jakékoliv (adaptace v souvislosti vakcinace, vývoj nových molekulárních mechanismů odolnosti vůči komplementu), další používání tohoto tradičního kmene pro budoucí výzkum původce černého kašle stojí za zvážení (Caro *et al.*, 2008; Kallonen *et al.*, 2011).



## 7 Souhrn

- Bylo prokázáno, že sekreční systém typu 3 (T3SS) laboratorního kmene *B. pertussis* Tohama I lze v podmínkách *in vitro* aktivovat pouhou kultivací na pevném médiu obohaceném beraní krví. Bylo prokázáno, že tento jev závisí na přítomnosti krve v agaru a že tepelná inaktivace termolabilních biologicky aktivních látek přítomných v krvi vede ke snížení exprese genů T3SS a snížení aktivity sekrece pomocí T3SS.
- Pomocí klonovacího vektoru pSS4245 byl úspěšně připraven kmen *B. bronchiseptica* RB50Δ0302. Bližší funkce produktu genu *BB0302* bakterie *B. bronchiseptica* však přiřazena nebyla. Delece tohoto genu nevedla ani ke změně růstové rychlosti v SS médiu, ani ke změně aktivity T3SS na úrovni genové exprese vybraných genů a sekrece proteinů Bsp22, BopN a BopC.
- Skupina současných českých klinických izolátů izolovaných v počátku 21. století je za daných experimentálních podmínek poměrně odolná vůči působení krevního séra a jeho přítomnost v živném médiu na ně má mírnější baktericidní účinek v porovnání se skupinou původních vakcinačních kmenů izolovaných na území bývalého Československa v 50. a 60. letech minulého století. Jedním z důvodů tohoto jevu může být adaptace současných klinických izolátů jako odpověď na vakcínu používanou v prevenci černého kašle.
- Laboratorní kmen Tohama I je v porovnání s oběma skupinami klinických izolátů použitých v této diplomové práci výrazně citlivější vůči působení krevního séra. Zároveň vliv krve na aktivitu T3SS pozorovaný u tohoto kmene nebyl pozorován u současného referenčního klinického izolátu, B1917. Tyto výsledky podporují v současné době velmi diskutovanou myšlenku nahradit referenční kmen Tohama I jiným referenčním kmenem z řad současných klinických izolátů (např. B1917) z důvodu nadměrného přizpůsobení kmene Tohama I na laboratorní podmínky.

## 8 Seznam použité literatury

Souhrnné publikace jsou označeny symbolem \*

Abe, A., Nishimura, R., Kuwae, A. (2017): Bordetella effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues. *Microbiol Immunol*.

Ahuja, U., Shokeen, B., Cheng, N., Cho, Y., Blum, C., Coppola, G., Miller, J. F. (2016): Differential regulation of type III secretion and virulence genes in *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* by a secreted anti-sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(9): 2341-2348.

Amdahl, H., Jarva, H., Haanpera, M., Mertsola, J., He, Q., Jokiranta, T. S., Meri, S. (2011): Interactions between *Bordetella pertussis* and the complement inhibitor factor H. *Mol Immunol* 48(4): 697-705.

Amman, F., D'Halluin, A., Antoine, R., Huot, L., Bibova, I., Keidel, K., Slupek, S., Bouquet, P., Coutte, L., Caboche, S., Loch, C., Vecerek, B., Hot, D. (2018): Primary transcriptome analysis reveals importance of IS elements for the shaping of the transcriptional landscape of *Bordetella pertussis*. *RNA Biol* 15(7): 967-975.

Barnes, M. G., Weiss, A. A. (2001): BrkA protein of *Bordetella pertussis* inhibits the classical pathway of complement after C1 deposition. *Infect Immun* 69(5): 3067-3072.

Barnes, M. G., Weiss, A. A. (2002): Growth phase influences complement resistance of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 70(1): 403-406.

Barnes, M. G., Weiss, A. A. (2003): Activation of the complement cascade by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* 220(2): 271-275.

Bart, M. J., Harris, S. R., Advani, A., Arakawa, Y., Bottero, D., Bouchez, V., Cassidy, P. K., Chiang, C. S., Dalby, T., Fry, N. K., Gaillard, M. E., van Gent, M., Guiso, N., Hallander, H. O., Harvill, E. T., He, Q., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., Hozbor, D. F., Kamachi, K., Karataev, G. I., Lan, R., Lutynska, A., Maharjan, R. P., Mertsola, J., Miyamura, T., Octavia, S., Preston, A., Quail, M. A., Sintchenko, V., Stefanelli, P., Tondella, M. L., Tsang, R. S., Xu, Y., Yao, S. M., Zhang, S., Parkhill, J., Mooi, F. R. (2014): Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination. *mBio* 5(2): e01074.

Bart, M. J., Zeddeman, A., van der Heide, H. G., Heuvelman, K., van Gent, M., Mooi, F. R. (2014): Complete Genome Sequences of *Bordetella pertussis* Isolates B1917 and B1920, Representing Two Predominant Global Lineages. *Genome Announc* 2(6).

Berends, E. T., Dekkers, J. F., Nijland, R., Kuipers, A., Soppe, J. A., van Strijp, J. A., Rooijackers, S. H. (2013): Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. *Cell Microbiol* 15(12): 1955-1968.

Berggard, K., Johnsson, E., Mooi, F. R., Lindahl, G. (1997): *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect Immun* 65(9): 3638-3643.

- Berggard, K., Lindahl, G., Dahlback, B., Blom, A. M. (2001): Bordetella pertussis binds to human C4b-binding protein (C4BP) at a site similar to that used by the natural ligand C4b. *Eur J Immunol* 31(9): 2771-2780.
- Bibova, I., Hot, D., Keidel, K., Amman, F., Slupek, S., Cerny, O., Gross, R., Vecerek, B. (2015): Transcriptional profiling of Bordetella pertussis reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biol* 12(2): 175-185.
- Bibova, I., Skopova, K., Masin, J., Cerny, O., Hot, D., Sebo, P., Vecerek, B. (2013): The RNA chaperone Hfq is required for virulence of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 81(11): 4081-4090.
- Bokhari, H., Bilal, I., Zafar, S. (2012): BapC autotransporter protein of Bordetella pertussis is an adhesion factor. *J Basic Microbiol* 52(4): 390-396.
- Booth, W. T., Davis, R. R., Deora, R., Hollis, T. (2019): Structural mechanism for regulation of DNA binding of BpsR, a Bordetella regulator of biofilm formation, by 6-hydroxynicotinic acid. *PLoS One* 14(11): e0223387.
- Boulanger, A., Chen, Q., Hinton, D. M., Stibitz, S. (2013): In vivo phosphorylation dynamics of the Bordetella pertussis virulence-controlling response regulator BvgA. *Mol Microbiol* 88(1): 156-172.
- Brickman, T. J., Cummings, C. A., Liew, S. Y., Relman, D. A., Armstrong, S. K. (2011): Transcriptional profiling of the iron starvation response in Bordetella pertussis provides new insights into siderophore utilization and virulence gene expression. *J Bacteriol* 193(18): 4798-4812.
- Brinig, M. M., Cummings, C. A., Sanden, G. N., Stefanelli, P., Lawrence, A., Relman, D. A. (2006): Significant gene order and expression differences in Bordetella pertussis despite limited gene content variation. *J Bacteriol* 188(7): 2375-2382.
- Burns, V. C., Pishko, E. J., Preston, A., Maskell, D. J., Harvill, E. T. (2003): Role of Bordetella O antigen in respiratory tract infection. *Infect Immun* 71(1): 86-94.
- Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Mays, R. M., Worthington, Z. E. (2003): Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by Bordetella pertussis. *Infect Immun* 71(11): 6358-6366.
- Caro, V., Bouchez, V., Guiso, N. (2008): Is the Sequenced Bordetella pertussis strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiol* 46(6): 2125-2128.
- Caroff, M., Brisson, J., Martin, A., Karibian, D. (2000): Structure of the Bordetella pertussis 1414 endotoxin. *FEBS Lett* 477(1-2): 8-14.
- Conover, M. S., Redfern, C. J., Ganguly, T., Sukumar, N., Sloan, G., Mishra, M., Deora, R. (2012): BpsR modulates Bordetella biofilm formation by negatively regulating the expression of the Bps polysaccharide. *J Bacteriol* 194(2): 233-242.
- Conover, M. S., Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., Deora, R. (2010): The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol Microbiol* 77(6): 1439-1455.

- Cotter, P. A., Miller, J. F. (1994): BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 62(8): 3381-3390.
- Coutte, L., Huot, L., Antoine, R., Slupek, S., Merkel, T. J., Chen, Q., Stibitz, S., Hot, D., Locht, C. (2016): The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Sci Rep* 6: 32774.
- Cummings, C. A., Brinig, M. M., Lepp, P. W., van de Pas, S., Relman, D. A. (2004): *Bordetella* species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation. *J Bacteriol* 186(5): 1484-1492.
- Dienstbier, A., Amman, F., Stipl, D., Petrackova, D., Vecerek, B. (2019): Comparative Integrated Omics Analysis of the *Hfq* Regulon in *Bordetella pertussis*. *Int J Mol Sci* 20(12).
- Dyballa, N., Metzger, S. (2009): Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*(30).
- Eby, J. C., Gray, M. C., Warfel, J. M., Merkel, T. J., Hewlett, E. L. (2017): Use of a Toxin Neutralization Assay To Characterize the Serologic Response to Adenylate Cyclase Toxin after Infection with *Bordetella pertussis*. *Clin Vaccine Immunol* 24(1).
- Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Gordon, V. M., Gray, L. S., Hewlett, E. L. (1991): Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett* 278(1): 79-83.
- el Baya, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robenek, H., Schmidt, M. A. (1997): Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol* 73(1): 40-48.
- Elder, K. D., Harvill, E. T. (2004): Strain-dependent role of *BrkA* during *Bordetella pertussis* infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun* 72(10): 5919-5924.
- Fabianova, K., Zavadilova, J., Gasperek, M. (2019): Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2018 – epidemiologická situace. *CEM SZÚ* 28(7): 268-276.
- Farfel, Z., Konen, S., Wiertz, E., Klapmuts, R., Addy, P. A., Hanski, E. (1990): Antibodies to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase are produced in man during pertussis infection and after vaccination. *J Med Microbiol* 32(3): 173-177.
- Fauconnier, A., Veithen, A., Gueirard, P., Antoine, R., Wacheul, L., Locht, C., Bollen, A., Godfroid, E. (2001): Characterization of the type III secretion locus of *Bordetella pertussis*. *Int J Med Microbiol* 290(8): 693-705.
- Fennelly, N. K., Sisti, F., Higgins, S. C., Ross, P. J., van der Heide, H., Mooi, F. R., Boyd, A., Mills, K. H. (2008): *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune responses. *Infect Immun* 76(3): 1257-1266.
- Fernandez, R. C., Weiss, A. A. (1994): Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* 62(11): 4727-4738.
- Fernandez, R. C., Weiss, A. A. (1998): Serum resistance in *bvg*-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol Lett* 163(1): 57-63.

- Finn, T. M., Amsbaugh, D. F. (1998): Vag8, a *Bordetella pertussis* bvg-regulated protein. *Infect Immun* 66(8): 3985-3989.
- Fujita, T., Inoue, T., Ogawa, K., Iida, K., Tamura, N. (1987): The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. *J Exp Med* 166(5): 1221-1228.
- Gaillard, M. E., Bottero, D., Castuma, C. E., Basile, L. A., Hozbor, D. (2011): Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality. *Infect Immun* 79(9): 3677-3682.
- Ganguly, T., Johnson, J. B., Kock, N. D., Parks, G. D., Deora, R. (2014): The *Bordetella pertussis* Bps polysaccharide enhances lung colonization by conferring protection from complement-mediated killing. *Cell Microbiol* 16(7): 1105-1118.
- Gestal, M. C., Rivera, I., Howard, L. K., Dewan, K. K., Soumana, I. H., Dedloff, M., Nicholson, T. L., Linz, B., Harvill, E. T. (2018): Blood or Serum Exposure Induce Global Transcriptional Changes, Altered Antigenic Profile, and Increased Cytotoxicity by Classical *Bordetellae*. *Front Microbiol* 9: 1969.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A. (1988): Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 7(12): 3997-4004.
- Gophna, U., Ron, E. Z., Graur, D. (2003): Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* 312: 151-163.
- \*Green, E. R., Meccas, J. (2016): Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr* 4(1).
- Guragain, M., Jennings-Gee, J., Cattelan, N., Finger, M., Conover, M. S., Hollis, T., Deora, R. (2018): The Transcriptional Regulator BpsR Controls the Growth of *Bordetella bronchiseptica* by Repressing Genes Involved in Nicotinic Acid Degradation. *J Bacteriol* 200(12).
- Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E. T. (2017): Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front Microbiol* 8: 28.
- Hanawa, T., Kamachi, K., Yonezawa, H., Fukutomi, T., Kawakami, H., Kamiya, S. (2016): Glutamate Limitation, BvgAS Activation, and (p)ppGpp Regulate the Expression of the *Bordetella pertussis* Type 3 Secretion System. *J Bacteriol* 198(2): 343-351.
- Harvill, E. T., Preston, A., Cotter, P. A., Allen, A. G., Maskell, D. J., Miller, J. F. (2000): Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* 68(12): 6720-6728.
- Hasan, S., Kulkarni, N. N., Asbjarnarson, A., Linhartova, I., Osicka, R., Sebo, P., Gudmundsson, G. H. (2018): *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. *Infect Immun* 86(3).

Heesterbeek, D. A., Bardoel, B. W., Parsons, E. S., Bennett, I., Ruyken, M., Doorduyn, D. J., Gorham, R. D., Jr., Berends, E. T., Pyne, A. L., Hoogenboom, B. W., Rooijackers, S. H. (2019): Bacterial killing by complement requires membrane attack complex formation via surface-bound C5 convertases. *EMBO J* 38(4).

Hoffman, C. L., Gonyar, L. A., Zacca, F., Sisti, F., Fernandez, J., Wong, T., Damron, F. H., Hewlett, E. L. (2019): *Bordetella pertussis* Can Be Motile and Express Flagellum-Like Structures. *MBio* 10(3).

Hovingh, E. S., van den Broek, B., Kuipers, B., Pinelli, E., Rooijackers, S. H. M., Jongerius, I. (2017): Acquisition of C1 inhibitor by *Bordetella pertussis* virulence associated gene 8 results in C2 and C4 consumption away from the bacterial surface. *PLoS Pathog* 13(7): e1006531.

Chen, Q., Ng, V., Warfel, J. M., Merkel, T. J., Stibitz, S. (2017): Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK. *J Bacteriol* 199(22).

\*Chen, Q., Stibitz, S. (2019): The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Curr Opin Microbiol* 47: 74-81.

\*Cherry, J. D. (2015): The History of Pertussis (Whooping Cough); 1906–2015: Facts, Myths, and Misconceptions. *Current Epidemiology Reports* 2(2): 120 - 130.

\*Cherry, J. D. (2019): The 112-Year Odyssey of Pertussis and Pertussis Vaccines-Mistakes Made and Implications for the Future. *J Pediatric Infect Dis Soc* 8(4): 334-341.

Inatsuka, C. S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J. F., Cotter, P. A. (2010): Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* 78(7): 2901-2909.

Irie, Y., Mattoo, S., Yuk, M. H. (2004): The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol* 186(17): 5692-5698.

Iwaki, M., Ullmann, A., Sebo, P. (1995): Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* 17(6): 1015-1024.

Kallonen, T., Grondahl-Yli-Hannuksela, K., Elomaa, A., Lutynska, A., Fry, N. K., Mertsola, J., He, Q. (2011): Differences in the genomic content of *Bordetella pertussis* isolates before and after introduction of pertussis vaccines in four European countries. *Infect Genet Evol* 11(8): 2034-2042.

Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., Benada, O., Just, I., Sebo, P. (2008): Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol* 181(8): 5587-5597.

Kasuga, T., Nakase, Y., Ukishima, K., Takatsu, K. (1954): Studies on *Haemophilus pertussis*. V. Relation between the phase of bacilli and the progress of the whooping-cough. *Kitasato Arch Exp Med* 27(3): 57-62.

Kerr, J. R., Rigg, G. P., Matthews, R. C., Burnie, J. P. (1999): The Bpel locus encodes type III secretion machinery in *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 27(6): 349-367.

Kotob, S. I., Hausman, S. Z., Burns, D. L. (1995): Localization of the promoter for the *ptl* genes of *Bordetella pertussis*, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infect Immun* 63(8): 3227-3230.

Kurushima, J., Kuwae, A., Abe, A. (2012): The type III secreted protein BspR regulates the virulence genes in *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* 7(6): e38925.

Kuwae, A., Momose, F., Nagamatsu, K., Suyama, Y., Abe, A. (2016): BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. *PLoS One* 11(2): e0148387.

Lin, A., Apostolovic, D., Jahnmatz, M., Liang, F., Ols, S., Tecleab, T., Wu, C., van Hage, M., Solovay, K., Rubin, K., Loch, C., Thorstensson, R., Thalen, M., Lore, K. (2020): Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *J Clin Invest* 130(5): 2332-2346.

\*Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt I. (2006): *Immunology*. 7. vydání, Philadelphia, Elsevier.

Manzano-Marin, A., Latorre, A. (2016): Snapshots of a shrinking partner: Genome reduction in *Serratia symbiotica*. *Sci Rep* 6: 32590.

Marr, N., Shah, N. R., Lee, R., Kim, E. J., Fernandez, R. C. (2011): *Bordetella pertussis* autotransporter Vag8 binds human C1 esterase inhibitor and confers serum resistance. *PLoS One* 6(6): e20585.

\*Mathern, D. R., Heeger, P. S. (2015): *Molecules Great and Small: The Complement System*. *Clin J Am Soc Nephrol* 10(9): 1636-1650.

\*Mattoo, S., Cherry, J. D. (2005): Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* 18(2): 326-382.

Medhekar, B., Shrivastava, R., Mattoo, S., Gingery, M., Miller, J. F. (2009): *Bordetella* Bsp22 forms a filamentous type III secretion system tip complex and is immunoprotective in vitro and in vivo. *Mol Microbiol* 71(2): 492-504.

Medof, M. E., Kinoshita, T., Nussenzweig, V. (1984): Inhibition of complement activation on the surface of cells after incorporation of decay-accelerating factor (DAF) into their membranes. *J Exp Med* 160(5): 1558-1578.

Melton, A. R., Weiss, A. A. (1989): Environmental regulation of expression of virulence determinants in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 171(11): 6206-6212.

Melton, A. R., Weiss, A. A. (1993): Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 61(3): 807-815.

Meri, T., Amdahl, H., Lehtinen, M. J., Hyvarinen, S., McDowell, J. V., Bhattacharjee, A., Meri, S., Marconi, R., Goldman, A., Jokiranta, T. S. (2013): Microbes bind complement inhibitor factor H via a common site. *PLoS Pathog* 9(4): e1003308.

- Merkel, T. J., Barros, C., Stibitz, S. (1998): Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 180(7): 1682-1690.
- Mooi, F. R., van Loo, I. H., van Gent, M., He, Q., Bart, M. J., Heuvelman, K. J., de Greeff, S. C., Diavatopoulos, D., Teunis, P., Nagelkerke, N., Mertsola, J. (2009): *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis* 15(8): 1206-1213.
- \*Murphy K. M., Travers P., Walport M. (2008): *Janeway's Immunobiology*. 7. vydání, Abingdon, Garland Science.
- Nagamatsu, K., Kuwae, A., Konaka, T., Nagai, S., Yoshida, S., Eguchi, M., Watanabe, M., Mimuro, H., Koyasu, S., Abe, A. (2009): *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med* 206(13): 3073-3088.
- Nakamura, K., Shinoda, N., Hiramatsu, Y., Ohnishi, S., Kamitani, S., Ogura, Y., Hayashi, T., Horiguchi, Y. (2019): BspR/BtrA, an Anti-sigma Factor, Regulates the Ability of *Bordetella bronchiseptica* To Cause Cough in Rats. *mSphere* 4(2).
- Neo, Y., Li, R., Howe, J., Hoo, R., Pant, A., Ho, S., Alonso, S. (2010): Evidence for an intact polysaccharide capsule in *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect* 12(3): 238-245.
- Nogawa, H., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Abe, A. (2004): The type III secreted protein BopD in *Bordetella bronchiseptica* is complexed with BopB for pore formation on the host plasma membrane. *J Bacteriol* 186(12): 3806-3813.
- Noofeli, M., Bokhari, H., Blackburn, P., Roberts, M., Coote, J. G., Parton, R. (2011): BapC autotransporter protein is a virulence determinant of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 51(3): 169-177.
- Oliver, D. C., Huang, G., Fernandez, R. C. (2003): Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol* 185(2): 489-495.
- Paccani, S. R., Dal Molin, F., Benagiano, M., Ladant, D., D'Elia, M. M., Montecucco, C., Baldari, C. T. (2008): Suppression of T-lymphocyte activation and chemotaxis by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 76(7): 2822-2832.
- Panina, E. M., Mattoo, S., Griffith, N., Kozak, N. A., Yuk, M. H., Miller, J. F. (2005): A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. *Mol Microbiol* 58(1): 267-279.
- Parker, C. W., Morse, S. I. (1973): The effect of *Bordetella pertussis* on lymphocyte cyclic AMP metabolism. *J Exp Med* 137(4): 1078-1090.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., Holden, M. T., Churcher, C. M., Bentley, S. D., Mungall, K. L., Cerdeno-Tarraga, A. M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M. A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B. G., Maskell, D. J. (2003): Comparative analysis of the genome



sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* 35(1): 32-40.

Pawloski, L. C., Queenan, A. M., Cassiday, P. K., Lynch, A. S., Harrison, M. J., Shang, W., Williams, M. M., Bowden, K. E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., Messonnier, N., Tondella, M. L. (2014): Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol* 21(2): 119-125.

\*Persson, C. G. (1991): Plasma exudation in the airways: mechanisms and function. *Eur Respir J* 4(10): 1268-1274.

Pishko, E. J., Betting, D. J., Hutter, C. S., Harvill, E. T. (2003): *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing in vivo. *Infect Immun* 71(9): 4936-4942.

Pittman, M. (1984): The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis* 3(5): 467-486.

\*Portaliou, A. G., Tsohis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V., Economou, A. (2016): Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41(2): 175-189.

Powell, H. M., Culbertson, C. G., Ensminger, P. W. (1951): Charcoal agar culture medium for preparing *Hemophilus pertussis* vaccine. *Public Health Rep* 66(11): 346-348.

Preston, A., Allen, A. G., Cadisch, J., Thomas, R., Stevens, K., Churcher, C. M., Badcock, K. L., Parkhill, J., Barrell, B., Maskell, D. J. (1999): Genetic basis for lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *bordetellae*. *Infect Immun* 67(8): 3763-3767.

Raeven, R. H., van der Maas, L., Tilstra, W., Uittenbogaard, J. P., Bindels, T. H., Kuipers, B., van der Ark, A., Pennings, J. L., van Riet, E., Jiskoot, W., Kersten, G. F., Metz, B. (2015): Immunoproteomic Profiling of *Bordetella pertussis* Outer Membrane Vesicle Vaccine Reveals Broad and Balanced Humoral Immunogenicity. *J Proteome Res* 14(7): 2929-2942.

Riaz, M. R., Siddiqi, A. R., Bokhari, H. (2015): Structural and functional studies of BapC protein of *Bordetella pertussis*. *Microbiol Res* 174: 56-61.

\*Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., Lambris, J. D. (2010): Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11(9): 785-797.

Sato, Y., Arai, H., Suzuki, K. (1974): Leukocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. 3. Its identity with protective antigen. *Infect Immun* 9(5): 801-810.

Sato, Y., Kimura, M., Fukumi, H. (1984): Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* 1(8369): 122-126.

Seydlova, G., Beranova, J., Bibova, I., Dienstbier, A., Drzmisek, J., Masin, J., Fiser, R., Konopasek, I., Vecerek, B. (2017): The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J Biol Chem* 292(19): 8048-8058.

Shannon, J. L., Fernandez, R. C. (1999): The C-terminal domain of the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* 181(18): 5838-5842.

- Siciliano, N. A., Skinner, J. A., Yuk, M. H. (2006): *Bordetella bronchiseptica* modulates macrophage phenotype leading to the inhibition of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and the initiation of a Th17 immune response. *J Immunol* 177(10): 7131-7138.
- Skinner, J. A., Pilione, M. R., Shen, H., Harvill, E. T., Yuk, M. H. (2005): *Bordetella* type III secretion modulates dendritic cell migration resulting in immunosuppression and bacterial persistence. *J Immunol* 175(7): 4647-4652.
- Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., Mishra, M., Deora, R. (2007): The *Bordetella* Bps polysaccharide is critical for biofilm development in the mouse respiratory tract. *J Bacteriol* 189(22): 8270-8276.
- Stainer, D. W., Scholte, M. J. (1970): A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 63(2): 211-220.
- Stenson, T. H., Allen, A. G., Al-Meer, J. A., Maskell, D., Pepler, M. S. (2005): *Bordetella pertussis* *risA*, but not *risS*, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun* 73(9): 5995-6004.
- Stockbauer, K. E., Foreman-Wykert, A. K., Miller, J. F. (2003): *Bordetella* type III secretion induces caspase 1-independent necrosis. *Cell Microbiol* 5(2): 123-132.
- \*Thiriard, A., Raze, D., Loch, C. (2018): Diversion of complement-mediated killing by *Bordetella*. *Microbes Infect* 20(9-10): 512-520.
- Tsuge, S., Nakayama, T., Terashima, S., Ochiai, H., Furutani, A., Oku, T., Tsuno, K., Kubo, Y., Kaku, H. (2006): Gene involved in transcriptional activation of the *hrp* regulatory gene *hrpG* in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* 188(11): 4158-4162.
- van der Zee, A., Mooi, F., Van Embden, J., Musser, J. (1997): Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J Bacteriol* 179(21): 6609-6617.
- Villarino Romero, R., Bibova, I., Cerny, O., Vecerek, B., Wald, T., Benada, O., Zavadilova, J., Osicka, R., Sebo, P. (2013): The *Bordetella pertussis* type III secretion system tip complex protein Bsp22 is not a protective antigen and fails to elicit serum antibody responses during infection of humans and mice. *Infect Immun* 81(8): 2761-2767.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., Sebo, P. (2009): Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *FASEB J* 23(9): 2831-2843.
- Weigand, M. R., Peng, Y., Loparev, V., Batra, D., Bowden, K. E., Burroughs, M., Cassidy, P. K., Davis, J. K., Johnson, T., Juieng, P., Knipe, K., Mathis, M. H., Pruitt, A. M., Rowe, L., Sheth, M., Tondella, M. L., Williams, M. M. (2017): The History of *Bordetella pertussis* Genome Evolution Includes Structural Rearrangement. *J Bacteriol* 199(8).
- Weingart, C. L., Keitel, W. A., Edwards, K. M., Weiss, A. A. (2000): Characterization of bactericidal immune responses following vaccination with acellular pertussis vaccines in adults. *Infect Immun* 68(12): 7175-7179.

Weiss, A. A., Mobberley, P. S., Fernandez, R. C., Mink, C. M. (1999): Characterization of human bactericidal antibodies to *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 67(3): 1424-1431.

Yuk, M. H., Harvill, E. T., Miller, J. F. (1998): The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*. *Mol Microbiol* 28(5): 945-959.

Zeddeman, A., van Gent, M., Heuvelman, C. J., van der Heide, H. G., Bart, M. J., Advani, A., Hallander, H. O., Wirsing von Konig, C. H., Riffelman, M., Storsaeter, J., Vestrheim, D. F., Dalby, T., Krogh, K. A., Fry, N. K., Barkoff, A. M., Mertsola, J., He, Q., Mooi, F. (2014): Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries, 1996 to 2012. *Euro Surveill* 19(33).