

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:
Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:
Molekulární biologie a biochemie organismů



Jakub Držmíšek

Faktory virulence Bordetella pertussis
Virulence factors of Bordetella pertussis

Bakalářská práce

Školitel:
RNDr., Branislav Večerek, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 27. 8. 2012

Podpis

Abstrakt

Bordetella pertussis je Gram negativní, aerobní, nesporeující kokobacil. Přestože se jedná o výhradně lidský patogen, v laboratorních podmínkách infikuje i jiné savce. Přenos mezi hostiteli je zprostředkován kapénkovou infekcí, ke které dochází buď přímo z hostitele na hostitele nebo sekundárně z kontaminovaného prostředí. *Bordetella* se usazuje v horních dýchacích cestách, odkud posléze sestupuje do plic a působí onemocnění známé jako dávivý kašel, černý kašel nebo pertuse, které má ročně na svědomí přibližně 195 000 úmrtí z 16 mil. incidencí (dle zprávy WHO z roku 2010). Na základě objevu pertuzového toxinu byl černý kašel původně označován jako toxinem zprostředkované onemocnění. Postupem času byla odhalena řada dalších faktorů virulence, které lze rozdělit na adheziny, toxiny a ostatní faktory. Mezi adheziny patří filamentózní hemagglutinin, pertaktin a fimbrie, toxiny zastupuje pertuzový toxin, adenylát cyklázový toxin, tracheální cytotoxin, dermonekrotický toxin a lipopolysacharid. Většina faktorů je regulována dvoukomponentním systémem Bvg. K úspěšnému infikování hostitele je však potřeba řady dalších faktorů, jako jsou např. autotransportéry či tzv. siderophory, sloužící k získávání železa z okolního prostředí. Sekrece faktorů virulence probíhá pomocí vlastních transportních cest (autotransportéry) nebo pomocí specializovaných bakteriálních sekrečních systémů. Například sekreční systém typu 1 sekretuje adenylát cyklázu, typ 4 sekretuje pertuzový toxin a typ 3 sekretuje efekторы jako je BopC. V této práci jsou popsány zejména výše zmíněné virulenční faktory regulované BvgAS, faktory nezávislé na BvgAS (lipopolysacharid, tracheální cytotoxin, sekreční systém typu 3) a samozřejmě také regulace exprese Bvg systémem, který hraje důležitou roli ve virulenci *Bordetella pertussis*.

Klíčová slova: faktory virulence, černý kašel, pertuzový toxin, adenylát cykláza, Bvg, T3SS

Abstract

Bordetella pertussis is a Gram-negative, aerobic, non-spore-forming coccobacillus. Although it's strictly human pathogen, it's possible to infect other mammals at laboratory conditions. Transmission among hosts is mediated via respiratory tract droplets. Infection could be direct, host to host, alternatively by contaminated environment. *Bordetella* colonizes upper respiratory tract, wherefrom descends into lungs and causes disease known as whooping cough or pertussis leading to 195 000 deaths of 16 mil. incidences per year (according to WHO report from 2010). More than twenty years before, respectively to found pertussis toxin, that time intensively under examination, pertussis was marked as toxin-mediated disease. In the course of time, more other virulence factors were revealed, that could be divided into groups of adhesins, toxins and others. Adhesins are filamentous haemagglutinin, pertactin and fimbriae. Toxins include pertussis toxin, adenylate cyclase, tracheal cytotoxin, dermonecrotic toxin and lipopolysaccharide. Most of virulence factors are regulated by two component system Bvg. However, it is needed lots of other factors for successful infection as for example autotransporters or so called siderophores serving as iron acquisition from environment. Secretion of virulence factors is mediated by its own transport pathways (autotransporters) or by specialised bacterial secretion systems. For example, type 1 secretion system secretes adenylate cyclase, type 4 secretes pertussis toxin and type 3 secretes effectors as BopC. At this work, there are particularly characterized virulence factors mentioned above, regulated by BvgAS, factors independent of BvgAS (lipopolysaccharide, tracheal cytotoxin, type 3 secretion system) and of course, expression regulation by Bvg system, that plays an important role in *Bordetella pertussis* virulence.

Key words: virulence factors, whooping cough, pertussis toxin, adenylate cyclase, Bvg, T3SS

Úvod

Rod *Bordetella*

Rod *Bordetella* z čeledi *Alcaligenaceae* zahrnuje celkem devět známých druhů, z nichž šest je schopno infikovat dýchací cesty hostitele (1). Co se týče ostatních tří druhů, *B. trematum* byla doposud izolována z různých poranění a ušních infekcí (2), *B. ansorpii* z epidermálních cyst (1) a *B. petrii* v oblastech degenerativních onemocnění kostí (3).

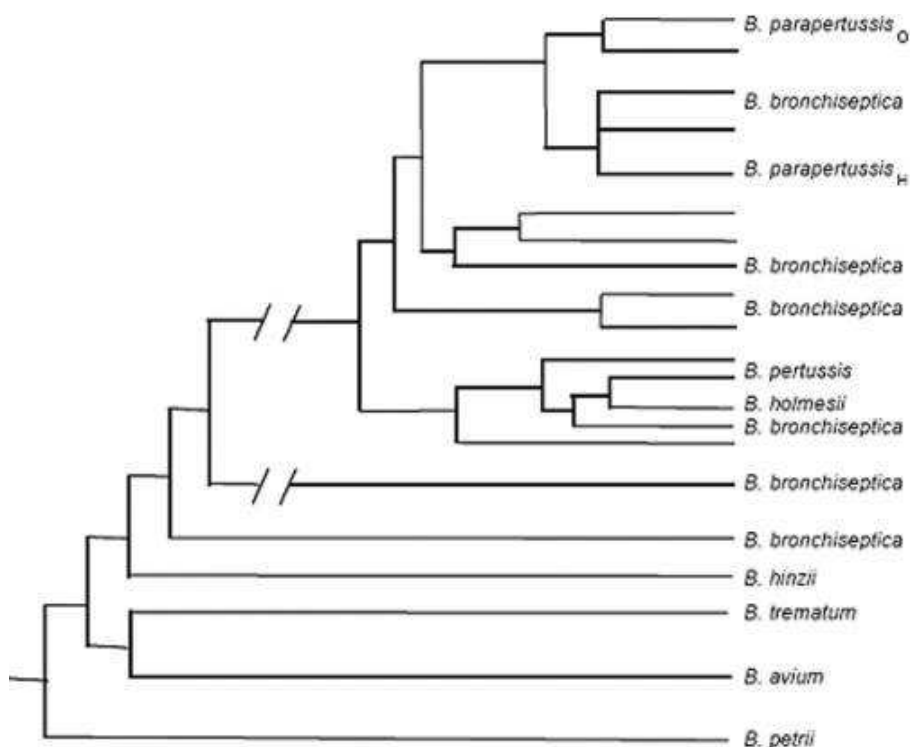
Zatímco *B. pertussis* způsobuje akutní onemocnění respiračního traktu, které nejvíce ohrožuje děti krátce po narození, blízce příbuzná *B. parapertussis* působí pertusi podobné onemocnění s lehčím průběhem. *B. holmesii* je rovněž patogenem člověka a krom septikémií se zdá být také původcem onemocnění respiračního traktu (4). Převážně zvířecí patogen *B. bronchiseptica* může infikovat i člověka a způsobit následnou pneumonii. *B. avium* a *hinzii* jsou nejčastěji spojovány s onemocněním ptáků, avšak jejich přítomnost nutně onemocnění nepůsobí (5), *B. hinzii* byla také izolována z lidí postiženými různým onemocněním (1). Ačkoliv jsou známé izoláty těchto nověji objevených druhů, které jsou fylogeneticky vzdálené od *B. bronchiseptica* a příbuzných druhů, mechanismy kolonizace a virulence zatím nebyly popsány.

Tyto druhy rodu *Bordetella* můžeme rozdělit do dvou skupin, z nichž první zahrnuje *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*. Zástupci této skupiny jsou schopni kolonizovat dýchací cesty savců. Na základě fylogenetických analýz byly tyto druhy klasifikovány spíše jako poddruhy díky vysokému stupni homologie (6). Jejich podobnost spočívá například v regulačním systému Bvg a v produkovaných faktorech virulence podléjících se na infekci. Naopak se liší svou specifitou vůči hostiteli, intenzitou průběhu a schopností vyvolat trvalé onemocnění a pravděpodobně i způsobem přenosu. Zatím nebylo dokázáno, že by tyto výrazné fenotypové odlišnosti měly původ v přítomnosti či nepřítomnosti ostrovů patogenicity, fágové DNA, transpozicičních elementů či plazmidů. Nicméně bylo objeveno, že některé Bvg regulované oblasti jsou rozdílně exprimovány (7). Příkladem mohou být geny a operony kódující sekreční systém typu 3 (8), motilitu (9) a

pertuzový toxin (10,11). Tyto rozdíly v expresi pak mohou přispívat k fenotypovým odlišnostem.

Druhá skupina obsahuje fylogeneticky vzdálenější poddruhy *B. avium*, *B. hinzii*, *B. holmesii* a *B. trematum* a nověji izolované *B. ansorpii* a *B. petrii*. Již zmíněná *B. avium* infikuje epitel dýchacích cest kura domácího a působí zánět horních cest dýchacích u kuřat i krocaních mláďat (12). *B. hinzii* byla izolována z pacienta postiženým AIDS, z hlenu pacienta s cystickou fibrózou i z dýchacích cest zdravých kuřat a krocanů (13, 14). *B. hinzii* a *B. avium* si jsou fenotypově podobné a mohou se vyskytovat ve stejném prostředí, infekce člověka je v obou případech spíše spojena s oslabenou imunitou. *B. holmesii* byla izolována z krve pacientů trpících septikémií či zánětem endokardu a z hlenu pacienta s vážnou respirační úzkostí (15). *B. petrii* byla krom již zmíněných degenerativních onemocnění kostí izolována i z prostředí, z dechlorujícího bioreaktoru, zde byla zaznamenána její schopnost anaerobního růstu za redukce selenátu na elementární selen (16).

Fylogenetické studie



Obr. č. 1. Fylogenetický strom devíti známých druhů rodu *Bordetella*. Převzato z (17).

Fylogenetické vztahy byly zkoumány metodou MME (multilocus enzyme electrophoresis), analýzou polymorfismu IS elementů, sekvenční analýzou zahrnující porovnání 16S rDNA sekvence a genomovou analýzou pomocí DNA microarray (18, 19, 20). Tyto studie poukazují na blízkou příbuznost všech známých druhů rodu *Bordetella* a pravděpodobného předka patogenních druhů. *B. bronchiseptica* se zdá být evolučním předkem již zmíněné první skupiny, z nichž *B. pertussis* a *B. parapertussis*_{hu} (na člověka adaptovaný druh) jsou považovány za dvě rozdílné linie adaptované na stejného hostitele, tyto kmeny společně s *B. bronchiseptica* jsou souhrnně označovány jako „*B. bronchiseptica* cluster“. Do tohoto klastru by se na základě 16S rDNA analýzy dala zařadit i *B. holmesii*, analýza IS elementů, konkrétně IS481 a IS 1001 rovněž potvrzuje tuto hypotézu, nicméně *B. holmesii* se liší v produkci faktorů virulence (21, 22).

V roce 2003 byla publikována studie vědeckého týmu ze Sanger Institute, který ve spolupráci s dalšími instituty provedl sekvenaci a genomovou analýzu kmenů *B. pertussis* Tohama I, *B. parapertussis*_{hu} 12822 a *B. bronchiseptica* RB50 (20). Již samotná velikost genomů (4,09 Mb Tohama I, 4,77 Mb 12822 a 5,34 Mb RB50) podporuje předpoklad nedávného diferencování a samostatného vývoje zmíněných, na člověka adaptovaných druhů z *B. bronchiseptica*. V porovnání s genomem *B. bronchiseptica* došlo v genomech na člověka adaptovaných druhů ke ztrátám rozsáhlých oblastí DNA zahrnující např. sekvence profágů (20), geny kódující komponenty zodpovědné za membránový transport a syntézu povrchových struktur (17). Změny v genomu v průběhu adaptace byly zaznamenány i na úrovni zvýšeného počtu pseudogenů, tyto geny byly inaktivovány vložением inzerční sekvence a bodovými či posunovými mutacemi. Takto vzniklé mutace však postihly jen velmi málo genů majících vztah k virulenci mikroorganismu (17), což potvrzuje selektivní adaptaci patogena na specifického hostitele, během které dochází k redukci nepotřebných genů a naopak ke konzervaci genů esenciálních pro infekci a přežití v hostiteli.

Rozdíly mezi danými druhy, jako je ztráta produkce či rozdílnost produkce v rámci patogenicity se účastnících proteinů, se týkají, jak již bylo zmíněno, například PTX (pertussis toxin), T3SS (type 3 secretion system) a motility. Například předek *B. bronchiseptica* klastru exprimuje jak pertuzový toxin aktivovaný Bvg systémem, tak pohybový aparát reprimovaný Bvg, zatímco potomci *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* PT neexprimují (10). Členění fylogenetického stromu zde nabízí možnost, že ke ztrátě exprese došlo dvakrát nezávisle na sobě, v případě pohybového aparátu, který exprimuje výhradně *B. bronchiseptica* (23),

dokonce třikrát, pravděpodobně v závislosti na vývoji adaptace ke specifickému hostiteli u *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu} a *B. parapertussis*_{ov} (kmen adaptovaný na ovce). T3SS je v současnosti velmi zajímavým tématem, neboť jeho komponenty jsou produkovány v *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*_{ov}, kdežto v *B. parapertussis*_{hu} a *B. pertussis* produkovány nejsou, alespoň ne v laboratorních podmínkách (8). Nicméně nedávné studie ukazují, že v klinických izolátech, které se ještě neadaptovaly na laboratorní podmínky četnou *in vitro* kultivací, je T3SS plně funkční. Produkci T3SS lze navíc indukovat i u laboratorních kmenů *B. pertussis* jako je Tohama I, neboť bylo zjištěno, že kmeny Tohama I izolované z plic experimentálně infikovaných myší produkuje součásti T3SS sekrečního systému (24).

Bordetella pertussis v historii

První incidence pertuse byla zaznamenána v roce 1414 ve Francii, kterou zmínil ve svém článku Niels Rosen von Rosenstein. Na tento článek odkazuje publikace The Mirror of Health z roku 1540, kterou později zmiňuje J. H. Lapin v knize „Whooping cough“ z roku 1943 (17, 25). První epidemie dáivého kašle byla zaznamenána rovněž ve Francii v Paříži v roce 1578. Projevy onemocnění popisuje Guillaume de Baillou v roce 1640 (26) a o 39 let později je onemocnění Sydenhamem pojmenováno jako „pertussis“ (17), vycházející pravděpodobně z latinského „tussis perennis“, což se dá vyložit jako přetrvávající kašel (27). Dle dostupných informací se tedy zdá, že *Bordetella pertussis* nemá hlubší historii než počátek 15. století, co se zaznamenání či popisu onemocnění, jež vyvolává, týče (28), na rozdíl od záškrtu či tetanu, které jsou popisovány již v dobách antiky.

Zmínky o *Bordetella pertussis* se opět objevují v roce 1900, kdy Jules Bordet a Octave Gengou pozorovali organismus v hlenu pacienta s pertusí a roku 1906 oznamují jeho izolaci (29). V roce 1916 J. Chievitz a A. H. Meyer poprvé užívají metodu „cough plates“ ke studiu a analýze organismů působících pertusi využívající Bordet-Gengou média na miskách, které jsou inokulovány kašlem pacientů nakažených tímto onemocněním (30). Na počátku 20. století je organismus označován jako *Bacillus pertussis* a P. Kendrick a G. Eldering, věnující se četným analýzám „cough plates“ (31, 32), v roce 1938 pozorují po delší inkubaci na miskách neobvyklé velikosti kolonie a na rozdíl od *Bacillus pertussis* pozorují jejich hojný růst i na výživném agaru bez přídavku krve. Všimají si možné příbuznosti s *Bacillus bronchisepticus* a jeho antisérem testují izolovaný kmen na aglutinaci s pozitivním

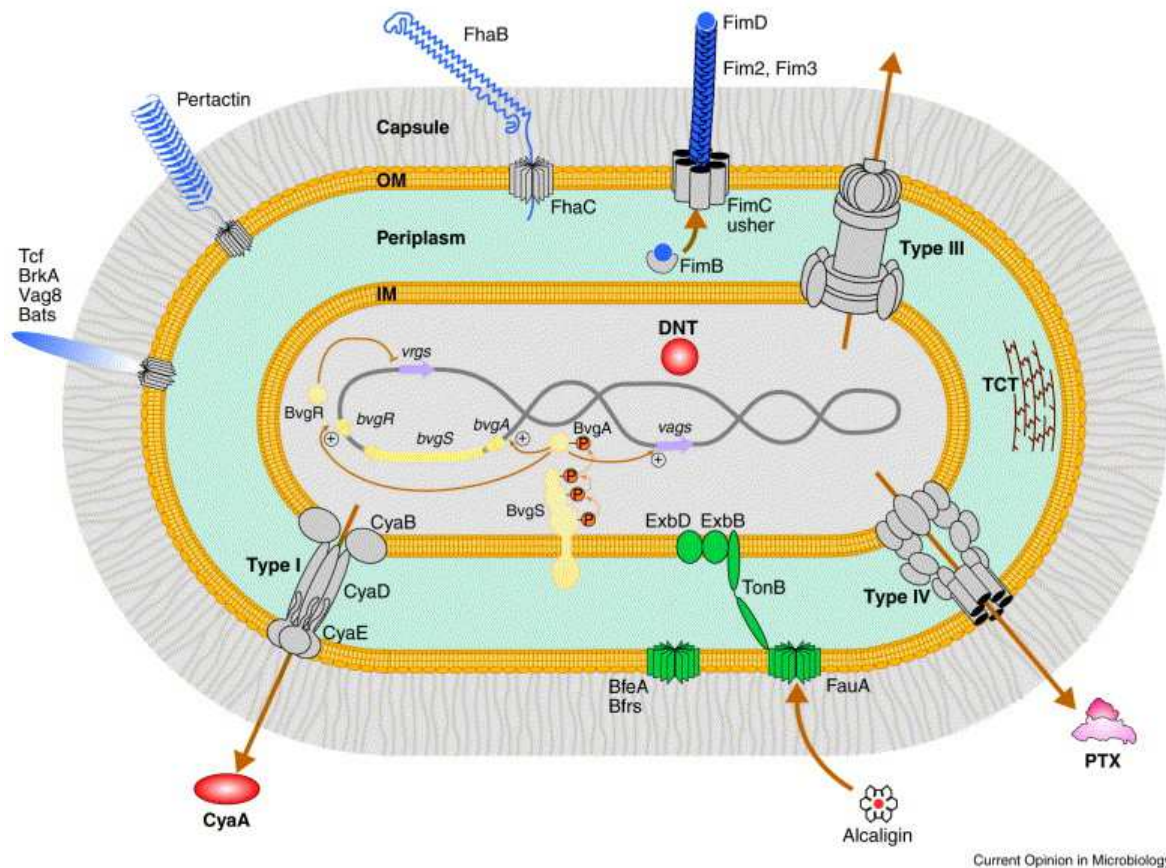
výsledkem, avšak izolát nevykazoval motilitu charakteristickou pro *Bacillus bronchisepticus*. Pro své izoláty s těmito vlastnostmi navrhují pojmenování *Bacillus para-pertussis*. V té době byl na základě potřeby krve v médiu *Bacillus pertussis* přidružen k rodu *Haemophilus*, k tomuto označení však byli P. Kendrick a G. Eldering kritičtí s ohledem na skutečnost, že příbuzný izolát pojmenovaný jako *Bacillus para-pertussis* ke kultivaci krev nevyžadoval a také s ohledem na příbuznost s *Bacillus bronchisepticus* (33). V polovině 20. století se *Bacillus pertussis* a příbuzné druhy definitivně zařazují do vlastního rodu pojmenovaného na počest jednoho z objevitelů, Jules Bordet, *Bordetella* (34).

Faktory virulence

Bordetella pertussis využívá ke kolonizaci a infekci hostitele celou řadu faktorů podílejících se na infekci a kolonizaci hostitele. Popsány budou zejména adheziny a toxiny nicméně je třeba si uvědomit, že patogenní vlastnosti této bakterie jsou do větší či menší míry ovlivněny i dalšími faktory. Regulátorem jejich exprese a správně načasovaného účinku je dvoukomponentní systém signální transdukce BvgAS, který reaguje na změnu vnějších podmínek a spouští či zastavuje expresi genů v čase. Takto citlivě a velmi přesně sladěný systém zajišťuje úspěšnou infekci hostitele. Komplexnost faktorů virulence produkovaných kmeny *B. pertussis* popisuje nadcházející obrázek (Obr. č.2).

Regulace BvgASR

Bvg regulační systém se řadí do rodiny dvoukomponentních systémů (two-component systems, TCS), nazývaných též vzhledem k způsobu regulace jako systémy signální transdukce. Ty se běžně skládají ze sensorové části umístěné v cytoplazmatické membráně, která reaguje na podněty přicházející z okolí do periplazmatického prostoru. Tato sensorová část je charakteristická histidin kinázovou doménou, která je autofosforylována na konzervovaném histidinovém zbytku. Takto aktivovaná histidin kináza je pak zdrojem fosfátu



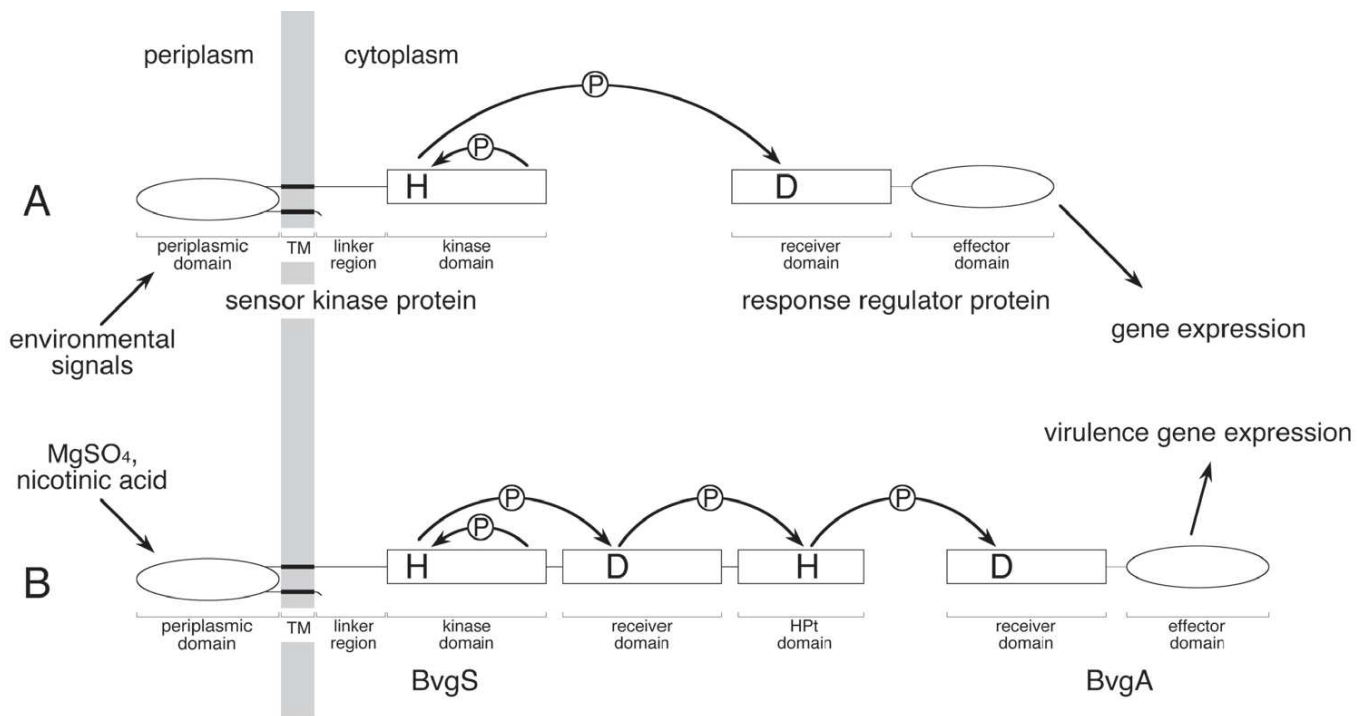
Obr. č. 2. Faktory virulence *Bordetella pertussis*. *Bordetella pertussis* je zobrazena jako Gram negativní bakterie s vnitřní a vnější membránou (IM a OM), periplasmou a kapsulí. Adheziny Fim, FhaB, pertactin, Tcf, BrkA, Vag8 a Bats jsou zobrazeny modře, toxiny PTX, CyaA a DNT červeně, přídatné proteiny FhaC, FimB, FimC a sekreční systémy (T1, T3 a T4) jsou šedé. Systém sloužící k získávání železa ExbB/ExbD, TonB, FauA, BfeA a Bfcs jsou zelené a komponenty regulačního systému BvgA, BvgS and BvgR béžové. Velké hnědé šipky označují orientaci transportu faktorů virulence a sideroforu. Slabší hnědé šipky naznačují schéma regulace Bvg systémem. Převzato z (35).

pro fosforylaci aspartátového zbytku na receiver doméně efektorového proteinu. Efektor se nachází v cytoplasmě, je solubilní a po fosforylaci funguje jako transkripční faktor. Takto jsou popisovány TCS hlavní skupiny, existuje však i skupina menší, kde se fosfát přenáší mezi dvěma histidiny a dvěma aspartáty, které jsou součástí čtyř signálních domén. Příkladem může být *B. subtilis*, který využívá fosforylační kaskádu, kde jsou jednotlivé domény oddělené, ke spuštění sporulace (36). TCS reagují na signály chemické i fyzikální, jako jsou různé ionty, teplota, pH, úroveň kyslíku, osmolarita, redoxní stav přenašečů elektronů, kontakt s hostitelskou buňkou nebo dokonce stimulační látky, které produkuje organismus sám.

bvg lokus zaujímá v *B. pertussis* přibližně 5 kb a zahrnuje geny pro kinázu BvgS, transkripční aktivátor BvgA, a pro BvgR, který se nachází dále po směru transkripce. Transkripce těchto genů je ovládána třemi promotory (37). Za podmínek, které neaktivují Bvg systém je aktivní pouze promotor P₂, který je zodpovědný za bazální expresi genů v operonu a udržuje tak určitou hladinu BvgA proteinu, který ovšem není fosforylován a nedochází tak k aktivaci genů podílejících se na virulenci. Pokud však přijde z vnějšího prostředí signál, který vede k fosforylaci BvgS kinázy a transdukci signálu na BvgA, fosforylovaný BvgA pak aktivuje transkripci z promotorů faktorů virulence a také z ostatních promotorů *bvg* operonu (37).

bvg lokus byl identifikován jako jedna z oblastí, kde po inzerci transpozonu došlo ke ztrátě virulence (38). Touto transpozonovou mutagenezí byly nalezeny i další operony kódující PTX (pertusis toxin) a ACT (adenylate cyclase toxin) toxiny a FHA (filamentous hemagglutinin) adhezin. Mutace v *bvg* lokusu zrušily syntézu všech tří faktorů virulence zároveň. Takto nalezený lokus ovlivňující virulenci byl původně označen jako *vir* (38) a teprve později byl přejmenovaný na *bvg* (*Bordetella virulence genes*).

Bvg dvoukomponentní systém se u *B. pertussis* skládá ze dvou komponent, sensorové a efektorové, reprezentované BvgS a BvgA proteiny. BvgS je transmembránová sensorová kináza o velikosti 135 kDa s N-terminální periplazmickou doménou, která rozpoznává vnější signály. Uvnitř buňky se nachází linker oblast, s tzv. PAS doménou, transmitter, receiver a histidin fosfotransferová doména. Díky počtu domén BvgS se BvgAS řadí do menší skupiny méně častých dvoukomponentních systémů, oproti běžným má BvgAS navíc receiver a histidin fosfotransferovou doménu (Hpt). Na objasnění přenosu fosfátů mezi jednotlivými doménami prostřednictvím konzervovaných zbytků His-Asp-His se významně podíleli M. Andrew Uhl a Jeff F. Miller (39, 40, 41). Charakter vnějšího signálu rozpoznávaného BvgS kinázou v přírodních podmínkách není zatím znám. Nicméně v laboratorních podmínkách lze aktivitu BvgS kinázy tzv. modulovat účinkem některých faktorů jako je kultivační teplota, magnesium sulfát a amid kyseliny nikotinové. Jestliže je *B. pertussis* kultivována při teplotě nižší než 26°C či v přítomnosti sulfátu nebo amidu, BvgS kináza není fosforylována a nedochází tak k aktivaci faktorů virulence, jedná se tak o tzv. Bvg⁻ fázi.



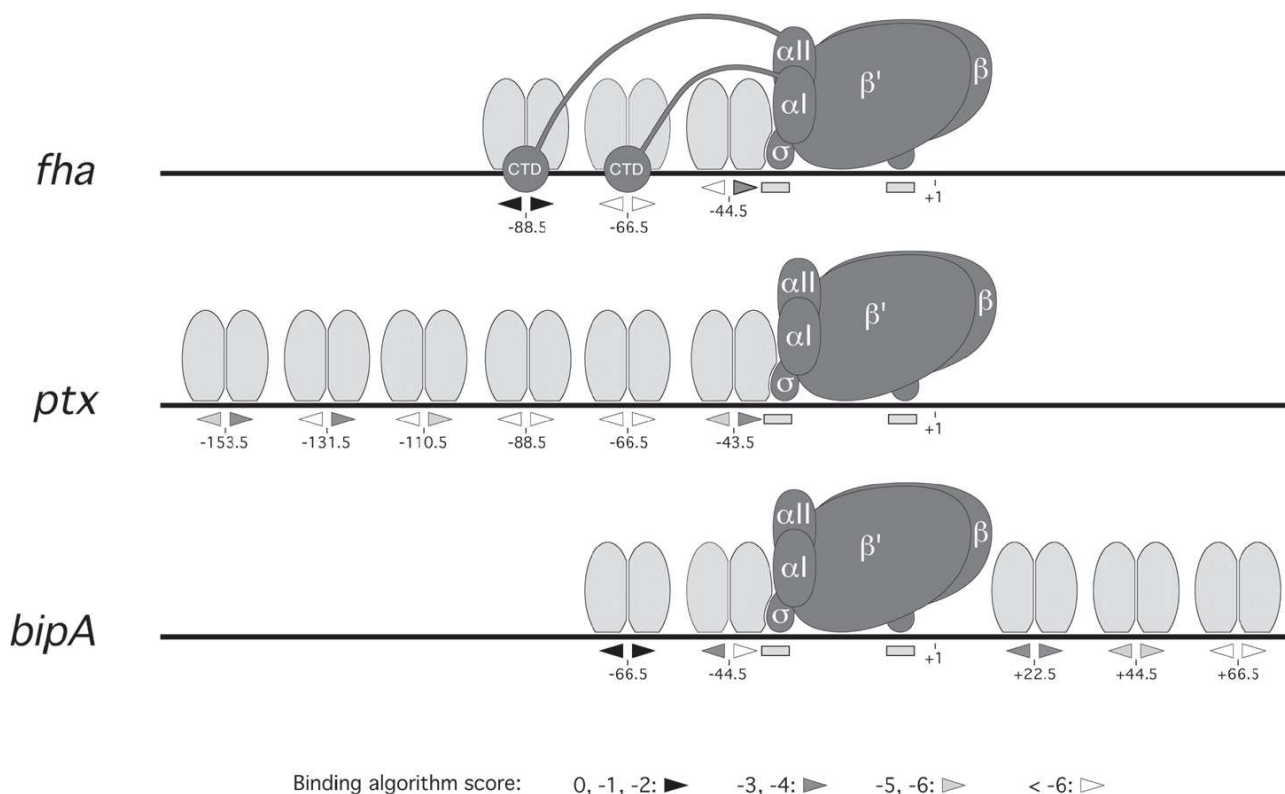
Obr. č. 3. Organizace domén BvgAS (B) v porovnání s hlavní skupinou TCS (A) TM- transmembránová oblast, H- katalytický histidin, D- katalytický aspartát, P- fosfát. Fosfátový přenos je naznačen zahnutými šipkami, obdélníky zastupují konzervované domény, elipsy označují domény s proměnlivými charakteristikami. Vertikální šedý pruh znázorňuje vnitřní membránu gram negativních organismů. Zobrazené $MgSO_4$ a kyselina nikotinová představují tzv. modulátory, které inaktivují BvgS kinázu a zabraňují následnému přenosu fosfátu mezi doménami. Převzato (42).

Úloha linkerové PAS domény v BvgS proteinu zůstává zatím neobjasněna. Byly získány mutanty, které vykazovaly konstitutivní transdukcí způsobenou mutací právě v této linkerové doméně (43), činící BvgS inertní vůči účinku modulačních faktorů. PAS domény jsou všeobecně spojovány s regulací na základě světelných podnětů, změn koncentrace kyslíku, redoxních přenašečů a cukrů. Ačkoliv nebyla prokázána přímá souvislost mezi regulací Bvg systémem a aeracními podmínkami, byl pozorován pokles cytochromu d v avirulentní fázi (44). Možná spojitost byla pozorována i u cytochromu c (45). Co ale poukazuje na vliv redoxního stavu přenašečů elektronů na BvgS linkerovou doménu, je výzkum A. Bocka a R. Grosse, kteří pozorovali ubiquinon 0 jakožto silný inhibitor kinázové aktivity u BvgS a EvgS (*E. coli*) (46).

Efaktorový protein BvgA je cytosolický protein o velikosti 23 kDa, který funguje jako transkripční aktivátor. Na jeho N-terminální doméně se nachází konzervovaný aspartát,

který je fosforylován Hpt doménou BvgS, je tedy příjemcem fosfátu, tzv. receiver, a na C-konci se nachází doména efektorová, která obsahuje DNA vazebný helix-turn-helix motiv. V roce 1991 byla identifikována oblast předcházející *fha* promotoru, kde se vázal BvgA (47), z této studie, využívající metodu DNasa I protekce a gelové elektroforézy, vzešla sekvence obsahující téměř identické repetice TTTCCTA na jednom vlákně a TTTCTTA na vlákně druhém. O šest let později byl ke stejným studiím použit fosforylovaný BvgA. Zjistilo se, že takto modifikovaný BvgA má nejen vyšší afinitu k objevené sekvenci, ale že se váže i v oblasti mezi repeticí a -35 oblastí (48). Následující analýza této oblasti, která byla označena jako sekundární vazebné místo, odhalila, že vazba má kooperativní charakter a delece primární nebo sekundární oblasti neumožnila aktivaci genu. K DNasa I protektivním analýzám byla použita i RNA polymeráza a byl prokázán vznik komplexu BvgA dimerů vázících se v primárních a sekundárních oblastech s RNA polymerázou (49). Snahy o identifikaci podobných oblastí u *ptx* promotoru za použití nefosforylovaného BvgA byly neúspěšné, avšak DNasa I protektivní experimenty s fosforylovaným BvgA prokázaly jeho nezbytnost k aktivaci genu (50). Po této studii následovaly další, potvrzující nezbytnost BvgA-P k aktivaci genů účastnících se virulence, a tedy BvgA-P byl identifikován jako jediný aktivátor nezbytný k *in vitro* transkripci. Více informací ohledně rozeznávaných sekvencí bylo získáno cílenými úpravami primární struktury BvgA a následně charakterizací vazby k *fha* promotoru. Bylo zjištěno, že BvgA-P se váže k primární sekvenci jako head-to-head dimer a jednotlivé monomery rozpoznávají sekvence ve velkých žlábcích, oddělené jednou helikální otočkou. Následující dimery se vázaly obdobně s periodicitou přibližně 22 bp v sekundární oblasti (42). Obdobná studie u *ptx* promotoru odhalila šest dimerů vázajících se v oblasti před promotorem (51).

bipA promotor, který je zobrazen na obrázku č. 4, je příkladem unikátního způsobu regulace. Footprinting metoda odhalila vazbu BvgA s vysokou afinitou v upstream oblasti a s nízkou afinitou v downstream oblasti (52). To umožňuje aktivaci za nízkých koncentrací BvgA a represí za vyšších koncentrací v pozdější fázi, kdy jsou exprimovány pozdní geny, časově se tedy svou expresí na základě těchto vlastností řadí mezi intermediární geny. Potvrzení bylo provedeno na základě genetické analýzy za využití mutace ve vazebných místech (53).



Obr. č. 4. Schématické znázornění BvgA-P a RNA polymerázy a jejich vazby ke třem různým promotorům. Síla a pozice BvgA vazebných míst předurčuje vlastnosti promotorů regulovaných BvgA. BvgA jsou zobrazeny světle šedé, polymeráza tmavě šedá. C-terminální domény α podjednotek RNA polymerázy jsou znázorněny pouze pro *fha* promotor, pro který byla data dostupná (54). Jednotlivá vazebná místa pro monomery jsou znázorněna šipkami, které jsou zbarvené podle jejich úrovně vazby, jak je vysvětleno pod schématem. Tyto síly vazby byly určeny za užití jednoduchého algoritmu založeného na výsledcích mutagenéz konsensus sekvence (55, 56). Zápornější čísla označují menší shodu s konsensus sekvencí. Přesné umístění BvgA bylo odhaleno štěpením DNA s navázaným BvgA-FeBABE za přítomnosti RNA polymerázy (FeBABE je metoda kovalentní modifikace na specifických zbytcích s Fe (54, 57). Převzato z (42).

Co se týče C-terminální domény RNA polymerázy, váže se na stejné vazebné místo jako BvgA, jak je vyobrazeno v předchozím schématu, nicméně na opačné straně DNA helixu, tedy v malém žlábků (54).

Vazba BvgA k DNA sekvenci je velice zajímavým tématem. Na základě rozdílných afinit transkripčního aktivátoru k vazebným sekvencím a různým způsobům aktivace promotorů, jak ukazuje výzkum G. Karimova a A. Ullmann, kde se zaměřili na charakterizaci těchto vazebných míst (58), se dá vyvodit, že afinita BvgA vůči vazebným sekvencím před -35 oblastí není určena pouze variacemi v rozpoznávané sekvenci, ale je modulována délkou linkerů mezi repeticemi, na které se vážou dimery BvgA. K tomu nutno dodat, že ačkoliv jsou

vazebná místa pro transkripční faktor BvgA u genů jako jsou *ptx* nebo *cya* (cykláza) slabá, u *ptx* byla prokázána velká síla promotoru pro jeho plné aktivaci (59). Variabilita síly promotorů na základě rozdílných afinit, jak je zobrazeno na předchozím schématu, vlastnosti transdukční kaskády BvgAS a rozmanitost podmínek prostředí v hostiteli mohou vypovídat o složitějším způsobu regulace exprese faktorů virulence, než by byla role pouhého spínače. Reverzibilita fosforylace efektorového proteinu byla pozorována na obdobném systému s Hpt doménou u *E. coli* (60), dá se tedy usuzovat o pravděpodobné funkční analogii. Celý systém regulace se tedy zdá být velmi komplexní a přizpůsobující se aktuálnímu prostředí.

V souvislosti s aktivitou *bvgAS* operonu jsou u *B. pertussis* popsány virulentní, avirulentní a intermediální fáze. Odlišil je od sebe Lacey v publikaci roku 1960, kde je původně pojmenoval jako fáze X, C a I na základě produkce antigenů, a proto byl tento fenomén přechodu mezi různými fázemi virulence nazván jako antigenní modulace (61). Postupem času se ale pro jednotlivé fáze ustálilo označení Bvg⁺, Bvg⁻ a Bvgⁱ. Jak již bylo zmíněno, v laboratorních podmínkách lze tyto fáze uměle navodit účinkem modulátorů. A protože se každá fáze projevuje určitým typem fenotypu, nazývá se tento proces jako fenotypová modulace (62).

Bvg⁺ fáze je specifická přepisem souboru genů důležitých pro virulenci, souhrnně zvaných jako *vags* (vir-activated genes). Ty byly na základě časové posloupnosti jejich aktivace klasifikovány do tří tříd jako časně, intermediální a pozdní (63, 64). Zároveň s aktivací těchto genů dochází i k represi určité skupiny genů, popsaných jako *vrgs* (vir-repressed genes), které jsou reprimovány BvgR (65), proteinem kódovaným v *bvgASR* lokusu. Tento protein je zajímavý tím, že jeho predikovaná velikost je 23 kDa, zatímco experimentálně zjištěná velikost je 34 kDa (66). Tento fakt by mohl poukazovat na možný přídatný regulační faktor, jehož přesná funkce je však dosud neobjasněná. Časné geny, jejichž promotory vyžadují k aktivaci nízké koncentrace BvgA, kódují FHA, fimbrie a samozřejmě BvgASR systém, což naznačuje důležitost adhezinů při prvotní kolonizaci hostitele. Mezi pozdní geny patří *cya* a *ptx* operony, jako intermediální je označován *prn* (pertaktin) (64).

Bvg⁻ fáze u *B. pertussis* nastává za modulačních podmínek popsaných výše, kdy je BvgASR systém neaktivní, možným vysvětlením mechanismu je blokáce dimerizace modulátorem (67). Za takových podmínek nedochází k expresi *vags* genů, ale díky nepřítomnosti BvgR jsou aktivní *vrgs* geny. Relevance jejich exprese v *B. pertussis in vivo* není prokázána, nicméně několik takto exprimovaných genů bylo nalezeno. Jedná se o *vrg6*,

vrg18, *vrg24*, *vrg53* a *vrg74* (68). Později byly identifikovány další proteiny specifické pro Bvg⁻ fázi, jež jsou lokalizovány na vnější membráně a byly pojmenovány Vra-a a Vra-b (69). Ačkoliv je funkce těchto *vrgs* neznámá, existuje hypotéza o možné úloze těchto genů v pozdních fázích infekčního cyklu. Nejméně jeden *vrg* je silně indukován quorum sensing systémem, který kontroluje denzitu buněčné populace (70).

Bvgⁱ je charakterizovaná jako fáze, kdy dochází k expresi některých *vags*, jako FHA a zároveň nedochází k expresi *vrgs* (56) a může být indukována semimodulativními podmínkami nebo by mohla být vyvolána mutací v *bvgS*, jak bylo prokázáno u *B. bronchiseptica* (71). V Bvgⁱ fázi také dochází k aktivaci specifických genů, jako je *bipA* (Bvg-intermediate phase A), kterému je přiřazována hlavní role v časných fázích kolonizace v dýchacích cestách hostitele a v přenosu infekce. Tuto hypotézu podporuje skutečnost, že daný protein je na N-terminální doméně homologní s intiminem *E. coli* nebo invasinem popsáným u druhů *Yersinia* (72) a dále infekční experimenty, ve kterých je mutant geneticky uzamčený v Bvgⁱ fázi efektivní při kolonizaci hostitele, ale v pozdních fázích infekce nebyl schopen persistence v organismu (73).

Filamentózní hemaglutinin (FHA)

FHA je hlavním adhezinem *Bordetella pertussis*, který se stal jedním z modelových faktorů virulence a jehož studiem byly získány některé základní poznatky týkající se například způsobu aktivace transkripce pomocí BvgAS systému. Struktura tohoto velkého proteinu připomíná vlásenku o velikosti 2 x 50 nm, kde je primární struktura uspořádána do 19-ti zbytkového opakujícího se motivu, bohatého na β-uspořádané struktury (74). Velikost sekretovaného FHA činí 220 kDa, ale je syntetizován jako 367 kDa velký prekurzor, který je produktem strukturního genu *fhaB* (75). Součástí *fha* operonu, který kóduje další proteiny potřebné k biosyntéze a sekreci FHA, jsou FhaC, 62 kDa velký protein, který vytváří β-barel ve vnější membráně, specificky sekretující FhaB (76, 77). Důležitým okamžikem v sekreci FhaB je úprava jeho prekurzoru štěpením přibližně jedné třetiny jeho C-konce proteázou SphB1, která se řadí do velké rodiny tzv. subtilisinů (78, 79). C-konec pravděpodobně působí jako chaperon, brání vzniku nativní konformace proteinu dokud není sekretován z buňky (78). Prekurzor je upravován i na N-konci v místě, které odpovídá rozpoznávací sekvenci Lep peptidáz, ačkoliv je tato sekvence konzervována mezi různými sekretovanými proteiny, nezdá

se, že by u *Bordetella pertussis* hrál zásadní roli při sekreci proteinu, jak bylo delečně ověřeno (80). Nicméně pozdější studie nabízí model interakce N-terminálních sekvencí FhaB a FhaC (81), kde by C-konec byl po štěpení sekvence blokující maturaci sekretován ven. Pomocí této interakce N-konců je pravděpodobně malé množství proteinů, které nepodstoupily štěpení Lep peptidázou, uchyceno na povrchu buňky a přispívá tak k adhezivitě k hostitelským buňkám, zatímco sekretované proteiny působí spíše imunomodulačně.

U FHA bylo popsáno několik vazebných domén, kterými se váže na různé epitopy. Patří mezi ně RGD triplet Arg-Gly-Asp (82), umístěný na jednom z konců vlásečkové struktury (74). Tato RGD doména zajišťuje adhezi k monocytům, makrofágům a pravděpodobně i dalším leukocytům prostřednictvím CR3 receptoru (82). Další doménou je CRD (carbohydrates recognition domain), která zprostředkovává adhezi k řasinkovým epiteliálním buňkám a k makrofágům a nachází se v oblasti mezi zbytky 1141 a 1279 (83). Na FHA se také nachází lektinu podobná vazebná doména pro heparin (84). Bylo dokázáno, že v přítomnosti heparinu a dextran sulfátu byla adhezivita *Bordetella pertussis* snížena, zatímco v přítomnosti nesulfátovaného dextranu nikoliv, nicméně při inhibici buněčné sulfatace cukrů byla schopnost adherence opět snížena (85). Zde se nabízí vysvětlení, že sulfátované cukry, které jsou součástí epitopů buněk mohou zprostředkovávat adhezi, zatímco v případě přítomnosti volných sulfátovaných cukrů by mohla být vazebná doména obsazena a tím může znemožnit následnou vazbu. Vazebnými doménami zprostředkovaný kontakt FHA s fagocytickými buňkami se ukázal být zásadním aspektem v odstraňování *Bordetella pertussis* z organismu neutrofilů (86), nicméně byly pozorovány jeho imunomodulační účinky, jako suprese produkce IL-12 makrofágy, která indukuje diferenciaci Th1 buněk podílejících se na odstranění intracelulárních patogenů (87). Podle nedávných studií FHA indukuje v monocytech produkci cytokinu IL-10, který inhibuje sekreci IFN- γ , což poukazuje na imunosupresivní vliv FHA (88).

Fimbrie (Fim)

Fimbrie jsou další adhezivní strukturou přítomnou u Gram-negativních bakterií, která je umístěna na povrchu buňky. Skládá se z polymerizovaných podjednotek, uspořádaných do filament.

Bordetella pertussis produkuje dva hlavní serotypy 1 a 2 kódované oddělenými lokusy *fim2* a *fim3* (89, 90) a dále serotyp, který je přítomen pouze v malé míře a je kódován genem *fimX* (91). Fim2 protein má molekulovou hmotnost 22,5 kDa a Fim3 22 kDa a jejich produkce podléhá Bvg regulaci. Produkce zmíněných serotypů je modulována drobnými inzerčními a delečními mutacemi v promotorové oblasti, kde se nachází úsek asi 15 cytosinů. Rozdílnost délky této oblasti pak ovlivňuje vzdálenost vazebného místa transkripčního aktivátoru od vazebného místa pro polymerázu, a tedy variabilitu síly promotoru (92). Oba typy fimbrií jsou asociovány s minoritní podjednotkou FimD, která je umístěna na špičce komplexu (93). Gen pro tento protein je uložen v operonu, který kóduje přídatné proteiny FimB a FimC, FimB funguje jako chaperon a FimC jako translokátor do vnější membrány. Zajímavé je, že tento operon je uložen mezi geny *phaB* a *phaC* (94).

Co se týká úlohy fimbrií, FimD podjednotka komplexu se váže na VLA-5 (very late antigen-5) na monocytech, což má za následek aktivaci CR3 a zvýšení míry vazby FHA na tento receptor (95). Zdá se tedy, že by fimbrie kromě adhezivní funkce mohly sloužit jako kooperátor pro vazbu dalších faktorů jako je FHA, navíc je hlavní podjednotka schopna vázat sulfatované cukry jako je heparin sulfát, chondroitin sulfát a dextran sulfát, které jsou běžně přítomné na epitopech v respiračním traktu (96). Závěrem bych poznamenal zajímavost, že fimbrie *Bordetella pertussis* má značnou homologii k fibronektinu (96), který se nachází v hostitelské extracelulární matrix a také váže sulfatované cukry.

Pertaktin (Prn)

Tento povrchový protein patří mezi autotransportéry, které podstupují autoproteolytické štěpení na jejich C-konci. Prekurzor pertaktinu je 93 kDa veliký protein, který je zkrácen o 35 aminokyselinový polypeptid na N-konci, obsahující signální sekvenci, a 30 kDa C-koncovou část (97), maturovaný protein je tedy velký 69 kDa. Na základě krystalové struktury byl pertaktin popsán jako 16-ti vláknový β -barel s průřezem ve tvaru „V“ (98). V pertaktinu se nachází RGD doména a několik oblastí bohatých na prolin a leucin (99). Přítomnost těchto domén může přispívat k adhezi stejným způsobem jako FHA nebo fimbrie. To ostatně potvrzuje práce E. Leininger a kol., který ukázal, že mutant s deletovaným *prn* genem měl sníženou adherenci (100).

Mezi další autotransportéry *Bordetella pertussis* patří BrkA, SphB1, TcfA a Vag8. BrkA se zdá mít protektivní účinky proti séru (101). SphB1 je první objevený autotransportér, který slouží jako faktor při maturaci jiného proteinu v rámci jednoho organismu, štěpí C-konec FHA při průchodu membránou. TcfA je autotransportér specifický pro *Bordetella pertussis* a je jediný, který nezůstává vázaný na povrchu buňky (17). I přes to ale pravděpodobně ovlivňuje schopnost kolonizace, mutant deficitní v jeho produkci kolonizoval hostitele s efektivitou o řád nižší (102). Vag8 se podílí na sekreci efektorů pomocí T3SS, jak bylo objeveno u *B. bronchiseptica* (103). Předpokládá se, že u *B. pertussis* by jeho funkce mohla být obdobná.

Pertuzový toxin (PTX)

117 kDa velký protein se řadí do rodiny AB toxinů. Skládá se z celkem šesti podjednotek označených jako S₁ – S₅, které jsou v holotoxinu v kruhovém uspořádání jako S₂S₄ a S₃S₄ s S₅ spojkou, označované jako B oligomer, s S₁ podjednotkou na vrchu, nazývanou A podjednotka (104). Každá z těchto proteinových podjednotek je syntetizována s N-koncovou signální sekvencí, což svědčí o transportu do periplazmatického prostoru pomocí hlavního transportního systému (7). Z buňky je holotoxin exportován pomocí T4SS (105), který je u *B. pertussis* označován jako Ptl (pertussis toxin liberation) a jehož operon se nachází za *ptx* (106). Oba operony jsou ovládány ze stejného *ptx* promotoru, což dokazuje přerušení exprese inzercí transpozonu v genu pro S₃, který je na konci *ptx* operonu a fakt, že pouze první gen pro S₁ obsahuje RBS (107). Pertuzový toxin je produkován výhradně u *B. pertussis*, příbuzné druhy *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* sice geny pro jeho syntézu obsahují, ale jsou transkripčně neaktivní (108).

Studium vazby PTX na eukaryotické buňky ukázalo, že se toxin váže přes glykoproteiny obsahující sialovou kyselinu (109) a následná série výzkumů za účelem identifikace konkrétního receptoru nabízí hypotézu, že PTX rozeznává na různých buňkách jeden nebo více zbytků sialových kyselin, ke kterým se váže a stimuluje endocytózu (7). Po vstupu do buňky je PTX transportováno do Golgiho aparátu a následně do endoplazmatického retikula retrográdním transportem, kde S1 disociuje za účasti ATP z oligomeru (110, 111, 112) a vstupuje do cytoplazmy. V cytoplazmě pak přenáší ADP-ribózu z NAD na cystein na C-konci α -podjednotky membránových trimerních G-proteinů zahrnující

G_i , G_o a G_t a znemožňuje její disociaci (113). Takto narušené signální dráhy mají pak za následek permanentní aktivaci buněčné adenylát cyklázy, deregulaci iontových kanálů a blokaci aktivace fosfolipázy C. Následkem této deregulace je senzitivita k histaminu, zvýšená sekrece inzulinu a stimulační i supresivní účinky na imunitní systém (114), dále inhibice chemotaxe, oxidativní odpovědi a uvolňování lyzozomálních enzymů z neutrofilů a makrofágů (7). Navíc je PTX schopen stimulovat produkci CR3 receptorů, a tedy i usnadňovat adhezi pomocí FHA, což je dokázáno infekčním experimentem v myších, kde je deleční PTX mutant defektní ve schopnosti kolonizovat respirační trakt (115). Ačkoliv jsou tyto vlivy zásadní, porovnáme-li klinické projevy *B. pertussis* a *B. parapertussis*, lze najít jediný významný rozdíl, a to sice leukocytózu způsobenou *B. pertussis* (116). Zdá se tedy, že navzdory původním hypotézám nehraje PTX tolik významnou roli během infekce člověka.

Adenylát cyklázový toxin (ACT)

Název tohoto toxinu je odvozen od jeho hlavní enzymatické aktivity. Kromě této aktivity vykazuje toxin také aktivitu hemolytickou, jež lze pozorovat na miskách s krví, kde lyzuje červené krvinky a kultury *B. pertussis* vytvářejí kolem kolonií projasněné zóny. Tento 177 kDa velký protein se řadí do velké skupiny RTX toxinů (repeats in toxin), závislých na vápníku, neboť obsahuje asi 45 repetitivních devíti aminokyselin G-G-X-G-X-D-X-L-X, z nichž každá repetice váže vápník (117).

ACT se skládá ze dvou hlavních domén. Na N-konci se nachází katalytická doména, kterou můžeme dále rozdělit na dvě subdomény, z nichž první nese adenylát cyklázovou (AC) aktivitu a druhá je zodpovědná za vazbu calmodulinu, který AC aktivuje (118). C-terminální doména obsahuje vazebnou doménu, která hraje roli ve vazbě k hostitelským buňkám a translokaci katalytické domény dovnitř buněk (117).

Operon, jehož součástí je gen pro adenylát cyklázu, *cyaA*, obsahuje i další geny potřebné pro sekreci tohoto toxinu, označované jako *cyaBDE*, které kódují struktury sekrečního systému typu 1 (119). Později byl nalezen další gen, který je důležitý pro aktivaci toxinu, *cyaC*. Je uložen před *cyaABDE* operonem a je transkribován v opačném směru z vlastního promotoru (120). Účinek CyaC proteinu spočívá v palmitoylaci na ϵ -amino skupině lysinu 983 (121). Je zajímavé, a také nutné zmínit, že většina ACT po sekreci zůstává

asociována s buňkou pomocí vazby s FHA, což naznačuje pravděpodobně jeho úlohu v efektivní dopravě ACT do cílové buňky, díky vyšší lokální koncentraci na membráně a pravděpodobně i indukované konformaci vhodnější pro inzerci AC do buňky (122). Akceptorem sekretovaného toxinu je CR3 (CD11b/CD18), receptor přítomný na povrchu makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk (123). Později bylo dokázáno, že ACT se váže k N-vazebným oligosacharidům na CR3 (124). Nové studie však prokazují, že CR3 není nezbytný pro adhezi a následné dopravení AC do cytoplazmy (125). Navázaný ACT může nabývat dvou konformací, z nichž jedna vede k vytvoření póru, který je selektivní a způsobuje export draslíku a druhá konformace působí translokaci AC domény dovnitř buňky za současného zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} (126, 127, 128). Toto zvýšení má za následek aktivaci calpainu, Ca^{2+} dependentní proteázy, která štěpí protein pojící cytoskelet s CR3, talin. Komplex CR3 s ACT následně migruje do lipidických raftů, kde dochází k translokaci. Translokovaná AC doména je pak vazbou s calmodulinem aktivována (129).

Hlavní úlohou adenylát cyklázy je konverze ATP na cAMP, signální molekuly angažované v mnohých signálních drahách. Po translokaci a aktivaci AC domény nastává rychlá konverze ATP do cytotoxických koncentrací cAMP, působící apoptózu makrofágů či lysi monocytů (130, 131). V prvotní fázi před apoptózou ACT dereguluje jakoukoliv signalizaci, která by vedla k imunitní odpovědi jako je oxidativní vzplanutí, fagocytóza či chemotaxe a umožňuje tak přežití buněk *B. pertussis*.

Dermonekrotický toxin (DNT)

Jedním z prvních popsaných faktorů virulence *Bordetella pertussis* je DNT. Identifikován byl v roce 1909 objeviteli tohoto organismu jako endotoxin (132), což se později ukázalo jako nepravdivé. Na základě výzkumu u *B. bronchiseptica* byla zjištěna teplotní labilita tohoto toxinu, který byl po zahřátí na 56 °C po dobu 20 minut plně inaktivován (133), čímž získal označení jako HLT (heat labile toxin). Na základě vysoké homologie se dá tedy předpokládat velmi podobná hodnota tepelné inaktivace i u *B. pertussis* (134). Analýza pomocí SDS-PAGE určila jeho molekulární hmotnost na 140 kDa (135). Současně používaný název má původ v reakci na intradermální aplikaci, která byla pozorována u různých laboratorních zvířat jako nekrotické léze na kůži (136, 137). U

intraperitoneální a intravenózní aplikace DNT byly pozorovány změny na slezinné tkáni (138, 139).

Dermonekrotický toxin se řadí do rodiny AB toxinů díky své struktuře, kde N-koncová doména má vazebnou funkci a enzymatická aktivita se nachází na C-koncové části (140, 141). Mezi N- a C-terminálními doménami se pak nachází čtyři predikované transmembránové helixy (142). Uvnitř C-koncové sekvence se nachází sekvence L-S-G-C-T-T, jejíž cystein je esenciální pro aktivitu. Tato sekvence je konzervována mezi ostatními cytotoxickými nekrotizujícími faktory jako jsou CNF-1, CNF-2 a transglutamináza u druhů *Streptovorticilium* (143).

Vazba k cílové buňce je zprostředkována N-koncovou doménou, k pravděpodobně velmi specifickému receptoru, na což poukazuje fakt, že některé buňky jsou na DNT senzitivní a některé ne (140). Vstup do buňky probíhá dle současné představy na aktinu nezávislou cestou, kde se na endocytóze podílí dynamin. V endosomu pak probíhá odštěpení vazebné domény za sekvencí Arg-Ala-Lys-Arg⁴⁴, která je rozpoznávána furinem nebo jemu podobnou endoproteázou. Následná translokace enzymatické domény do cytoplazmy je zprostředkována čtyřmi transmembránovými helixy na N-konci vzniklého fragmentu s katalytickou aktivitou (142). Zde působí jako transglutamináza na Rho GTPázách (Rho, Rac, Cdc42), které se účastní signálních drah a ovlivňují organizaci cytoskeletu, dynamiku mikrotubulů, diferenciaci, genovou expresi a sekreci. Rho GTPázy jsou modifikovány přeměnou Gln na Glu, která probíhá v případě Rac a Cdc42 v pozici 61 (144) a v případě Rho se jedná o pozici 63 (142). Za přítomnosti polyaminů však DNT zprostředkovává přednostně jejich vazbu k příslušným Gln, těmito modifikacemi je GTPázová aktivita zrušena, a tedy jsou GTP-vazebné proteiny níže v dráze konstitutivně aktivní (145). Následkem jsou pak přestavby cytoskeletu, formace stresových vláken, fokálních adhezivních spojů a vznik filopodií (145, 146).

Vzhledem k tomu, že DNT není sekretován (36), nebyl doposud při infekčních experimentech pozorován rozdíl mezi divokým kmenem a mutantem neprodukujícím DNT (147). Biologická role a jeho relevance pro *Bordetella pertussis* tedy není jasná, nicméně účinky purifikovaného proteinu na eukaryotické buňky jsou dobře popsány. Evidence specifického receptoru pro vstup do buněk však nadále chybí.

Tracheální cytotoxin (TCT)

TCT je produktem obměny peptidoglykanu a vzniká během buněčného růstu, nepatří tedy mezi toxiny regulované Bvg systémem. Tento toxin má molekulární hmotnost 921 Da a jeho struktura byla definována jako *N*-acetylglukosaminyl-1,6-anhydro-*N*-acetylmuramyl-(L)-alanyl- γ -(D)-glutamyl-*meso*-diaminopimelyl-(D)-alanin (148), ovšem na základě několika experimentů byl určen nejmenší aktivní fragment γ -(D)-glutamyl-*meso*-diaminopimelyl, a dále bylo zjištěno, že hlavní úlohu v cytotoxicitě TCT má právě diaminopimelyl (149). Doposud byly nalezeny dvě další Gram-negativní bakterie, které uvolňují monomer peptidoglykanu. *Neisseria gonorrhoeae* (150), jejíž TCT způsobuje poškození řasinkového epitelu Fallopiovy trubice (vejcovodu) (151) a *Vibrio fischeri*, kde je indukována morfogeneze světelného orgánu symbiotického živočicha, pozorováno na *Euprymna scolopes* (sepiola kropenatá) (152). Ostatní bakterie jako *E. coli* recyklují tento disacharid tetrapeptid importem pomocí integrálního proteinu AmpG, který je lokalizován v cytoplazmatické membráně. Zdá se, že *Bordetella pertussis* neprodukuje funkční AmpG, ačkoliv je v genomu přítomen (7).

Efekt TCT na eukaryotní buňky je obdobný efektu lipopolysacharidu. Má vliv na zvýšenou expresi IL-1 α a následnou produkci iNOS (inducibilní NO syntáza) a zastavení DNA syntézy v křeččích tracheálních epitelálních buňkách (153). iNOS generuje radikály oxidu dusnatého, které jsou cytotoxické, neboť poškozují enzymy obsahující železo (154). Produkce těchto radikálů je iniciována v hladkých epitelálních pohárkových buňkách, odkud dále difundují do prostředí a poškozují sousední tkáň, samotné pohárkové buňky zůstávají bez poškození. TCT je zajímavý tím, že jako jediný faktor virulence je přímo zodpovědný za patologický efekt, doprovázející nákazu černým kašlem. Poškození řasinkového epitelu ztěžuje odstranění bakterií a hlenu z respiračního traktu, což má za následek vyvolání charakteristického kašle (149).

Lipopolysacharid (LPS)

Stejně jako u ostatních Gram-negativních bakterií, LPS po uvolnění z vnější membrány *B. pertussis* během bakteriální lyze působí jako endotoxin, jehož lipid A má pyrogenní, mitogenní a další toxické účinky, mimo jiné také indukuje produkci TNF (tumor

necrosis factor) makrofágy (155). Na rozdíl od enterobakteriálních LPS, které jsou popisované jako hladký typ, LPS *Bordetella pertussis* je drsného typu. Její lipid A se liší od ostatních přítomností GalNAcA, glukuronové kyseliny a glukosaminu (156), zatímco u ostatních z *B. bronchiseptica* klastru je LPS hladkého typu s přítomným O-antigenem (157). O-antigen je vysoce proměnnou složkou LPS a má protektivní účinky vůči séru, u *B. pertussis* však není přítomen (158). Nicméně bylo dokázáno, že *B. pertussis* je schopna přežít účinky velkého množství komplementu, nezávisle na autotransportéru BrkA (159). Tento jev byl zanedlouho vysvětlen rolí LPS v resistenci proti surfaktant proteinu A, který stimuluje fagocytózu makrofágy a neutrolily (159).

Zdá se tedy, že ačkoliv *B. pertussis* postrádá O-antigen jakožto ochranu proti likvidaci sérovým komplementem, kombinace BrkA a LPS je dostatečně protektivní.

Sekreční systém typu 3 (T3SS)

Tento sekreční systém byl identifikován u několika Gram negativních patogenních bakterií jako jsou například *Yersinia* (160) nebo *Salmonella* (161). Jeho hlavní rolí je dopravení efektorových molekul přímo do cytoplazmy hostitelské buňky, kde působí jako toxiny. Komponenty T3SS vytváří jehle podobný útvar, který umožňuje kontakt s membránou napadené buňky a sekreci efektorů.

Přestože v *B. bronchiseptica* je T3SS plně funkční i v laboratorních podmínkách (104), laboratorní kmeny *Bordetella pertussis* komponenty T3SS neprodukují. Přestože jsou příslušné geny transkripčně aktivní, k jejich translaci nedochází (104). Nicméně bylo zjištěno, že čerstvě izolované klinické izoláty *B. pertussis* T3SS produkují stejně tak jako laboratorní kmeny, které se dostaly do kontaktu s imunitním systémem během pokusné infekce (24, 164).

Závěr

Znalost molekulárních mechanismů faktorů virulence, které *Bordetella pertussis* užívá k úspěšné kolonizaci hostitele, je esenciální pro účinnou obranu vůči tomuto patogen, ať již na preventivní či terapeutické úrovni. I přes rozsáhlé vakcinace koncem čtyřicátých let, které značně snížily incidenci, je *Bordetella pertussis* aktuálním problémem a dokonce od devadesátých let byl pozorován nárůst incidence v mnoha zemích. Tento problém může být způsoben změnami ve způsobu vakcinace, neboť v současné době používaná bezbuněčná vakcína, která v devadesátých letech nahradila vakcínu buněčnou, se zdá být méně účinná. Celobuněčná vakcína (obsahující usmrcenou *B. pertussis*) měla v některých případech vakcinace vedlejší účinky, a proto byly vyvinuty řadou výrobců nové bezbuněčné vakcíny obsahující pouze izolované antigeny jako PTX či FHA. Tyto vakcíny však nechrání tělo před nákazou tak dlouhou dobu, jako původní vakcíny, následkem čehož je například zvýšený výskyt onemocnění mezi adolescenty. V současnosti se ale začíná uvažovat o opětovném přechodu na celobuněčné vakcíny nové generace, tzv. „live attenuated vaccines“. Proto jsou veškeré informace týkající se regulace genové exprese a produkce virulenčních faktorů, analýzy jejich vzájemných interakcí a studium jejich efektu na hostitele *in vivo* velmi důležité.

Reference

1. **R. Gross, K. Keidel, K. Schmitt (2010)** Resemblance and divergence: the “new” members of the genus *Bordetella*. *Med Microbiol Immunol*. 2010 Aug;199(3):155-63.
2. **P. Vandamme, M. Heyndrickx, M. Vancanneyt, B. Hoste, P. De Vos, E. Falsen, K. Kersters, K. H. Hinz (1996)** *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol*. 1996 Oct;46(4):849-58
3. **N. K. Fry, J. Duncan, H. Malnick, M. Warner, A. J. Smith, M.S. Jackson, A. Ayoub (2005)** *Bordetella petrii* clinical isolate. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jul;11(7):1131-3.
4. **Y. W. Tang, M. K. Hopkins, C. P. Kolbert, P. A. Hartley, P. J. Severance, D. H. Persing (1998)** *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure. *Clin Infect Dis*. 1998 Feb;26(2):389-92.
5. **M. M. Babu, J. Bhargavi, R. S. Saund, S. K. Singh (2001)** Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Current Science*, Vol. 80, No. 12, June 2001
6. **J. M. Musser, E. L. Hewlett, M. S. Peppler, R. K. Selander (1986)** Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp., *J Bacteriol*. 1986 April; 166(1): 230–237
7. **P. A. Cotter, J. F. Miller (2000)** Principles of Bacterial Pathogenesis, Chapter 13 - *Bordetella*, Pages 619-674,
8. **M. H. Yuk, E. T. Harvill, J. F. Miller (1998)** The BvgAS virulence control system regulates type III secretion in *Bordetella bronchiseptica*, *Mol. Microbiol*. 28, 945-959
9. **B. J. Akerley, J. F. Miller (1993)** Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system, *J Bacteriol*. 1993 Jun;175(11):3468-79
10. **B. Aric, R. Rappuoli (1987)** *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes, *J Bacteriol*. 1987 Jun;169(6):2847-53
11. **R. Gross, R. Rappuoli (1988)** Positive regulation of pertussis toxin expression, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(11):3913-7

12. **J. K. Skeeles, L. H. Arp (1997)** Bordetellosis (turkey coryza) v B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougal, Y. M. Saif, editors. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press; 1997. pp. 275–288
13. **G. Funke, T. Hess, A. von Graevenitz, P. Vandamme (1996)** Characteristics of *Bordetella hinzii* strains isolated from a cystic fibrosis patient over a 3-year period, J Clin Microbiol. 1996 April; 34(4): 966–969
14. **P. Vandamme, J. Homme, M. Vancanneyt, M. Monsieurs, B. Hoste, B. Cookson, C. H. Wirsing von König, Kersters K, P. J. Blackall (1995)** *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans, Int J Syst Bacteriol. 1995 Jan;45(1):37-45
15. **Y. W. Tang, M. K. Hopkins, C. P. Kolbert, P. A. Hartley, P. J. Severance, D. H. Persing (1998)** *Bordetella holmesii*-like organisms associated with septicemia, endocarditis, and respiratory failure, Clin Infect Dis. 1998 Feb;26(2):389-92
16. **F. von Wintzingerode, A. Schattke, R. A. Siddiqui, U. Rösick, U. B. Göbel, R. Gross (2001)** *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*, Int J Syst Evol Microbiol. 2001 Jul;51(Pt 4):1257-65.
17. **S. Mattoo, J. D. Cherry (2005)** Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies, Clin Microbiol Rev. 2005 April; 18(2): 326–382
18. **A. van der Zee, F. Mooi, J. Van Embden, J. Musser (1997)** Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences, J Bacteriol. 1997 Nov;179(21):6609-17
19. **C. A. Cummings, M. M. Brinig, P. W. Lepp, S. van de Pas, D. A. Relman (2004)** *Bordetella* Species are distinguished by patterns of substantial gene loss and host adaptation, J Bacteriol. 2004 March; 186(5): 1484–1492
20. **J. Parkhill, M. Sebaihia, A. Preston, L. D. Murphy, N. Thomson, D. E. Harris, M. T. Holden, C. M. Churcher, S. D. Bentley, K. L. Mungall, A. M. Cerdeño-Tárraga, L. Temple, K. James, B. Harris, M. A. Quail, M. Achtman, R. Atkin, S. Baker, D. Basham, N. Bason, I. Cherevach, T. Chillingworth, M. Collins, A. Cronin, P. Davis, J. Doggett, T. Feltwell, A. Goble, N. Hamlin, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, S. Leather, S. Moule, H. Norberczak, S. O’Neil, D. Ormond, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Rutter, M. Sanders, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, L. Unwin, S. Whitehead, B. G. Barrell, D. J. Maskell (2003)** Comparative analysis of the genome sequences of

- Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*, Nat Genet. 2003 Sep;35(1):32-40. Epub 2003 Aug 10
21. **M. J. Loeffelholz, C. J. Thompson, K. S. Long, M. J. Gilchrist (2000)** Detection of *Bordetella holmesii* using *Bordetella pertussis* IS481 PCR assay, J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):467
 22. **G. Gerlach, R. Gross**, nepublikováno, zmíněno v: **G. Gerlach, F. von Wintzingerode, B. Middendorf, R. Gross (2001)** Evolutionary trends in the genus *Bordetella*, Microbes Infect. 2001 Jan;3(1):61-72
 23. **B. J. Akerley, J. F. Miller (1993)** Flagellin gene transcription in *Bordetella bronchiseptica* is regulated by the BvgAS virulence control system, J Bacteriol. 1993 June; 175(11): 3468–3479
 24. **M. E. Gaillard, D. Bottero, C. E. Castuma, L. A. Basile, D. Hozbor (2011)** Laboratory adaptation of *Bordetella pertussis* is associated with the loss of type three secretion system functionality, Infect Immun. 2011 September; 79(9): 3677–3682
 25. **G. Gerlach, von F. Wintzingerode, B. Middendorf, R. Gross (2001)** Evolutionary trends in the genus *Bordetella*, Microbes Infect. 2001 Jan;3(1):61-72
 26. **T. E. J. Cone (1970)** Whooping cough is first described as a disease sui generis by Baillou in 1640, Pediatrics 46:522
 27. **J. D. Cherry (1999)** Pertussis in the preantibiotic and prevaccine era, with emphasis on adult pertussis, Clin Infect Dis. 1999 Jun;28 Suppl 2:S107-11
 28. **W. H. Holmes (1940)** Whooping-cough, or pertussis, p. 394-414. v knize W. H. Holmes (ed.), Bacillary and rickettsial infections: acute and chronic. Macmillan, New York, N.Y.; zmíněno v publikaci č.17
 29. **J. Bordet, O. Gengou. (1906)** Le microbe de la coqueluche. Ann. Inst. Pasteur 20:48-68, odkazováno z č. 17 a 26
 30. **J. Chievitz, A. H. Meyer (1916)** Recherches sur la coqueluche. Ann. de l'Inst. Pasteur, 30:503,1916, odkaz z č. 33
 31. autor neznámý (1927) Bacteriology of Whooping Cough, Can Med Assoc J. 1927 October; 17(10 Pt 1): 1210
 32. **P. Kendrick, G. Eldering (1934)** Cough Plate Examinations for *B. pertussis*, Am J Public Health Nations Health. 1934 Apr;24(4):309-18
 33. **G. Eldering, P. Kendrick (1938)** *Bacillus para-pertussis*: A species resembling both *Bacillus pertussis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither

34. **V. B. D. Skerman, V. McGowan, P. H. A. Sneath (1980)** Approved lists of bacterial names, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1980, 30, 225-420
35. **C. Locht, R. Antoine, F. Jacob-Dubuisson (2001)** *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects, *Curr Opin Microbiol.* 2001 Feb;4(1):82-9
36. **D. Burbulys, K. A. Trach, J. A. Hoch (1991)** Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay, *Cell.* 1991 Feb 8;64(3):545-52
37. **V. Scarlato, A. Prugnola, B. Aricó, R. Rappuoli (1990)** Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):10067
38. **A. A. Weiss, E. L. Hewlett, G. A. Myers, S. Falkow (1983)** Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun.* 1983 Oct;42(1):33-41
39. **M. A. Uhl, J. F. Miller (1994)** Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1163-7
40. **M. A. Uhl, J. F. Miller (1996)** Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay, *EMBO J.* 1996 Mar 1;15(5):1028-36
41. **M. A. Uhl, J. F. Miller (1996)** Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay, *J Biol Chem.* 1996 Dec 27;271(52):33176-80
42. **S. Stibitz (2007)** The *bvg* Regulon v *Bordetella*: Molecular microbiology, C. Locht INSERM U629 and Institut Pasteur de Lille, France, May 2007, p. 47-68
43. **J. F. Miller, S. A. Johnson, W. J. Black, D. T. Beattie, J. J. Mekalanos, S. Falkow (1992)** Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis* *bvgS* gene, *J Bacteriol.* 1992 Feb;174(3):970-9
44. **J. W. Ezzell, W. J. Dobrogosz, W. E. Kloos, C. R. Manclark (1981)** Phase-shift markers in the genus *Bordetella*: loss of cytochrome d-629 in phase IV variants, *Microbios.* 1981;31(125-126):171-81
45. **M. Liu, P. A. Cotter, J. F. Miller** nepublikováno, zmíněno v č. 7
46. **A. Bock, R. Gross (2002)** The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier, *Eur J Biochem.* 2002 Jul;269(14):3479-84

47. **C. R. Roy, S. Falkow (1991)** Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon, J Bacteriol. 1991 Apr;173(7):2385-92
48. **P. E. Boucher, K. Murakami, A. Ishihama, S. Stibitz (1997)** Nature of DNA binding and RNA polymerase interaction of the *Bordetella pertussis* BvgA transcriptional activator at the *fha* promoter, J Bacteriol. 1997 Mar;179(5):1755-63
49. **P. E. Boucher, M. S. Yang, D. M. Schmidt, S. Stibitz (2001)** Genetic and biochemical analyses of BvgA interaction with the secondary binding region of the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 2001 January; 183(2): 536–544
50. **P. E. Boucher, S. Stibitz (1995)** Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1995 Nov;177(22):6486-91
51. **P. E. Boucher, S. Stibitz** nepublikováno, zmíněno v č.43
52. **R. Deora, H. J. Bootsma, J. F. Miller, P. A. Cotter (2001)** Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene, Mol Microbiol. 2001 May;40(3):669-83
53. **R. Deora (2002)** Differential regulation of the *Bordetella bipA* gene: distinct roles for different BvgA binding sites, J Bacteriol. 2002 Dec;184(24):6942-51
54. **P. E. Boucher, A. E. Maris, M. S. Yang, S. Stibitz (2003)** The response regulator BvgA and RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain bind simultaneously to different faces of the same segment of promoter DNA, Mol Cell. 2003 Jan;11(1):163-73
55. **P. E. Boucher, M. S. Yang, Stibitz S (2001)** Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*, Mol Microbiol. 2001 May;40(4):991-9
56. **T. J. Merkel, P. E. Boucher, S. Stibitz, V. K. Grippe (2003)** Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 2003 Dec;185(23):6902-12
57. **C. L. Williams, P. E. Boucher, S. Stibitz, P. A. Cotter (2005)** BvgA functions as both an activator and a repressor to control Bvg phase expression of *bipA* in *Bordetella pertussis*, Mol Microbiol. 2005 Apr;56(1):175-88
58. **G. Karimova, A. Ullmann (1997)** Characterization of DNA binding sites for the BvgA protein of *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1997 Jun;179(11):3790-2
59. **R. Antoine, S. Alonso, D. Raze, L. Coutte, S. Lesjean, E. Willery, C. Locht, J. F. Dubuisson (2000)** New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by

- systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 2000 Oct;182(20):5902-5
60. **D. Georgellis, O. Kwon, P. De Wulf, E. C. Lin (1998)** Signal decay through a reverse phosphorelay in the Arc two-component signal transduction system, J Biol Chem. 1998 Dec 4;273(49):32864-9
 61. **B. W. Lacey (1960)** Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*, J Hyg (Lond). 1960 Mar;58:57-93
 62. **P. H. Leslie, A. D. Gardner (1931)** The Phases of *Haemophilus pertussis*, J Hyg (Lond). 1931 Jul;31(3):423-34
 63. **V. Scarlato, B. Aricò, A. Prugnola, R. Rappuoli (1991)** Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*, EMBO J. 1991 Dec;10(12):3971-5
 64. **S. M. Kinnear, P. E. Boucher, S. Stibitz, N. H. Carbonetti (1999)** Analysis of BvgA activation of the pertactin gene promoter in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1999 Sep;181(17):5234-41
 65. **T. J. Merkel, S. Stibitz (1995)** Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1995 May;177(10):2727-36
 66. **D. T. Beattie, M. J. Mahan, J. J. Mekalanos (1993)** Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the *vir*-repressed genes (*vrg* genes) in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1993 Jan;175(2):519-27
 67. **A. R. Melton, A. A. Weiss (1993)** Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*, Infect Immun. 1993 Mar;61(3):807-15
 68. **S. Knapp, J. J. Mekalanos (1988)** Two trans-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*, J Bacteriol. 1988 Nov;170(11):5059-66
 69. **T. H Stenson, M. S. Pepler (1995)** Identification of two *bvg*-repressed surface proteins of *Bordetella pertussis*, Infect Immun. 1995 Oct;63(10):3780-9
 70. **T. J. Merkel, J. M. Keith (2000)** The regulation of gene expression in *Bordetella pertussis* by quorum sensing, Int J Med Microbiol, 290 (2000), p. A3; zmíněno v č. 72
 71. **P. A. Cotter, J. F. Miller (1997)** A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens, Mol Microbiol. 1997 May;24(4):671-85

72. **K. E. Stockbauer, B. Fuchslocher, J. F. Miller, P. A. Cotter (2001)** Identification and characterization of BipA, a *Bordetella* Bvg-intermediate phase protein, Mol Microbiol. 2001 Jan;39(1):65-78
73. **N. Vergara-Irigaray, A. Chávarri-Martínez, J. Rodríguez-Cuesta, J. F. Miller, P. A. Cotter, G. M. de Tejada (2005)** Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection, Infect Immun. 2005 Feb;73(2):748-60
74. **A. M. Makhov, J. H. Hannah, M. J. Brennan, B. L. Trus, E. Kocsis, J. F. Conway, P. T. Wingfield, M. N. Simon, A. C. Steven (1994)** Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns, J Mol Biol. 1994 Aug 5;241(1):110-24
75. **M. Domenighini, D. Relman, C. Capiou, S. Falkow, A. Prugnola, V. Scarlato, R. Rappuoli (1990)** Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor, Mol Microbiol. 1990 May;4(5):787-800
76. **F. J. Dubuisson, C. El-Hamel, N. Saint, S. Guédin, E. Willery, G. Molle, C. Locht (1999)** Channel formation by FhaC, the outer membrane protein involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin, J Biol Chem. 1999 Dec 31;274(53):37731-5
77. **S. Guedin, E. Willery, J. Tommassen, E. Fort, H. Drobecq, C. Locht, F. J. Dubuisson (2000)** Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin, J. Biol. Chem. 275:30202-30210
78. **G. R. Mongénie, J. Cornette, N. Mielcarek, F. D. Menozzi, C. Locht (1996)** Distinct roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin, J Bacteriol. 1996 Feb;178(4):1053-60
79. **R. J. Siezen, J. A. Leunissen (1997)** Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases, Protein Sci. 1997 Mar;6(3):501-23
80. **C. L. Buisine, E. Willery, C. Locht, F. J. Dubuisson (1998)** N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin, Mol Microbiol. 1998 Jun;28(6):1283-93

- 81. J. Mazar, P. A. Cotter (2006)** Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion, *Mol Microbiol.* 2006 Nov;62(3):641-54. Epub 2006 Sep 25
- 82. D. Relman, E. Tuomanen, S. Falkow, D. T. Golenbock, K. Saukkonen, S. D. Wright (1990)** Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*, *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1375-82
- 83. S. M. Prasad, Y. Yin, E. Rodzinski, E. I. Tuomanen, H. R. Masure (1993)** Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Infect Immun.* 1993 Jul;61(7):2780-5
- 84. F. D. Menozzi, C. Gantiez, C. Locht (1991)** Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with heparin, *FEMS Microbiol Lett.* 1991 Feb;62(1):59-64
- 85. F. D. Menozzi, R. Mutombo, G. Renaud, C. Gantiez, J. H. Hannah, E. Leininger, M. J. Brennan, C. Locht (1994)** Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun.* 1994 Mar;62(3):769-78
- 86. P. S. M. Schuman, B. Connelly, A. A. Weiss (2003)** Phagocytosis of *Bordetella pertussis* incubated with convalescent serum, *J Infect Dis.* 2003 May 15;187(10):1646-53. Epub 2003 Apr 30
- 87. P. McGuirk, K. H. Mills (2000)** Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*, *Eur J Immunol.* 2000 Feb;30(2):415-22
- 88. V. Dirix, V. Verscheure, T. Goetghebuer, M. Hainaut, A. S. Debrie, C. Locht, F. Mascart (2009)** Monocyte-derived interleukin-10 depresses the *Bordetella pertussis*-specific gamma interferon response in vaccinated infants, *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Dec;16(12):1816-21. Epub 2009 Oct 21
- 89. I. Livey, C. J. Duggleby, A. Robinson. (1987)** Cloning and nucleotide sequence analysis of the serotype 2 fimbrial subunit gene of *Bordetella pertussis*, *Mol Microbiol.* 1987 Sep;1(2):203-9
- 90. F. R. Mooi, A. ter Avest, H. G. van der Heide (1990)** Structure of the *Bordetella pertussis* gene coding for the serotype 3 fimbrial subunit, *FEMS Microbiol Lett.* 1990 Jan 1;54(1-3):327-31
- 91. B. Riboli, P. Pedroni, A. Cuzzoni, G. Grandi, F. de Ferra (1991)** Expression of *Bordetella pertussis* fimbrial (*fim*) genes in *Bordetella bronchiseptica*: *fimX* is expressed at a low level and *vir*-regulated, *Microb Pathog.* 1991 May;10(5):393-403

- 92. R. Willems, A. Paul, H. G. van der Heide, A. R. ter Avest, F. R. Mooi (1990)** Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation, EMBO J. 1990 Sep;9(9):2803-9
- 93. C. A. Geuijen, R. J. Willems, M. Bongaerts, J. Top, H. Gielen, F. R. Mooi (1997)** Role of the *Bordetella pertussis* minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract, Infect Immun. 1997 Oct;65(10):4222-8
- 94. R. J. Willems, H. G. van der Heide, F. R. Mooi (1992)** Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene, Mol Microbiol. 1992 Sep;6(18):2661-71
- 95. W. L. Hazenbos, B. M. van den Berg, C. W. Geuijen, F. R. Mooi, R. van Furth (1995)** Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases, J Immunol. 1995 Oct 15;155(8):3972-8
- 96. C. A. Geuijen, R. J. Willems, F. R. Mooi (1996)** The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars, Infect Immun. 1996 Jul;64(7):2657-65
- 97. D. de Gouw, D. A. Diavatopoulos, H. J. Bootsma, P. W. Hermans, F. R. Mooi (2011)** Pertussis: a matter of immune modulation, FEMS Microbiol Rev. 2011 May;35(3):441-74. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00257.x. Epub 2011 Jan 5
- 98. P. Emsley, I. G. Charles, N. F. Fairweather, N. W. Isaacs (1996)** Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin, Nature. 1996 May 2;381(6577):90-2
- 99. J. Li, N. F. Fairweather, P. Novotny, G. Dougan, I. G. Charles (1992)** Cloning, nucleotide sequence and heterologous expression of the protective outer-membrane protein P.68 pertactin from *Bordetella bronchiseptica*, J Gen Microbiol. 1992 Aug;138 Pt 8:1697-705
- 100. E. Leininger, M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, M. J. Brennan (1991)** Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells, Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Jan 15;88(2):345-9
- 101. R. C. Fernandez, A. A. Weiss (1996)** Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides, Antimicrob Agents Chemother. 1996 Apr;40(4):1041-3
- 102. T. M. Finn, L. A. Stevens (1995)** Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant, Mol Microbiol. 1995 May;16(4):625-34
- 103. S. Mattoo, M. H. Yuk, L. L. Huang, J. F. Miller (2004)** Regulation of type III secretion in *Bordetella*, Mol Microbiol. 2004 May;52(4):1201-14

104. **M. Tamura, K. Nogimori, S. Murai, M. Yajima, K. Ito, T. Katada, M. Ui, S. Ishii (1982)** Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model, *Biochemistry*. 1982 Oct 26;21(22):5516-22
105. **M. Pizza, M. Bugnoli, R. Manetti, A. Covacci, R. Rappuoli (1990)** The subunit S1 is important for pertussis toxin secretion, *J Biol Chem*. 1990 Oct 15;265(29):17759-63
106. **A. A. Weiss, F. D. Johnson, D. L. Burns (1993)** Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 1;90(7):2970-4
107. **A. Nicosia, M. Perugini, C. Franzini, M. C. Casagli, M. G. Borri, G. Antoni, M. Almoni, P. Neri, G. Ratti, R. Rappuoli (1986)** Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul;83(13):4631-5
108. **A. Nicosia, R. Rappuoli (1987)** Promoter of the pertussis toxin operon and production of pertussis toxin, *J Bacteriol*. 1987 Jun;169(6):2843-6
109. **M. H. Witvliet, D. L. Burns, M. J. Brennan, J. T. Poolman, C. R. Manclark (1989)** Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins, *Infect Immun*. 1989 Nov;57(11):3324-30
110. **R. D. Plaut, N. H. Carbonetti (2008)** Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell, *Cell Microbiol*. 2008 May;10(5):1130-9. Epub 2007 Dec 31
111. **B. Hazes, A. Boodhoo, S. A. Cockle, R. J. Read (1996)** Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor, *J Mol Biol*. 1996 May 17;258(4):661-71
112. **H. R. Kaslow, L. K. Lim, J. Moss, D. D. Lesikar (1987)** Structure-activity analysis of the activation of pertussis toxin, *Biochemistry*. 1987 Jan 13;26(1):123-7
113. **E. L. Hewlett, G. M. Donato (2007)** *Bordetella* toxins v *Molecular microbiology*, Camille Locht INSERM U629 and Institut Pasteur de Lille, France, May 2007, p. 47-68
114. **J. J. Munoz (1988)** Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system v *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*, A.C. Wardlaw, R. Parton; zmíněno v č.7
115. **N. H. Carbonetti, G. V. Artamonova, R. M. Mays, Z. E. Worthington (2003)** Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*, *Infect Immun*. 2003 Nov;71(11):6358-66
116. **U. Heininger, K. Stehr, S. S. Grohé, C. Lorenz, R. Rost, P. D. Christenson, M. Uberall, J. D. Cherry (1994)** Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella*

- parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*, *Pediatr Infect Dis J*. 1994 Apr;13(4):306-9
117. **T. Rose, P. Sebo, J. Bellalou, D. Ladant (1995)** Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes, *J Biol Chem*. 1995 Nov 3;270(44):26370-6
118. **D. Ladant (1988)** Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains, *J Biol Chem*. 1988 Feb 25;263(6):2612-8
119. **P. Glaser, H. Sakamoto, J. Bellalou, A. Ullmann, A. Danchin (1988)** Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*, *EMBO J*. 1988 Dec 1;7(12):3997-4004
120. **E. M. Barry, A. A. Weiss, I. E. Ehrmann, M. C. Gray, E. L. Hewlett, M. S. Goodwin (1991)** *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation, *J Bacteriol*. 1991 Jan;173(2):720-6
121. **M. Hackett, L. Guo, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. L. Hewlett (1994)** Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*, *Science*. 1994 Oct 21;266(5184):433-5
122. **F. R. Zaretzky, M. C. Gray, E. L. Hewlett (2002)** Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction, *Mol Microbiol*. 2002 Sep;45(6):1589-98
123. **P. Guermonprez, N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. R. Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, C. Leclerc (2001)** The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18), *J Exp Med*. 2001 May 7;193(9):1035-44
124. **J. Morova, R. Osicka, J. Masin, P. Sebo (2008)** RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 8;105(14):5355-60. Epub 2008 Mar 28
125. **J. C. Eby, M. C. Gray, A. R. Mangan, G. M. Donato, E. L. Hewlett (2012)** Role of CD11b/CD18 in the process of intoxication by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun*. 2012 Feb;80(2):850-9. Epub 2011 Dec 5
126. **A. Osicková, R. Osicka, E. Maier, R. Benz, P. Sebo (1999)** An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate

- cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels, *J Biol Chem.* 1999 Dec 31;274(53):37644-50
127. **E. L. Hewlett, G. M. Donato, M. C. Gray (2006)** Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP, *Mol Microbiol.* 2006 Jan;59(2):447-59
 128. **A. Osickova, J. Masin, C. Fayolle, J. Krusek, M. Basler, E. Pospisilova, C. Leclerc, R. Osicka, P. Sebo (2010)** Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore, *Mol Microbiol.* 2010 Mar;75(6):1550-62. Epub 2010 Feb 23
 129. **L. Bumba, J. Masin, R. Fiser, P. Sebo (2010)** *Bordetella* adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps, *PLoS Pathog.* 2010 May 13;6(5):e1000901
 130. **N. Khelef, A. Zychlinsky, N. Guiso (1993)** *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin, *Infect Immun.* 1993 Oct;61(10):4064-71
 131. **M. Basler, J. Masin, R. Osicka, P. Sebo (2006)** Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes, *Infect Immun.* 2006 Apr;74(4):2207-14
 132. **J. Bordet, O. Gengou (1909)** L'endotoxine coquelucheuse, *Ann. Inst. Pasteur* 23, 415-419; zmíněno v č.7, 17
 133. **Y. Horiguchi, T. Nakai, K. Kume (1989)** Purification and characterization of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin, *Microb Pathog.* 1989 May;6(5):361-8
 134. **K. E. Walker, A. A. Weiss (1994)** Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*, *Infect Immun.* 1994 Sep;62(9):3817-28
 135. **Y. L. Zhang, R. D. Sekura (1991)** Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*, *Infect Immun.* 1991 Oct;59(10):3754-9
 136. **G. D. Pullinger, T. E. Adams, P. B. Mullan, T. I. Garrod, A. J. Lax (1996)** Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp, *Infect Immun.* 1996 Oct;64(10):4163-71
 137. **R. M. Roop, H. P. Veit, R. J. Sinsky, S. P. Veit, E. L. Hewlett, E. T. Kornegay (1987)** Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine, *Infect Immun.* 1987 Jan;55(1):217-22

138. **R. Parton (1985)** Effect of prednisolone on the toxicity of *Bordetella pertussis* for mice, J Med Microbiol. 1985 Jun;19(3):391-400
139. **T. Iida, T. Okonogi (1971)** Lienotoxicity of *Bordetella pertussis* in mice, J Med Microbiol. 1971 Feb;4(1):51-61
140. **T. Matsuzawa, T. Kashimoto, J. Katahira, Y. Horiguchi (2002)** Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin, Infect Immun. 2002 Jul;70(7):3427-32
141. **G. Schmidt, U. M. Goehring, J. Schirmer, M. Lerm, K. Aktories (1999)** Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for Rho GTPases, J Biol Chem. 1999 Nov 5;274(45):31875-81
142. **T. Matsuzawa, A. Fukui, T. Kashimoto, K. Nagao, K. Oka, M. Miyake, Y. Horiguchi (2004)** *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner, J Biol Chem. 2004 Jan 23;279(4):2866-72. Epub 2003 Nov 3
143. **T. Kashimoto, J. Katahira, W. R. Cornejo, M. Masuda, A. Fukuoh, T. Matsuzawa, T. Ohnishi, Y. Horiguchi (1999)** Identification of functional domains of *Bordetella* dermonecrotizing toxin, Infect Immun. 1999 Aug;67(8):3727-32
144. **M. Masuda, M. Minami, H. Shime, T. Matsuzawa, Y. Horiguchi (2002)** *In vivo* modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella* dermonecrotic toxin, Infect Immun. 2002 Feb;70(2):998-1001
145. **M. Masuda, L. Betancourt, T. Matsuzawa, T. Kashimoto, T. Takao, Y. Shimonishi, Y. Horiguchi (2000)** Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin, EMBO J. 2000 Feb 15;19(4):521-30
146. **H. Miki, T. Sasaki, Y. Takai, T. Takenawa (1998)** Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP, Nature. 1998 Jan 1;391(6662):93-6
147. **A. A. Weiss, M. S. Goodwin (1989)** Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model, Infect Immun. 1989 Dec;57(12):3757-64
148. **B. T. Cookson, A. N. Tyler, W. E. Goldman (1989)** Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*, Biochemistry. 1989 Feb 21;28(4):1744-9
149. **K. E. Luker, J. L. Collier, E. W. Kolodziej, G. R. Marshall, W. E. Goldman (1993)** *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct

- structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology, Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 15;90(6):2365-9
150. **R. K. Sinha, R. S. Rosenthal (1980)** Release of soluble peptidoglycan from growing conococci: demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments, Infect Immun. 1980 Sep;29(3):914-25
151. **M. A. Melly, Z. A. McGee, R. S. Rosenthal (1984)** Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa, J. Infect. Dis. 149, 378–386
152. **T. A. Koropatnick, J. T. Engle, M. A. Apicella, E. V. Stabb, W. E. Goldman, M. J. McFall-Ngai (2004)** Microbial factor-mediated development in a host-bacterial mutualism, Science. 2004 Nov 12;306(5699):1186-8
153. **T. A. Flak, L. N. Heiss, J. T. Engle, W. E. Goldman (2000)** Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide, Infect Immun. 2000 Mar;68(3):1235-42
154. **L. N. Heiss, J. R. Lancaster Jr, J. A. Corbett, W. E. Goldman (1994)** Epithelial autotoxicity of nitric oxide: role in the respiratory cytopathology of pertussis, Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jan 4;91(1):267-70
155. **M. Watanabe, H. Takimoto, Y. Kumazawa, K. Amano (1990)** Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species, J Gen Microbiol. 1990 Mar;136(3):489-93
156. **M. Caroff, R. Chaby, D. Karibian, J. Perry, C. Deprun, L. Szabó (1990)** Variations in the carbohydrate regions of *Bordetella pertussis* lipopolysaccharides: electrophoretic, serological, and structural features, J Bacteriol. 1990 Feb;172(2):1121-8
157. **J. L. Di Fabio, M. Caroff, D. Karibian, J. C. Richards, M. B. Perry (1992)** Characterization of the common antigenic lipopolysaccharide O-chains produced by *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* FEMS Microbiol Lett. 1992 Oct 15;76(3):275-81
158. **E. J. Pishko, D. J. Betting, C. S. Hutter, E. T. Harvill (2003)** *Bordetella pertussis* acquires resistance to complement-mediated killing *in vivo*, Infect Immun. 2003 Sep;71(9):4936-42
159. **L. M. Schaeffer, F. X. McCormack, H. Wu, A. A. Weiss (2004)** *Bordetella pertussis* lipopolysaccharide resists the bactericidal effects of pulmonary surfactant protein A, J Immunol. 2004 Aug 1;173(3):1959-65

- 160. G. R. Cornelis, H. Wolf-Watz (1997)** The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells, *Mol Microbiol.* 1997 Mar;23(5):861-7
- 161. T. Kubori, Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. L. Tejero, A. Sukhan, J. E. Galán, S. I. Aizawa (1998)** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system, *Science.* 1998 Apr 24;280(5363):602-5
- 162. N. K. Fennelly, F. Sisti, S. C. Higgins, P. J. Ross, H. van der Heide, F. R. Mooi, A. Boyd, K. H. Mills (2008)** *Bordetella pertussis* expresses a functional type III secretion system that subverts protective innate and adaptive immune response, *Infect Immun.* 2008 Mar;76(3):1257-66. Epub 2008 Jan 14