

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Daniel Štipl

**Struktura a role sekrečního systému typu 3 a dalších faktorů virulence
v patogenezi černého kašle**

**The structure and role of type III secretion system and other virulence factors
in pathogenesis of pertussis**

Bakalářská práce

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

Praha, 2017

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Branislavu Večerkovi, Ph.D. za připomínky a příjemnou spolupráci v průběhu vypracovávání této bakalářské práce. Mé poděkování patří také všem ostatním členům Laboratoře post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ AV ČR, v.v.i.) za vytvoření příjemných pracovních podmínek při získávání praktických zkušeností souvisejících s touto bakalářskou prací.

Rád bych také touto cestou srdečně poděkoval Bc. Karolíně Lhotákové za vzájemnou podporu a spolupráci během bakalářského studia. Nakonec bych rád vyjádřil díky za podporu ve studiu svým rodičům, Blaženě a Pavlovi Štiplovým.

Prohlášení

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

V Praze, 12. května 2017

Podpis:

Daniel Štipl

Abstrakt

Bordetella pertussis je významným lidským patogenem, který kolonizuje tkáň dýchacího ústrojí. Patologickým projevem této infekce je závažná a vysoce nakažlivá nemoc nazývaná černý kašel. *B. pertussis* disponuje celou řadou faktorů virulence, mezi které patří pertusový toxin, adenylát cyklázový toxin, dermonekrotický toxin, tracheální cytotoxin, adheziny a v neposlední řadě sekreční systém typu 3 (T3SS). Komplexní regulaci virulence *B. pertussis* zajišťuje dvousložkový systém signální transdukce BvgAS.

Faktor virulence T3SS je některými Gram-negativními bakteriemi využíván ke kolonizaci hostitele a je zodpovědný za patologické projevy infekce. T3SS hraje roli ve virulenci *B. bronchiseptica*, savčím patogenu blízce příbuzném *B. pertussis*. Význam T3SS ve virulenci *B. pertussis* však dosud nebyl objasněn.

V posledních desetiletích byl učiněn významný pokrok v porozumění struktuře, funkci a regulaci většiny známých faktorů virulence, není však zatím známo, co způsobuje patologické stavy provázející tuto infekci.

Klíčová slova: *Bordetella*, T3SS, regulace genové exprese, faktor virulence, patogeneze

Abstract

Bordetella pertussis is a significant human pathogen which colonises a respiratory tract. The infection with *B. pertussis* results in serious and highly contagious disease called pertussis or whooping cough. *B. pertussis* produces wide range of virulence factors such as pertussis toxin, adenylate cyclase toxin, dermonecrotic toxin, tracheal cytotoxin, adhesins and type III secretion system (T3SS). The BvgAS is two-component signal transduction system that provides the complex regulation of *B. pertussis* virulence.

The virulence factor T3SS is used by some Gram-negative bacteria to colonise the host and is responsible for pathogenesis of the infection. T3SS takes a role in virulence of mammalian pathogen *B. bronchiseptica*, closely related to *B. pertussis*. The importance of T3SS in virulence of *B. pertussis* remains to be investigated.

Significant advance in structure, function and regulation of the most of virulence factors have been accomplished in last few decades. The causative agents of pathogenesis in that infection remain unknown.

Key words: *Bordetella*, T3SS, gene expresssion regulation, virulence factor, pathogenesis

Seznam zkratek

aa	<u>a</u> mino <u>a</u> cid	aminokyselina
AC	<u>a</u> denylat <u>c</u> yclase <u>d</u> omain	adenylát cyklázová doména
ACT	<u>a</u> denylate <u>c</u> yclase <u>t</u> oxin	adenylát cyklázový toxin
Bvg	<i>Bordetella</i> <u>v</u> irulence <u>g</u> ene	gen virulence <i>Bordetelly</i>
BvgA~P	<u>BvgA</u> phosphate	fosforylovaný BvgA
cAMP	<u>c</u> yclic <u>a</u> denosin <u>e</u> monophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
c-di-GMP	<u>c</u> yclic <u>d</u> iguanylate	cyklický diguanylát
CR	<u>c</u> omplement <u>r</u> eceptor	receptor komplementu
DNT	<u>d</u> ermonecrotic <u>t</u> oxin	dermonekrotický toxin
ER	<u>e</u> ndoplasmic <u>r</u> eticulum	endoplazmatické retikulum
FHA	<u>f</u> ilamentous <u>h</u> emagglutinin	filamntózní hemagglutinin
GA	<u>G</u> olgi <u>a</u> pparatus	Golgiho aparát
HK	<u>h</u> istidine <u>k</u> inase domain	histidin-kinázová doména
HSF	<u>h</u> istamine <u>s</u> ensitizing <u>f</u> actor	histamin senzibilizující faktor
HTH	<u>h</u> elix- <u>t</u> urn- <u>h</u> elix domain	název domény odvozený od proteinového motivu <i>helix-turn-helix</i>
Hpt	<u>h</u> istidine <u>p</u> hospho <u>t</u> ransferase domain	histidin-fosfotransferázová doména
IAP	<u>i</u> slle <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein	ostrůvky aktivující protein
IL	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin	interleukin
LPF	<u>l</u> ymphocytosis <u>p</u> romoting <u>f</u> actor	lymfocytózu podporující faktor
PAS	<u>P</u> er/ <u>A</u> rn <u>t</u> / <u>S</u> im domain	název domény odvozený od proteinového motivu <i>Per/Arnt/Sim</i>
PRN	<u>p</u> ertactin	pertaktin
PT	<u>p</u> ertussis <u>t</u> oxin	pertusový toxin
Rec	<u>r</u> eceiver domain	přijímací doména
RTX	<u>r</u> epeats in <u>t</u> oxin	repetice v toxinu
T3S	<u>t</u> ype <u>III</u> <u>s</u> ecretion	sekrece typu 3
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

Obsah

Úvod	1
1 Rod <i>Bordetella</i>	2
1.1 Klasické druhy <i>Bordetella</i>	2
2 Faktory virulence <i>Bordetella pertusis</i>	4
2.1 Toxiny	4
2.1.1 Pertusový toxin.....	4
2.1.2 Adenylát cyklázový toxin.....	6
2.1.3 Dermonekrotický toxin	9
2.1.4 Tracheální cytotoxin.....	9
2.2 Adheziny	9
2.3 Sekreční systém typu 3	10
3 Regulace virulence <i>B. pertussis</i> pomocí BvgAS.....	11
3.1 Složení BvgAS	11
3.2 Mechanismus regulace pomocí BvgAS	13
3.3 Regulace virulence <i>B. pertussis</i> pomocí systému RisAK	14
4 Sekreční systém typu 3.....	16
4.1 Charakteristika sekrece typu 3	16
4.2 Původ T3SS v evoluci	18
4.3 Struktura a výstavba T3SS	18
4.4 Mechanismus sekrece pomocí T3SS.....	21
4.5 Význam T3SS v patogenezi <i>B. pertussis</i>	22
4.5.1 Proteiny sekretované T3SS	24
Závěr.....	26
Seznam použité literatury	27

Úvod

Černý neboli dávivý kašel označovaný také jako pertuse je vysoce nakažlivé akutní onemocnění dýchacích cest člověka způsobené bakteriemi *Bordetella pertussis*. Nakažení touto závažnou chorobou může v případě neočkovaného dítěte či novorozence způsobovat život ohrožující stav, který často končí smrtí. Černý kašel přestal být ve druhé polovině 20. století považován za vážnou hrozbu díky zavedení účinné vakcíny, což vedlo k významnému snížení úmrtnosti. Celosvětově zvýšená úmrtnost zaznamenaná v posledních několika desetiletích však opět podněcuje výzkum jejího původce (Skoff et al., 2015).

B. pertussis disponuje celou řadou nástrojů, které jí umožňují infikovat a kolonizovat tkáň dýchacího ústrojí člověka. Porozumění mechanismům, díky kterým je tato bakterie tak úspěšným patogenem, je nezbytné ke zvýšení efektivity vakcinace či léčby černého kašle. Teprve v nedávné době byl u *B. pertussis* objeven nový faktor virulence, sekreční systém typu 3 (T3SS). Přestože mu dosavadní výzkum nepřisuzuje příliš velkou pozornost a zůstává ve stínu lépe prozkoumaných faktorů virulence, není vyloučené, že by T3SS mohl hrát významnou roli v patogenezi *B. pertussis*.

Tato práce má za cíl shrnout doposud objevené a popsané faktory virulence *B. pertussis* co do jejich struktury, regulace exprese a významu v patogenezi. V tomto kontextu je hlavní důraz kladen právě na T3SS. Tato práce má za cíl zhodnotit na základě doposud známých informací relevanci dalšího studia T3SS.

1 Rod *Bordetella*

Rod *Bordetella* patří do čeledi *Alcaligenaceae*. Do rodu *Bordetella* dnes spadá celkem šestnáct druhů a několik desítek dalších přírodních izolátů, které se dělí do deseti podskupin dle příbuznosti 16S rRNA, z nichž pouze čtyři mají životní cyklus spojený se zvířecím hostitelem. Ze všech těchto druhů je běžně vyčleňována podskupina označovaná jako „klasické druhy“, kterým je věnována pozornost především z klinických důvodů. Je obecně známo, že bakterie rodu *Bordetella* jsou schopné způsobit ve svém hostiteli infekce dýchacího traktu. Hostitelem jsou nejčastěji ptáci a savci včetně člověka (Mattoo and Cherry, 2005). Nejnovější výzkumy ukazují, že bakterie rodu *Bordetella* lze nalézt kromě savců i v dalších různorodých ekologických nikách – ve vodě, v půdě, či v rostlinách. Nebyly však zatím nalezeny druhy schopné patogeneze žijící pouze mimo zvířecí hostitele. Tyto nepatogenní druhy jsou proto považovány za předchůdce patogenních druhů žijících ve zvířecích hostitelích. K vývoji patogenních druhů došlo nejpravděpodobněji z druhů žijících v půdě a/nebo ve vodě. Celý rod *Bordetella* pravděpodobně vznikl z předka žijícího v půdě (Hamidou Soumana et al., 2017).

1.1 Klasické druhy *Bordetella*

Mezi klasické druhy patří blízkce příbuzné *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*. Evolučně nejstarší z nich je *B. bronchiseptica*, z jejíhož předka se pravděpodobně nezávisle na sobě později vyvinuly *B. pertussis* a *B. parapertussis* (Parkhill et al., 2003).

B. pertussis je Gram-negativní aerobní kokobacil známý jako původce černého kašle. Je striktně lidským patogenem a kromě člověka není znám žádný jiný přirozený rezervoár. Na rozdíl od ostatních druhů rodu *Bordetella*, *B. pertussis* není schopna aktivního pohybu pomocí bičíku a lze ji v laboratorních podmínkách kultivovat na krevním agaru (Bordet-Gengou agar) i v tekutém médiu (Steiner-Scholte medium). K vědeckým experimentům je nejčastěji používán kmen *B. pertussis* Tohama I vyizolovaný v 50. letech 20. století v Japonsku (Kasuga, 1954, cit. dle Fennelly et al., 2008). V dnešní době se však vědci potýkají s prokazatelnou adaptací tohoto kmene na laboratorní podmínky v porovnání s klinickými izoláty (Fennelly et al., 2008; Gaillard et al., 2011). Genom *B. pertussis* Tohama I je velký 4 086 186 bází a obsahuje 358 pseudogenů, což jsou geny, které díky bodovým mutacím či delecím ztratily svou funkci (Parkhill et al., 2003).

B. bronchiseptica má na rozdíl od striktně lidských patogenů *B. pertussis* a *B. parapertussis* asi o 20 % větší genom bez pseudogenů a kóduje asi o 1 000 genů více, což může souviset s její bohatou škálou hostitelů, mezi které patří ptáci a savci včetně člověka. Rozsáhlejší genetická výbava *B. bronchiseptica* může mít také význam v přežití patogenu mimo hostitele. Specializace *B. pertussis* na lidského hostitele může být způsobena buď úplnou ztrátou těchto genů, nebo jejich poškozením, resp. inaktivací a následným vznikem pseudogenů (Mattoo and Cherry, 2005; Parkhill et al., 2003; Register et al., 2015).

2 Faktory virulence *Bordetella pertusis*

Faktory virulence jsou látky, které umožňují patogennímu organismu přežít v hostitelském organismu a kolonizovat ho, což může později vést k patologickým změnám v kolonizovaných orgánových soustavách a k propuknutí choroby. Zpravidla se jedná o toxiny, adheziny, imunosupresory a další.

Na základě zkušeností s jinými chorobami způsobenými bakteriálními patogeny bylo uvažováno, že i černý kašel je způsoben jedním sekretovaným toxinem. Za tento toxin byl původně považován pertusový toxin (Pittman, 1984). Od konce 20. století je již známo, že černý kašel je způsoben souhrou a kombinací více faktorů virulence, kterými *B. pertussis* disponuje, ať už jde o sekretované toxiny, různé povrchové struktury apod. (Locht et al., 2001). Ty budou diskutovány v této kapitole především s ohledem na jejich funkci a význam v patogenezi s důrazem na dva nejlépe prostudované toxiny – pertusový toxin (PT) a adenylát cyklázový toxin (ACT).

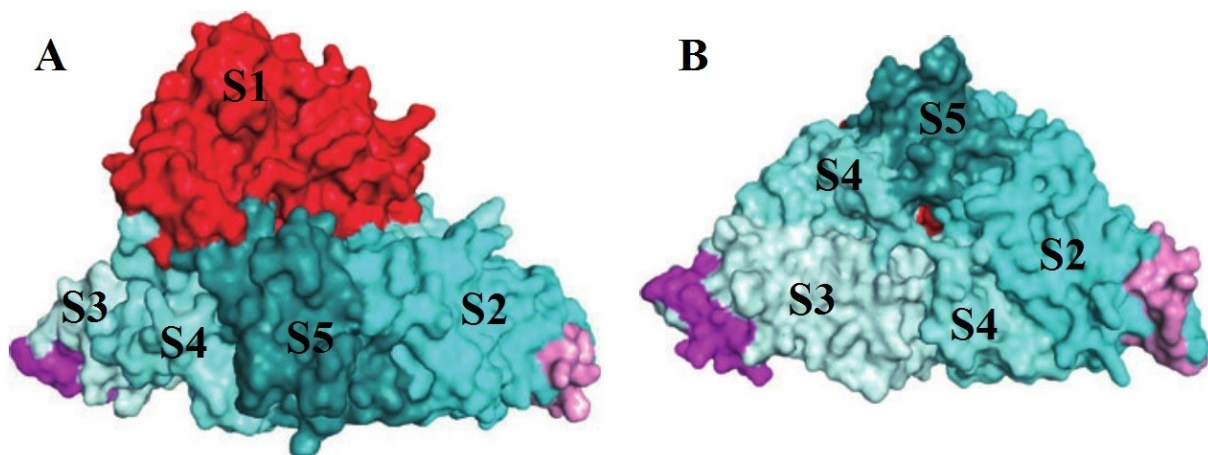
2.1 Toxiny

2.1.1 Pertusový toxin

PT je jedním z prvních objevených, a proto i nejlépe prostudovaných, faktorů virulence *B. pertussis*. Od 40. do 70. let minulého století byly popsány tři nejdůležitější faktory způsobující změny v hostitelském organismu *B. pertussis*. Patří mezi ně lymfocytózu podporující faktor (LPF) způsobující zvýšené množství leukocytů (zejména lymfocytů) v krvi myši po vstříknutí vakcíny připravené z umrtvených buněk *B. pertussis* (Morse, 1965; Morse and Morse, 1976). To bylo později prokázáno i u lidí (Mu et al., 1994). Později byla tomuto faktoru přiřazena také schopnost významně měnit koncentraci intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v lidských lymfocytech (Parker and Morse, 1973). Další faktor, histamin senzibilizující faktor (HSF), způsobuje u myši infikovaných *B. pertussis* zvýšenou citlivost na histamin (Parfentjev and Goodline, 1948). Posledním faktorem je ostrůvky aktivující protein (IAP) způsobující v hostitelském organismu hypoglykémii (Toyota et al., 1978). Až později byly tyto faktory a jejich vliv na hostitelský organismus shrnuty a byly přisouzeny jediné molekule – pertusovému toxinu (Pittman, 1979). Dodnes bylo popsáno mnoho dalších vlivů PT na hostitelský organismus včetně modulace imunitního systému

během raného stadia infekce (Carbonetti et al., 2003), avšak většina z nich byla pozorována pouze na pokusných zvířatech.

V dnešní době je již dobře popsána struktura a molekulární mechanismus účinku PT na lidský organismus. Jedná se o AB₅ toxin velký 105 kDa složený z pěti různých podjednotek S1 – S5 (Obrázek č. 1). Podjednotka S1 tvoří samostatně podjednotku A. Podjednotka B je pentamer tvořený dvěma samostatnými dimery S2-S4 a S3-S4, které spojuje podjednotka S5 (Tamura et al., 1982). Podjednotky pentameru B jsou spojeny do kruhu v pořadí [S2-S4] – [S3-S4] – S5. Podjednotka A je zodpovědná za adenosindifosfát (ADP)-ribosylační katalytické vlastnosti PT (Stein et al., 1994a). Podjednotka B je schopna vazby na povrchové struktury buněk, např. na N-glykosylované proteiny (Armstrong et al., 1988), na glykolipidy obsahující laktózu (Tuomanen et al., 1988) a na většinu glykoproteinů obsahujících kyselinu sialovou, resp. N-acetylneuraminovou (Stein et al., 1994b), což vysvětluje schopnost PT vstupovat do nejrůznějších typů buněk.

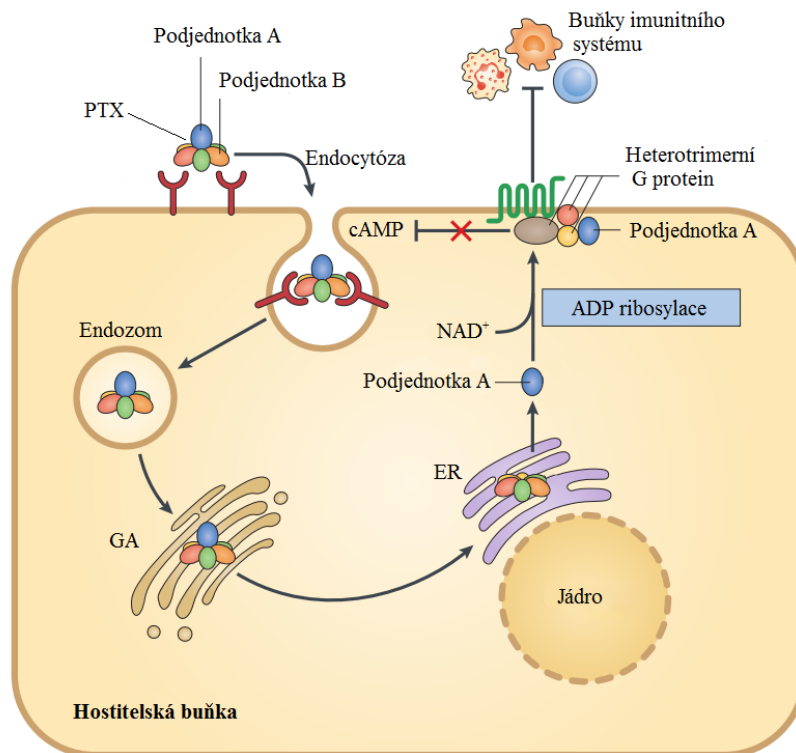


Obrázek č. 1

PT se skládá ze dvou podjednotek – z podjednotky A (červená) a z podjednotky B (tyrkysová). Podjednotka B je kruhový pentamer tvořený dvojicí dimerů S2-S4 a S3-S4 a monomerem S5. Obrázek A ukazuje boční pohled na PT, obrázek B zobrazuje pohled na PT zespodu. Převzato a upraveno (Locht et al., 2011).

PT je z buňky sekretován pomocí sekrečního systému typu 4 kódovaného lokusem *ptI* (*p*ertussis *t*oxin *l*iberation) *d*ownstream od lokusu *ptx* (*p*ertussis *t*oxin). Oba lokusy sdílí společný promotor v rámci jednoho operonu (Kotob et al., 1995). PT je po endocytóze retrográdně dopraven do Golgiho aparátu (GA) a endoplazmatického retikula (ER) (el Baya et al., 1997). Podjednotka A následně opouští ER a v cytosolu hostitelské buňky katalyzuje ADP-ribosylační reakci, při které je ADP-ribóza původem z nikotinamidadeninukleotidu

(NAD) přenášena na α -podjednotku heterotrimerních G proteinů rodiny Gi (Bokoch et al., 1983; Katada and Ui, 1982). Tímto způsobem blokuje PT tvorbu cAMP v hostitelské buňce, což má za následek již diskutované změny chování napadených buněk (Obrázek č. 2).



Obrázek č. 2

PT se váže na povrch buňky a je endocytován. Retrográdním transportem se dostává přes GA do ER, odkud se volná podjednotka A dostává do cytoplazmy, kde katalyzuje ADP-ribosylační reakci na α -podjednotce heterotrimerních G proteinů, které dále nemohou syntetizovat cAMP. Tím je narušena komunikace mezi hostitelskou buňkou a buňkami imunitního systému organismu. Převzato a upraveno (Melvin et al., 2014).

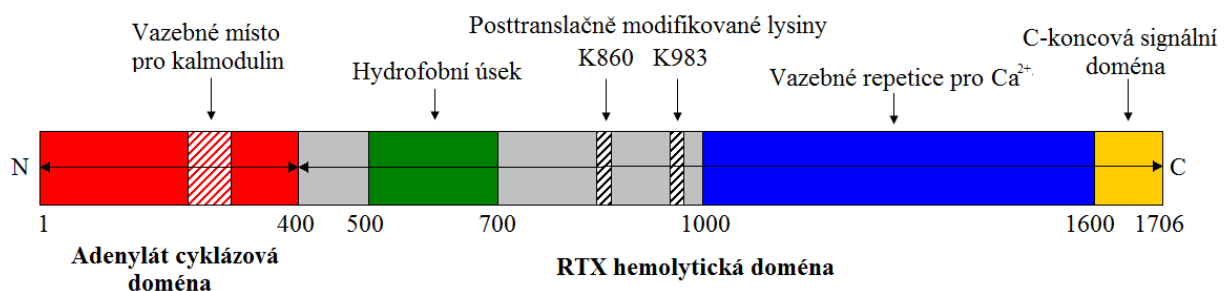
2.1.2 Adenylát cyklázový toxin

ACT je dalším klíčovým faktorem virulence lidského patogenu *B. pertussis* a dalších příbuzných druhů rodu *Bordetella* napadajících savce (Carbonetti, 2010). Jedná se o 177 kDa velký protein skládající se z 1706 aminokyselin kódovaných genem *cyaA* (Gentile et al., 1990; Glaser et al., 1988a). ACT je sekretován pomocí sekrečního systému typu 1 kódovaného geny *cyaBDE* v rámci jednoho operonu (Glaser et al., 1988c). Další gen, *cyaC*, leží *upstream* od zmíněného operonu a je transkribován v opačném směru (Barry et al., 1991). Produkt tohoto genu slouží k posttranslační modifikaci ACT, konkrétně palmitoylaci ϵ -amino skupiny lysinu v pozici 860 a 983 vedoucí ke správné cytotoxické a hemolytické funkci toxinu (Hackett et al., 1994; Masin et al., 2005). ACT je schopen vstupovat do

eukaryotických buněk, kde, jak vyplývá z názvu toxinu, působí na hostitelské buňky adenylát cyklázovou aktivitou, která byla v souvislosti s *B. pertussis* poprvé pozorována v živném mediu po kultivaci tohoto patogenu (Hewlett and Wolff, 1976).

ACT patří do rodiny toxinů RTX (*repeats in toxin*). Skládá se ze dvou funkčních domén (Obrázek č. 3), které plní svou funkci nezávisle na sobě (Sakamoto et al., 1992). První z nich je N-koncová invazivní adenylát cyklázová doména (AC) katalyzující přeměnu ATP na cAMP uvnitř hostitelských buněk. Druhá doména je C-koncová RTX hemolytická doména, která se podílí na tvorbě póru v plazmatické membráně, zajišťuje translokaci AC domény do cytosolu hostitelské buňky, vazbu na cílovou buňku a hemolýzu červených krvinek (Ehrmann et al., 1991; Iwaki et al., 1995). Obě domény jsou spojeny čtyřmi po sobě jdoucími hydrofobními úseky, které se podílí na tvorbě kanálu specifického pro kationty (Benz et al., 1994; Szabo et al., 1994). Na C-konci proteinu se nachází signální sekvence pro sekreci proteinu (Sebo and Ladant, 1993).

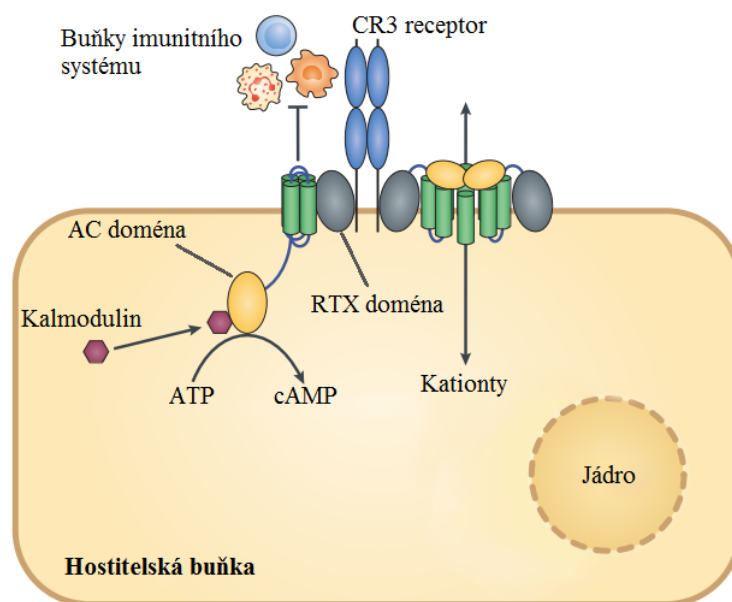
Obě domény potřebují ke své funkci Ca^{2+} ionty. Zatímco AC doména využívá Ca^{2+} ionty vázané kalmodulem běžně dostupným v cytoplazmě hostitelské buňky, RTX doména váže volné Ca^{2+} ionty pomocí motivu „GGXG(N/D)DX(L/I/F)X“ (kde „X“ je libovolná aminokyselina (aa)). Takový motiv je v RTX doméně asi ve 40 – 45 opakováních, což je, až na drobné odchylky, charakteristické pro většinu RTX toxinů (Glaser et al., 1988b; Rose et al., 1995).



Obrázek č. 3

ACT lze rozdělit na N-koncovou AC doménu (1. – 400. aa) a na C-koncovou RTX hemolytickou doménu (400. – 1706. aa). Obě koncové domény spojuje hydrofobní úsek tvořící pór v cytoplazmatické membráně (500. – 700. aa). Obrázek dále znázorňuje místo pro vazbu kalmodulem v AC doméně, pozici posttranslačně modifikovaných molekul lysinu K860 a K983, pozici asi 40 repetitív vázajících Ca^{2+} ionty v RTX hemolytické doméně (1000. – 1600. aa) a C-koncovou signální doménu. Převzato a upraveno (Masin et al., 2015).

ACT se, obdobně jako PT, váže na široké spektrum buněk (Obrázek č. 4). Bylo zjištěno, že se s vysokou afinitou váže na N-glykosylovaný integrinový receptor $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18), resp. receptor komplementu 3 (CR3), který se běžně nachází na povrchu makrofágů, neutrofilů, dendritických buněk a přirozených zabíječů neboli NK buněk (Guermontprez et al., 2001). K takové interakci dochází pouze v případě, kdy předtím proběhnou již zmíněné acylační posttranslační modifikace ACT (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003). Po navázání na cílovou buňku se hydrofobní segment RTX domény zabuduje do cytoplazmatické membrány a AC doména je translokována směrem do cytoplazmy hostitelské buňky, kde po vazbě kalmodulinu spouští svou adenylát cyklázovou aktivitu (Glaser et al., 1988b). Nezávisle na tom může ACT v membráně oligomerizovat a vytvořit již zmiňovaný kanál specifický pro kationty (Iwaki et al., 1995; Vojtova-Vodolanova et al., 2009). Detaily tohoto procesu jsou ale stále neznámé. Je však zřejmé, že celý proces je umožněn díky existenci negativního membránového potenciálu na membráně hostitelské buňky (Otero et al., 1995).



Obrázek č. 4

ACT se váže na integrinový receptor $\alpha_M\beta_2$ (CD11b/CD18, resp. CR3), který se běžně nachází na povrchu některých buněk imunitního systému člověka. Po navázání na cílovou buňku je RTX doména zabudována do cytoplazmatické membrány a AC doména je translokována směrem do cytoplazmy hostitelské buňky, kde po vazbě kalmodulinu spouští svou adenylát cyklázovou aktivitu. Nezávisle na tom může ACT v membráně oligomerizovat a vytvořit kanál specifický pro kationty. Převzato a upraveno (Melvin et al., 2014).

ACT svou činností narušuje funkci imunitního systému v hostitelském organismu (Utsumi et al., 1978), a proto je důležitý pro časnou fázi infekce *B. pertussis*. Mezi funkce ACT patří zamezení tvorby produktů oxidačního vzplanutí u neutrofilů a makrofágů (Confer and Eaton,

1982), blokace aktivace a chemotaxe T-lymfocytů (Paccani et al., 2008) a znemožnění makrofágům fagocytovat dočasnou blokací RhoA GTPázy, což má za následek defosforylaci kofilinu a přestavbu aktinového cytoskeletu (Kamanova et al., 2008).

2.1.3 Dermonekrotický toxin

Dermonekrotický toxin (DNT), dříve tzv. termolabilní toxin, též zvaný letální toxin, objevili v roce 1909 Bordet a Gengou (Bordet and Gengou, 1909; cit. dle Cowell et al., 1979). Název toxinu je odvozený od nekrotických lézí, které vznikají po jeho vstříknutí pod kůži pokusného zvířete (Cowell et al., 1979).

DNT je jednoduchý 160,6 kDa velký AB toxin s enzymatickou aktivitou na C-konci. (Kashimoto et al., 1999). Svou funkci ztrácí po inkubaci již při 56 °C po dobu 60 minut (Zhang and Sekura, 1991). Gen *dnt* se téměř nezměněný vyskytuje u *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* i *B. parapertussis*. Na rozdíl od *B. bronchiseptica*, u *B. pertussis* nemá v myším modelu žádný vliv ani na virulenci, ani na letalitu (Weiss and Goodwin, 1989). Přestože je známo, že DNT může v *in vitro* podmínkách svou transglutaminázovou aktivitou spustit Rho GTPázu a ovlivňovat tak cytoskelet hostitelských buněk (Schmidt et al., 1999), není dodnes jisté, zda má DNT význam pro virulenci a patogenezí *B. pertussis* v člověku.

2.1.4 Tracheální cytotoxin

Tracheální cytotoxin (TCT) je 921 Da velká molekula odvozená od peptidoglykanu, která vzniká během přestavby buněčné stěny *B. pertussis* (Cookson et al., 1989). V *in vitro* podmínkách lze po kultivaci TCT s buňkami respiračního epitelu křečka pozorovat podobné poškození tkáně, které vzniká při infekci *B. pertussis* u člověka (Goldman et al., 1982). To je způsobeno stimulací prozánětlivých cytokinů, především interleukinu (IL) 1, což uvnitř hostitelských buněk vede k nadprodukci syntázy oxidu dusnatého a poškození celého respiračního epitelu (Flak and Goldman, 1999; Flak et al., 2000; Heiss et al., 1993).

2.2 Adheziny

Pro virulenci a patogenezí *B. pertussis* mají velký význam struktury nacházející se na povrchu jejích buněk. Mezi nejdůležitější z nich patří adheziny, struktury sloužící k navázání fyzického kontaktu bakteriální buňky s buňkou hostitelskou. V případě *B. pertussis* se jedná především o filamentózní hemaglutinin (FHA), pertaktin (PRN) a fimbrie. Všechny tyto struktury umožňují *B. pertussis* přilnout k různým typům eukaryotických buněk včetně

respiračních buněk s řasinkami (Melvin et al., 2014). Zajímavé je, že v případě některých klinických izolátů *B. pertussis* získaných v posledních letech bylo zjištěno, že PRN neprodukuje. Důvodem může být selekce způsobená používáním vícesložkové pertusové vakcíny (*acellular pertussis vaccine*, aP vakcína), která PRN obsahuje a vyvolává produkci protilátek proti PRN v hostitelském organismu (Pawloski et al., 2014). Nezbytnost těchto povrchových proteinů pro patogenezi *B. pertussis* tak zůstává otázkou.

2.3 Sekreční systém typu 3

Sekreční systém typu 3 (T3SS) je v poslední době považován za jeden z řady faktorů virulence bakterie *B. pertussis*. Větší pozornost je mu věnována v samostatné kapitole č. 4 – Sekreční systém typu 3.

3 Regulace virulence *B. pertussis* pomocí BvgAS

V roce 1931 Leslie a Gardner pozorovali na základě aglutinace na krevních agarrech čtyři různé fáze růstu *B. pertussis* (Leslie and Gardner, 1931). Později, v roce 1960, Lacey popsal pouze tři fáze – „X, C a I“, dnes známé jako fáze Bvg⁺, Bvg⁻ a Bvgⁱ (v tomto pořadí), mezi kterými může tentýž klon *B. pertussis* přecházet v závislosti na podmínkách, ve kterých je kultivován, resp. ve kterých žije *in vivo*. Rozdíly kultivace v Laceyho pokusech spočívaly především v obsahu iontů různých solí v médiu a v různé teplotě kultivace. Kultura ve fázi „C“, resp. Bvg⁻, byla na rozdíl od fáze „X“, resp. Bvg⁺, popsána jako fáze, ve které je bakterie neschopná aglutinace a hemolýzy červených krvinek. Fáze „I“, resp. Bvgⁱ, byla popsána jako stav mezi fázemi „X“ a „C“ (Lacey, 1960). Později byl jednoduchou mutací pomocí transpozonu Tn5 vytvořen mutant *B. pertussis* neschopný produkovat většinu známých faktorů virulence, což napovědělo, že je na chromozomu přítomna oblast zajišťující regulaci exprese faktorů virulence. Tento lokus, dříve známý jako *vir* (*virulent phase*), nese dnes název *bvg* (*Bordetella virulence gene*) a kóduje dvousložkový systém signální transdukce zvaný BvgAS (Weiss et al., 1983).

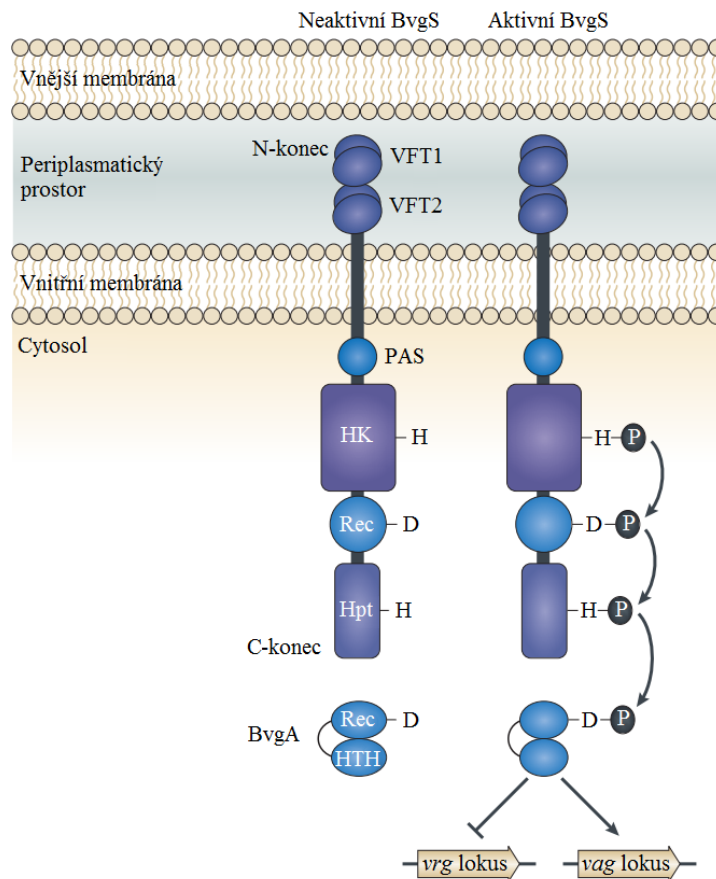
V dnešní době je již známo, že BvgAS reguluje stovky genů zodpovědných za produkci většiny faktorů virulence včetně T3SS, rozdílnou fyziologii bakterie nebo produkci dalších regulačních systémů (Cummings et al., 2006; Yuk et al., 1998). Těmto genům se souhrnně říká geny *vag* (*virulence-activated genes*). Na lokusu *bvg* se *downstream* od genů *bvgAS* nachází gen *bvgR* kódující 32 kDa velký protein, který způsobuje utlumení aktivity genů, které se nepodílejí na virulenci *B. pertussis*. Jde o tzv. geny *vrg* (*virulence-repressed genes*). Gen *bvgR* je aktivován na úrovni transkripce v závislosti na aktivitě genů *bvgAS* v pozitivním smyslu. K transkripci *bvgR* je nezbytná vazba fosforylovaného BvgA na promotor tohoto genu (Merkel et al., 1998; Merkel et al., 2003).

3.1 Složení BvgAS

Jak již název napovídá, dvousložkový systém BvgAS se skládá ze dvou proteinů, BvgA a BvgS (Obrázek č. 5).

BvgS (dříve označovaný jako BvgB a BvgC) je 135 kDa velký transmembránový protein. Svou N-koncovou částí orientovanou do periplasmatického prostoru dokáže snímat signály z okolí (Stibitz and Yang, 1991) pomocí dvou *Venus flytrap* domén (VFT) VFT1 a VFT2

(Herrou et al., 2010). Nejnovější výzkum ukázal, že pro funkci těchto VFT domén a následnou aktivaci systému BvgAS je nezbytný prolin v pozici 319 (Hiramatsu et al., 2017). Směrem od N-konce k C-konci následuje doména procházející membránou, dále *Per/Arnt/Sim* doména (PAS), (pozn.: jedná se o proteinový motiv), histidin-kinázová doména (HK), přijímací doména (Rec) a nakonec histidin-fosfotransferázová doména (Hpt). Cytoplazmatická část BvgS vystupuje jako heterodimer (Dupre et al., 2015; Dupre et al., 2013; Uhl and Miller, 1994).



Obrázek č. 5

BvgS prochází C-koncem do periplasmatického prostoru, kde se nachází receptory VFT1 a VFT2. V cytosolu se nachází PAS doména, HK doména, Rec doména a Hpt doména. Po aktivaci BvgS dochází k autofosforylaci HK domény BvgS a následnému přenosu fosfátu přes Rec a Hpt domény až na cytosolický BvgA, který po aktivaci dimerizuje (není znázorněno na obrázku) a funguje jako faktor transkripce genů z lokusu *vag*. (Pozn.: H = histidin, D = aspartát). Převzato a upraveno (Melvin et al., 2014).

BvgA je 23 kDa velký protein nacházející se v cytoplazmě *B. pertussis*. Jeho N-koncová Rec doména je schopná vázat fosfát, zatímco C-koncová *helix-turn-helix* doména (HTH) je schopná vázat se na DNA právě pomocí motivu HTH (Arico et al., 1989). Bylo zjištěno, že BvgA funguje jako homodimer a bylo též pozorováno, že po přidání $MgSO_4$ do media není

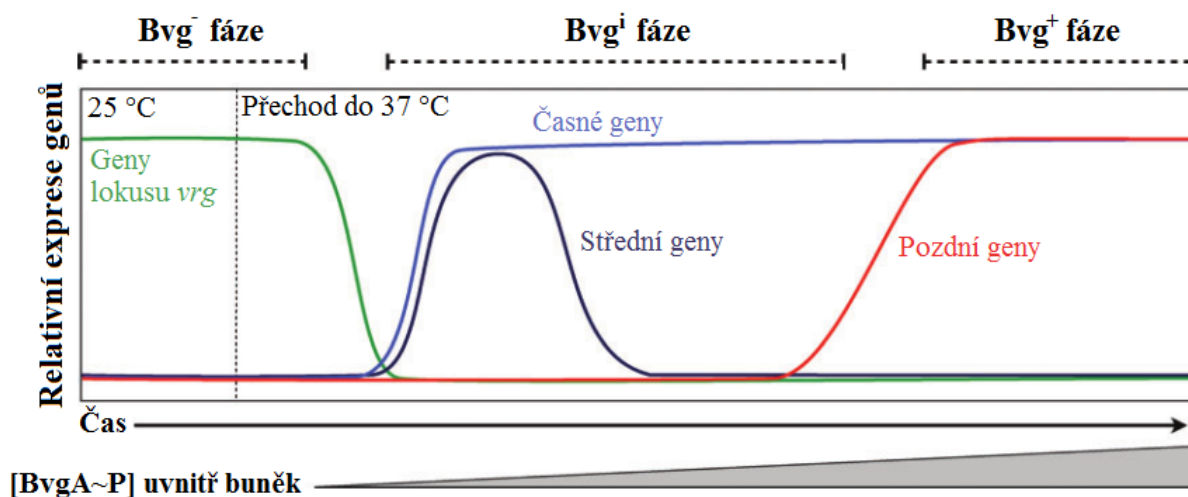
detekován dimer BvgA, ale pouze monomer (Perraud et al., 2000; Scarlato et al., 1990). Podmínky tvorby dimeru nejsou dodnes přesně objasněny.

3.2 Mechanismus regulace pomocí BvgAS

Po vazbě signálu pomocí VFT domén proteinu BvgS v periplasmatickém prostoru dochází k postupnému přenosu tohoto signálu do cytosolu (Obrázek č. 5). Nejprve dochází k mechanické změně konformace VFT domén, která vyvolá změnu konformace i na PAS doméně. Funkcí PAS domény je zachovat signál získaný v periplasmatickém prostoru pomocí VFT domén a přenést tento mechanický signál na další domény směrem do cytosolu (Dupre et al., 2013). Dále dochází ke změně konformace HK domény, která je poté schopna autofosforylace na histidinu v pozici 729. Odtud je γ -fosfát původem z ATP postupně přenesen na aspartát v pozici 1023 na Rec doméně a dále na histidin v pozici 1172 na Hpt doméně. Nakonec je fosfát přenesen na solubilní BvgA, konkrétně na aspartát v pozici 54 (Uhl and Miller, 1994, 1996a, b).

Pokud nedojde k navázání fosfátu na BvgA, HTH doména se nemůže vázat na DNA, protože jí v tom stericky brání neaktivní, resp. nefosforylovaná N-koncová Rec doména. Tento mechanismus byl původně prokázán u příbuzného proteinu NarL izolovaného z *E. coli* (Baikalov et al., 1996; Zhang et al., 2003). Po aktivaci funguje fosforylovaný BvgA (BvgA~P) jako regulační faktor transkripce různých genů, zejména genů zodpovědných za virulenci (mimo jiné pozitivně autoreguluje i produkci sebe samého). Váže se na DNA na specifickou sekvenci, např. „TTTCCTA“ v případě genu pro FHA (Roy and Falkow, 1991; Roy et al., 1989). Sekvence „TTT(C/G)NTA“ (kde N znamená libovolnou bázi) byla později ukázána jako optimální sekvence pro vazbu BvgA~P na DNA (Boucher et al., 2001; Deora et al., 2001). BvgA~P přímo zprostředkovává vazbu α -podjednotky C-koncové domény RNA polymerázy v místě promotoru daného genu (Boucher et al., 2003).

V závislosti na koncentraci cytosolického BvgA~P jsou s rozdílnou aktivitou přepisovány geny ze čtyř různých tříd, které zodpovídají za aktuální fenotyp *B. pertussis*. Tímto fenotypem jsou myšleny již zmíněné fáze Bvg⁺, Bvgⁱ a Bvg⁻ (Obrázek č. 6). Přestože jsou dnes známé faktory, které systém BvgAS vypínají (např. MgSO₄ nebo kyselina nikotinová), není kromě teploty 37 °C známý jiný faktor, který ho zapíná (Herrou et al., 2010).



Obrázek č. 6

Po spuštění systému BvgAS pomocí teploty 37 °C dochází k přechodu buněk *B. pertussis* z fáze Bvg⁻ do fáze Bvg⁺. Na molekulární úrovni dochází k současnému umlčení genů *vrg* a rovněž k aktivaci genů *vag* zodpovědných za virulenci *B. pertussis*. Geny *vag* se dělí na časné geny, střední geny a pozdní geny. Exprese pozdních genů znamená přechod z fáze Bvg⁺ do fáze Bvg⁺. Převzato a upraveno (Decker et al., 2012).

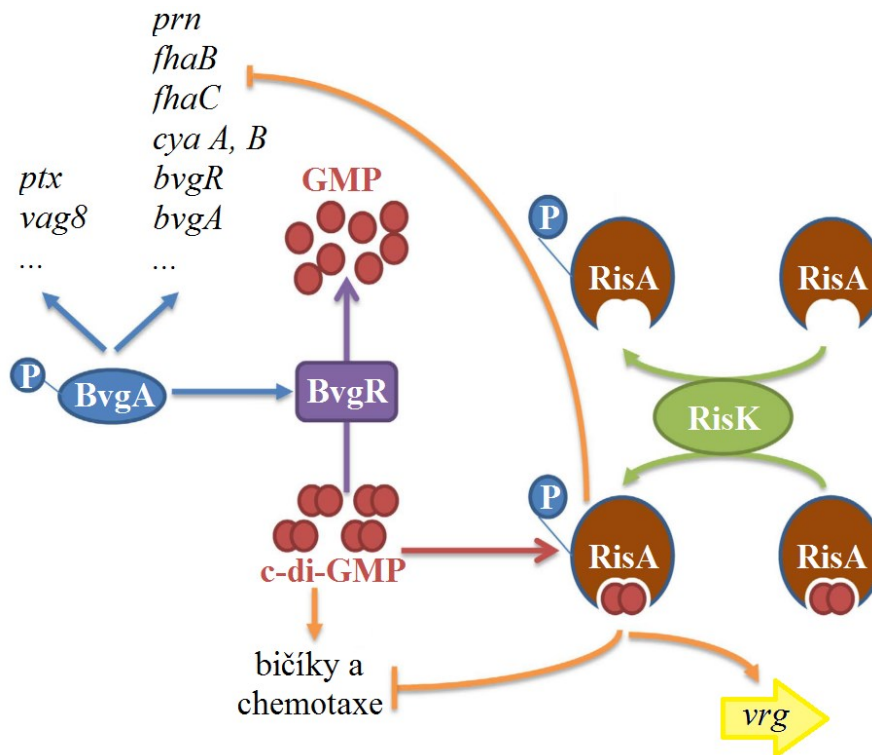
3.3 Regulace virulence *B. pertussis* pomocí systému RisAK

Přestože BvgAS hraje významnou roli v regulaci virulence *B. pertussis*, bylo prokázáno, že není jediným regulačním systémem, ale součástí sítě regulačních systémů, které se vzájemně ovlivňují. Dalším takovým analogickým systémem je RisAS, který je kódován lokusem *ris* (*regulator of intracellular stress response*). Opět se jedná o dvousložkový systém, který hraje roli v regulaci exprese genů *vrg*. Po vzoru systému BvgAS plní protein RisA funkci efektoru a protein RisS funkci senzoru. Význam systému RisAS byl pozorován u *B. bronchiseptica* na vlivu oxidativního stresu na přežití uvnitř hostitelských buněk, chemotaxi, resp. tvorbu bičíků, nebo na regulaci množství železa v cytosolu. RisAS navíc reguluje mnoho dalších genů, jejichž funkce zatím není známa (Jungnitz et al., 1998).

Na rozdíl od *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis* nemá RisS u *B. pertussis* funkci membránového senzoru. Gen *risS* je v *B. pertussis* považován za pseudogen a funkci RisA nahrazuje kináza RisK. Význam regulonu RisA v patogenezi *B. pertussis* však ještě nebyl řádně prozkoumán (Coutte et al., 2016; Stenson et al., 2005).

Jak již bylo zmíněno, v regulaci exprese genů *vrg* hrají významnou roli proteiny BvgR a RisA. Nejnovější výzkum ukázal vzájemnou souhru v regulaci zajištěné oběma proteiny. Ve fázi Bvg⁺ je aktivní protein BvgR, který svou aktivitou přeměňuje cyklický diguanylát

(c-di-GMP) na GMP. Pokud je však BvgA neaktivní, fosforylovaný RisA způsobuje po navázání c-di-GMP aktivaci genů *vrg* a současně blokaci některých genů *vag*, mimo jiné *bvgA* a *bvgR*, ale i genů týkajících se chemotaxe a tvorby bičíků (Obrázek č. 7). RisA se může v závislosti na fosforylaci pomocí RisK a vazby c-di-GMP vyskytovat ve čtyřech různých podobách, kdy v každé z nich reguluje jinou skupinu genů (Coutte et al., 2016).



Obrázek č. 7

Aktivovaný BvgA podporuje expresi genů *vag* včetně *bvgR*. BvgR štěpením c-di-GMP brání fosforylovanému RisA v aktivaci genů *vrg* a současně mu brání v blokaci některých genů *vag* a genů týkajících se chemotaxe a tvorby bičíků. Aktivní BvgAS systém je tak nadřazený systému RisAK. Převzato a upraveno (Coutte et al., 2016).

4 Sekreční systém typu 3

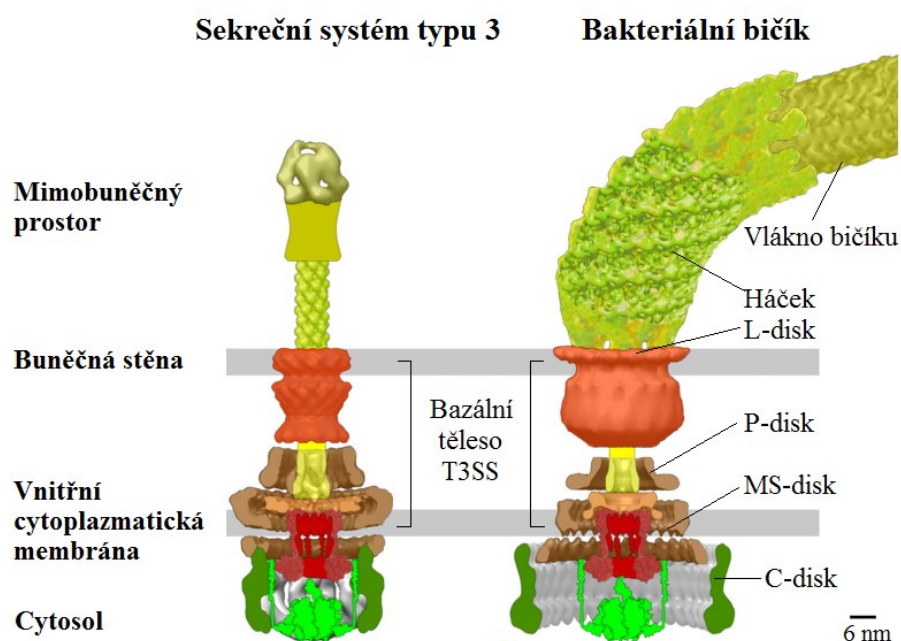
Sekrece proteinů je jedním z důležitých procesů, který slouží mikroorganismům k transportu proteinů z cytoplazmy do vnějšího prostředí, do cytoplazmatické membrány jiné buňky nebo do jejího cytosolu. Sekretovány mohou být jak membránové proteiny, tak proteiny vykonávající svou funkci mimo buňku. K sekreci proteinů z cytoplazmy bakterií slouží specializované sekreční systémy. Dodnes bylo u bakterií popsáno celkem sedm různých typů sekrečních systémů. Některé z nich jsou v evoluci pevně konzervovány a lze je nalézt takřka v každé bakteriální buňce, jiné jsou naopak vzácné a specializují se na sekreci jen několika málo konkrétních proteinů. Sekreční systémy se od sebe liší svou strukturou a mechanismem transportu proteinů. Struktura aparátu se odvíjí od stavby buněčné stěny a cytoplazmatické membrány bakterie a také od místa určení, kam má být daný protein sekretován. Některé sekreční systémy jsou pro bakterie esenciální a zajišťují životně důležité funkce, jiné mohou svému nositeli přinášet určitou výhodu, jako např. při symbióze nebo při obsazování dané ekologické niky, resp. kolonizaci hostitele v případě patogenních bakterií apod. Patogenní mikroorganismy mohou tímto způsobem sekretovat faktory virulence, kterými mohou např. navodit změny chování imunitního systému dle aktuálních potřeb. Mezi takovéto sekreční systémy patří i sekreční systém typu 3 (T3SS) (Green and Mecsas, 2016).

4.1 Charakteristika sekrece typu 3

Sekrece typu 3 (T3S) je jednou z cest, kterou může bakterie sekretovat proteiny ze svého cytosolu do vnějšího prostředí. T3S je bakteriemi běžně využívána ve dvou na sobě nezávislých procesech.

Jedním ze zmíněných procesů je výstavba bakteriálního bičíku. Dnes je již obecně známo, že bakteriální bičík má dvě základní strukturní části. Jednou z nich je bazální těleso, které zajišťuje ukotvení bičíku v membráně, jeho výstavbu a následnou rotaci. V případě Gram-negativních bakterií je bičík kotven pomocí proteinových disků do vnitřní cytoplazmatické membrány (C-disk a MS-disk) a do buněčné stěny (P-disk a L-disk). Všechny tyto disky jsou propojeny dutým kanálem, který ústí na povrch bakterie tzv. háčkem. T3SS, který je součástí bazálního tělesa, sekretuje molekuly flagelinu, které polymerizují a vytváří druhou základní část celé struktury – samotné vlákno bičíku (Obrázek č. 8), (Macnab, 2003). Bylo však prokázáno, že pomocí T3SS spojeného se strukturou bičíku může bakterie sekretovat i proteiny, které se stavbou bičíku ani jeho funkcí nijak nespojují (Young and Young, 2002).

Druhým procesem, během kterého se uplatňuje T3S, je sekrece efektorových proteinů přímo do cytosolu eukaryotických buněk v rámci patogeneze či symbiózy některých Gram-negativních bakterií. T3SS byl v tomto kontextu objeven teprve v 90. letech 20. století. Svou strukturou a mechanismem sekrece proteinů se velice podobá T3SS spojeného s mašinerií bakteriálního bičíku (Obrázek č. 8). Mezi bakterie využívající T3SS v patogenezi patří rody *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Chlamydia*, či *Pseudomonas*, u kterých byl T3SS doposud studován nejintenzivněji. T3SS disponují i bakterie rodu *Bordetella*. T3SS se také nachází u bakterií patogenních pro rostliny (Hueck, 1998; Michiels et al., 1991; Salmond and Reeves, 1993).



Obrázek č. 8

Obrázek znázorňuje strukturální podobnost T3SS a bakteriálního bičíku ukotveného v membráně Gram-negativní bakterie. Převzato a upraveno (Portaliou et al., 2016).

Souvislost mezi oběma zmíněnými procesy začala být pozorována na přelomu 20. a 21. století, kdy byly u některých Gram-negativních patogenních bakterií objeveny geny nutné pro sekreci efektorových proteinů do eukaryotických buněk. U těchto genů byla současně pozorována příbuznost s geny podílejícími se na výstavbě bakteriálních bičíků (Collazo and Galan, 1996; Galan et al., 1992; Michiels et al., 1991). U některých strukturálních proteinů bazálního tělesa T3SS byly také objeveny homologie se strukturálními proteiny ATP syntázy (Ibuki et al., 2011; Pallen et al., 2006).

Pro přehlednost bude T3SS dále v textu vždy chápán pouze jako faktor virulence Gram-negativních bakterií, resp. jako molekulární komplex zajišťující sekreci efektorových molekul do cytosolu eukaryotických buněk.

4.2 Původ T3SS v evoluci

Moderní molekulární fylogenetické analýzy porovnávající příbuznost strukturních proteinů T3SS napomohly rozdělit bakterie nesoucí geny pro T3SS do sedmi rodin. Takto získané fylogenetické stromy však nekorelují s evoluční příbuzností sekvencí 16S rRNA těchto bakterií. Zajímavé je, že fylogenetické stromy získané na základě podobnosti strukturních proteinů T3SS jsou stejné nezávisle na tom, který konkrétní protein byl pro analýzu použit. Fylogenetické analýzy také nasvědčují, že T3SS je struktura odvozená od T3SS nacházeného v bazálním tělese bičíku, a že od oddělení těchto dvou struktur už dále nedošlo k vzájemnému ovlivnění jejich vývoje (Gophna et al., 2003; Nguyen et al., 2000). Bylo také prokázáno, že jeden bakteriální kmen může nést geny pro více druhů T3SS najednou (Shea et al., 1996). Všechny tyto informace nasvědčují, že se geny kódující T3SS vyvinuly jako relativně konzervované genetické struktury a jsou předávány mezi mikroorganismy mechanismem horizontálního přenosu genetické informace. Tyto geny jsou zpravidla organizovány v rámci jednoho lokusu buď na mobilním ostrůvku patogenity na chromozomu, nebo na plazmidu (Troisfontaines and Cornelis, 2005).

U bakterií rodu *Bordetella* byl nalezen pouze jeden T3SS související s virulencí. Tento T3SS se řadí do rodiny *Ysc* pojmenované podle bakteriálního rodu *Yersinia* (Gophna et al., 2003).

4.3 Struktura a výstavba T3SS

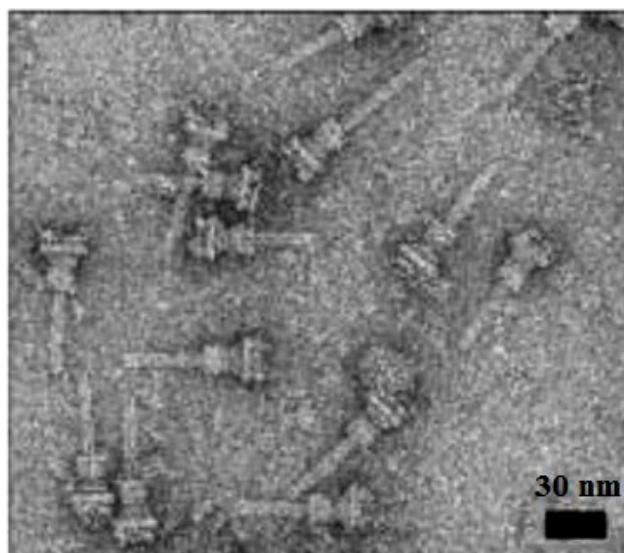
T3SS patří mezi nejsložitější sekreční systémy nacházejících se u bakterií. Jak již bylo zmíněno, nachází se u Gram-negativních bakterií a zajišťuje sekreci efektorových proteinů do membrány, či cytoplazmy eukaryotické hostitelské buňky. Co do struktury a mechanismu to znamená, že celý aparát musí překonat vlastní vnitřní cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu, a navíc musí překonat i cytoplazmatickou membránu cílové buňky.

K přiblížení struktury významně napomohly snímky celého komplexu T3SS pořízené pomocí elektronové mikroskopie (Obrázek č. 9). T3SS je díky svému tvaru i mechanickému principu fungování přirovnáván k injekční stříkačce a celá mašinerie proto bývá někdy označována jako tzv. injektozom (Kubori et al., 1998; Marlovits et al., 2004). Celý T3SS je velký asi

3,5 MDa a lze jej rozdělit na tři hlavní části – transmembránové bazální těleso, tzv. jehlu vyčnívající ven z bakteriální buňky a translokon, který vytváří pór v membráně hostitelské buňky. Celý tento komplex tvoří jakýsi můstek mezi cytosolem bakterie a cytosolem hostitelské buňky.

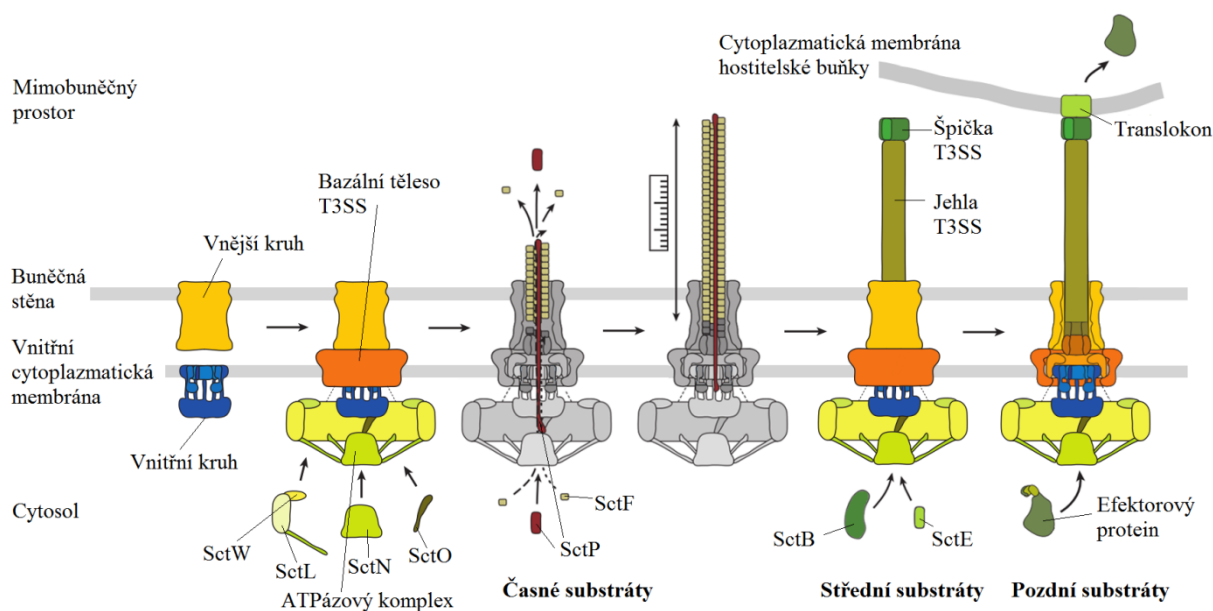
Výstavba T3SS (Obrázek č. 10) začíná translokací disků tvořících bazální těleso do vnitřní cytoplazmatické membrány a do buněčné stěny. Translokace obou těchto částí probíhá nezávisle na sobě, ale ihned po složení v membráně jsou obě části spojeny dohromady a utváří stabilní strukturu (Diepold et al., 2010). Bazální těleso T3SS poté neslouží pouze k sekreci efektorových proteinů, ale také k sekreci strukturních proteinů tvořících vnější část T3SS – jehlu a translokon. Jehla T3SS je rovná, dutá struktura navazující na bazální těleso. Vzniká polymerací asi 6 kDa velkého proteinu ¹SctF (Hoiczky and Blobel, 2001). Jehla T3SS běžně dosahuje délky několika desítek nanometrů. Přestože je mechanismus regulace délky dodnes nejasný, bylo prokázáno, že protein SctP pravděpodobně funguje jako tzv. molekulární pravítko zajišťující výstavbu jehly T3SS do požadované velikosti. Bylo také experimentálně prokázáno, že změna velikosti proteinu SctP ovlivní i velikost jehly T3SS. Studie zabývající se velikostí jehly T3SS navíc prokázaly, že zkrácení i prodloužení této části T3SS *in vitro* podmínkách narušuje virulenci pozorovaného patogenu. Protein SctP patří mezi tzv. časné substráty sekretované T3SS a pravděpodobně v okamžiku, kdy jehla T3SS dosáhne požadované velikosti, zajišťuje tento protein zahájení sekrece tzv. středních substrátů, které se podílejí na výstavbě špičky jehly a translokonu. Po dosažení požadované velikosti jehly bývá její špička opatřena proteinem, který zajišťuje prvotní kontakt s hostitelskou cytoplazmatickou membránou a neznámým způsobem podněcuje sekreci a tvorbu translokonu (Mueller et al., 2005). Translokon je nezbytný k zajištění sekrece efektorových proteinů do hostitelské buňky. Skládá se z proteinů SctB a SctE a je vystavován skrze T3SS na špičce jehly (Neyt and Cornelis, 1999). Sekrece tzv. pozdních substrátů, tzn. samotných efektorových proteinů, následuje ihned po dokončení výstavby translokonu (Journet et al., 2003; Kubori et al., 1998; Lefebvre and Galan, 2014; Mota et al., 2005).

¹Z důvodu zlepšení orientace mezi homologickými proteiny T3SS napříč bakteriálními druhy v posledních letech roste tendence pojmenovávat homologické proteiny jednotnými zkratkami. Pro tento účel začala být používána zkratka SctX (*secretion and cellular translocation*), kde X značí libovolné písmeno, popř. číslo označující konkrétní protein. Pro T3SS vyskytující se v bazálním tělese bíčičku existuje analogicky zkratka FliX (Hueck, 1998; Portaliou et al., 2016).



Obrázek č. 9

T3SS vyizolovaný z bakterie *Salmonella typhimurium*. Snímek pořízený pomocí elektronové mikroskopie (Marlovits et al., 2004).



Obrázek č. 10

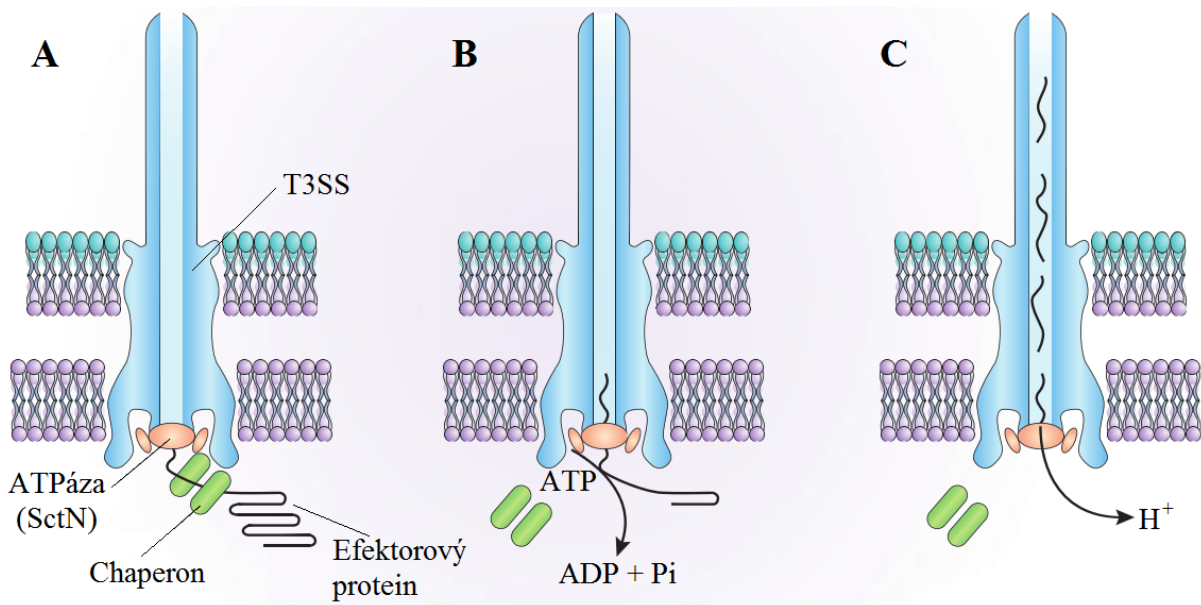
Výstavba T3SS začíná translokací transmembránových disků do vnitřní cytoplazmatické membrány a buněčné stěny nezávisle na sobě. Po spojení obou transmembránových částí je vystavěno celé bazální těleso T3SS. Kompletní bazální těleso T3SS poté začíná sekretovat časné substráty, mezi které patří protein SctF tvořící jehlu T3SS a protein SctP zodpovědný za velikost jehly T3SS. Po dosažení požadované velikosti jehly T3SS jsou sekretovány střední substráty zodpovědné za tvorbu špičky jehly a po kontaktu s membránou hostitelské buňky i za tvorbu translokonu. Po vytvoření translokonu jsou sekretovány pozdní substráty, resp. efektorové proteiny. Převzato a upraveno (Galan et al., 2014).

4.4 Mechanismus sekrece pomocí T3SS

Vzhledem k tomu, že šířka jehly T3SS nepřesahuje 30 Å (Marlovits et al., 2004), je zřejmé, že proteiny sekretované T3SS nemohou být v nativní konformaci, ale musí být alespoň částečně rozbalené. Nedávné výzkumy nasvědčují tomu, že v tomto kontextu hrají v sekreci T3SS důležitou roli cytosolické chaperony a ATPáza přítomná v bazálním tělese T3SS. Chaperony jsou malé proteiny napomáhající udržet protein určený k sekreci v nesbaleném stavu a dopravit ho do příslušného sekrečního systému (Lee and Galan, 2004). V bazálním tělese T3SS poté pravděpodobně dochází k předání sekretovaného proteinu do jádra sekrečního aparátu (Abrusci et al., 2013; Ibuki et al., 2011; Pallen et al., 2006).

V otázce signalizace a směřování konkrétních proteinů do T3SS byly společně s chaperony pozorovány také N-koncové signální sekvence sekretovaných proteinů. Dodnes však nebyla na N-konci efektorových proteinů sekretovaných pomocí T3SS rozpoznána žádná jednoznačná homologická sekvence nebo struktura, která by zajišťovala sekreci, nebo podle které by bylo dokonce možné předpovídat, zda je daný protein sekretován T3SS, či nikoliv (Galan et al., 2014).

T3SS pro svou funkci vyžaduje zdroj energie. I v tomto tématu však stále zbývá mnoho otevřených otázek. Na základě evoluční příbuznosti T3SS s bakteriálním bičíkem bylo uvažováno, že by sekrece proteinů pomocí T3SS byla poháněna na principu proteinů MotA a MotB, které pohání rotaci bičíku. Tato hypotéza však byla vyvrácena (Wilharm et al., 2004). Na druhou stranu byly nalezeny důkazy, že T3SS pro svou funkci vyžaduje energii jak v podobě ATP, tak v podobě protonmotivní síly. Předpokládaný model (Obrázek č. 11) uvažuje využití energie získané hydrolyzou ATP k uvolnění efektorového proteinu určeného k sekreci z komplexu s chaperonem a přenesení v nesbaleném stavu do mašinerie T3SS. K samotné translokaci proteinu do cytoplazmy hostitelské buňky pravděpodobně slouží protonmotivní síla (Galan, 2008).

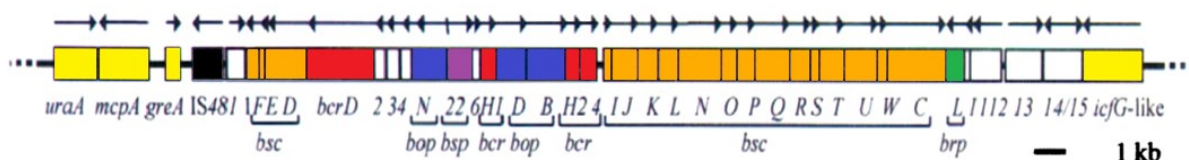


Obrázek č. 11

Efektorový protein je v komplexu s chaperonem dopraven k bazálnímu tělesu T3SS, kde je za spotřeby ATP z tohoto komplexu uvolněn a je připraven k sekreci. Samotnou sekreci efektorového proteinu skrze T3SS pravděpodobně pohání protonmotivní síla. Převzato a upraveno (Galan, 2008).

4.5 Význam T3SS v patogenezi *B. pertussis*

Přestože doposud nebyly pořízeny snímky T3SS izolovaného z bakterie rodu *Bordetella*, na základě homologií strukturních proteinů s T3SS jiných bakterií lze předpokládat shodný tvar, resp. proteinové složení i mechanismus celého komplexu. Výzkumy zaměřené na lokus *bsc* kódující T3SS u *B. pertussis* předpovídají, že celý sekreční komplex je kódován asi 30 geny, mezi které patří jak strukturní geny, tak geny pro chaperony a některé sekretované molekuly. U některých otevřených čtecích rámců tohoto lokusu dodnes není známa jejich funkce. Pořadí genů na lokusu *bsc* je však dobře známo (Obrázek č. 12) (Fauconnier et al., 2001).



Obrázek č. 12

Geny lokusu *bsc* jsou na schématu barevně rozděleny podle své funkce: *bsc* – oranžová, *bop* – modrá, *bsp22* – fialová, *bcr* – červená, *brpL* – zelená, otevřené čtecí rámce neznámé funkce – bílá, *housekeeping* geny – žlutá. Inserční sekvence 481 je vyznačena černě. Šipky naznačují směr transkripce genů. Převzato a upraveno (Fauconnier et al., 2001).

Jak již bylo zmíněno, řada proteinů souvisejících s T3SS má své sekvenční homology napříč bakteriálními druhy nesoucími geny pro T3SS (Tabulka č. 1). T3SS rodu *Bordetella* je nejvíce příbuzný rodu *Yersinia*, u kterého je T3SS relativně dobře prozkoumaný (Gophna et al., 2003).

Nomenklatura proteinů T3SS			Funkce proteinu
<i>Bordetella</i>	<i>Yersinia</i>	Sct	
BopB	YopB	SctE	Tvorba translokonu
BopN	YopN	SctW	Regulace sekrece
BscF	YscF	SctF	Struktura jehly
BscLNO	YscLNO	SctLNO	ATPázový komplex
–	LcrV	SctA	Špička jehly
Bsp22	–	–	
BteA	–	–	Efektorový protein

Tabulka č. 1

V tabulce jsou uvedeny některé z významných proteinů T3SS, jejich funkce a název z pohledu různých nomenklatur, které si vzájemně odpovídají dle homologií jejich sekvencí aa. Kompletní seznamy proteinů T3SS jsou dostupné v příslušné literatuře (Fauconnier et al., 2001; Portaliou et al., 2016).

Přestože strukturní proteiny T3SS jsou v evoluci konzervovány, efektorové proteiny se mezi druhy bakterií významně liší v závislosti na konkrétních potřebách daného patogenu. Efektorové proteiny ani nemusí být součástí lokusu, kde je kódován T3SS. Stejně tak je tomu u *B. pertussis*, kde je doposud jediný známý efektor, BteA, kódován asi 2,5 Mb od lokusu *bsc* (Panina et al., 2005).

Význam T3SS ve virulenci bakterií rodu *Bordetella* byl objeven teprve nedávno. V počátku výzkumu byl pozorován vliv T3SS na imunitní odpověď hostitelského organismu během infekce dýchacího ústrojí myši bakteriemi *B. bronchiseptica*. Myš infikovaná divokým kmenem *B. bronchiseptica* vykazovala sníženou produkci protilátek proti *B. bronchiseptica* oproti myším infikovaným kmeny *B. bronchiseptica* neschopným sekrece faktorů T3SS. Zároveň byl pozorován význam T3SS v zamezení translokace nukleárního faktoru κ B do jádra buněk imunitního systému a v navození apoptózy fagocytujících buněk (Legarda et al.,

2005; Yuk et al., 2000). Potlačení imunitní odpovědi v průběhu infekce je pravděpodobně zprostředkováno navozením změny chování antigen prezentujících buněk, které po setkání s patogenem a po následné migraci do sekundárních lymfoidních orgánů navozují imunosupresivní odpověď organismu na infekci. Celý tento proces doprovází zvýšená hladina protizánětlivého IL-10 a snížená produkce interferonu gama aktivujícího makrofágy (Skinner et al., 2005). Bylo také prokázáno, že v tomto procesu hraje roli nejen T3SS, ale i ACT (Skinner et al., 2004). Sekrece proteinů spojených s T3SS byla již zaznamenána i v případě klinických izolátů *B. pertussis*. Stejně tak byl u *B. pertussis* pozorován vliv T3SS na potlačení imunitní odpovědi během kolonizace tkání dýchacího traktu v myším modelu (Fennelly et al., 2008).

Bylo také prokázáno, že exprese proteinů T3SS je závislá na podmínkách, ve kterých je *B. pertussis* kultivována. Pokud je daný kmen *B. pertussis* tzv. pasážován v *in vitro* podmínkách, T3SS přestává být exprimován. Některé studie však ukazují, že k obnovení exprese T3SS stačí kontakt s hostitelskou buňkou. Jako znak používaný pro detekci exprese T3SS je používána imunoblotová detekce Bsp22, proteinu sekretovaného T3SS (Gaillard et al., 2011).

4.5.1 Proteiny sekretované T3SS

B. pertussis a *B. bronchiseptica* využívají T3SS k sekreci, nicméně doposud bylo pozorováno pouze malé množství sekretovaných proteinů. Patří mezi ně proteiny BteA, Bsp22, BopB, BopD a BopN.

BteA, někdy označovaný jako BopC, je 69 kDa velký protein. BteA je doposud jediným efektorovým proteinem sekretovaným pomocí T3SS, který byl u bakterií rodu *Bordetella* objeven. BteA ke své funkci vyžaduje chaperon BtcA, díky kterému byl v genomu odhalen. Bylo prokázáno, že transkripce *bteA* je regulována systémem BvgAS. Dále bylo prokázáno, že BteA nemá vliv na hemolýzu často spojovanou s T3SS u jiných bakterií, ale má vliv pouze na cytotoxicitu v různých typech hostitelských buněk (Kuwae et al., 2006; Panina et al., 2005). Nedávný výzkum se také zaměřil na 130 aa velkou N-koncovou sekvenci BteA. Bylo prokázáno, že tato sekvence zajišťuje ukotvení BteA do lipidických raftů v eukaryotických cytoplazmatických membránách. Mimo N-koncovou doménu je BteA pravděpodobně složen z dalších dvou domén. Struktura BteA však doposud není známá (French et al., 2009; Guttman et al., 2013). Přestože je gen *bteA* pevně konzervován v genomu *B. pertussis*,

B. bronchiseptica i *B. parapertussis*, produkce BteA byla pozorována pouze u *B. pertussis* a *B. bronchiseptica*. Vliv BteA na cytotoxicitu a na snížení schopnosti fagocytózy makrofágů byl doposud prokázán pouze u *B. bronchiseptica* (Guttman et al., 2013; Hegerle et al., 2013).

Bsp22 je 22 kDa velký protein, který hraje významnou roli v sekreci pomocí T3SS. Přestože není efektorovým proteinem, který by vstupoval do hostitelských buněk, je nezbytný ke kolonizaci a přežití *B. bronchiseptica* v tkáních dýchacího ústrojí myši a také k cytotoxické a hemolytické aktivitě (Yuk et al., 2000). Funkcí Bsp22 je tvorba filamentózní špičky jehly T3SS, která spojuje T3SS s translokou lokalizovanou v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky. Tomu nasvědčuje schopnost polymerizace Bsp22 a schopnost vazby Bsp22 na BopD, který je součástí translokou. V myším modelu byl v případě *B. bronchiseptica* také pozorován pozitivní účinek protilátek proti Bsp22 po předchozí imunizaci (Medhekar et al., 2009). Avšak v sérech pacientů prokazatelně nakažených bakteriemi *B. pertussis* nebyly nalezeny specifické protilátky proti Bsp22 (Villarino Romero et al., 2013).

BopN odpovídá na základě homologií s proteiny T3SS ostatních bakterií nesoucích geny pro T3SS strukturnímu a regulačnímu proteinu SctW. Bylo však pozorováno, že BopN translokovaný do hostitelských buněk ovlivňuje imunitní systém pomocí IL-10. Dodnes ale nebylo prokázáno, že je BopN do hostitelských buněk opravdu pomocí T3SS translokován (Fauconnier et al., 2001; Nagamatsu et al., 2009; Portaliou et al., 2016).

BopB a BopD byly na základě pokusů pozorovány jako proteiny sekretované pomocí T3SS zodpovědné za tvorbu translokou v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky a jejich produkce a sekrece proto úzce souvisí s již popsanými funkcemi T3SS (Nogawa et al., 2004).

Závěr

Značný nárůst případů infekce a opětovné případy úmrtí způsobené lidským patogenem *B. pertussis* v poslední době vyústily ve zvýšenou intenzitu studia tohoto patogenu. PT a ACT jsou dnes relativně dobře prostudované faktory virulence, resp. toxiny *B. pertussis*, původce černého kašle. Výzkum se v této oblasti zabývá molekulárními mechanismy, které mohou pomoci rozluštit přesný princip jejich vlivu na hostitelský organismus a zefektivnit boj proti tomuto patogenu.

Srovnatelný pokrok byl v posledních desetiletích zaznamenán také v otázce regulace virulence *B. pertussis*. Zde je hlavní důraz kladen na centrální regulační systém, dvousložkový systém signální transdukce BvgAS. Přestože je význam BvgAS naprosto zásadní, další výzkum by se měl v tomto směru dle mého názoru zaměřit i na další regulační systémy, např. RisAK a sledovat provázanost těchto regulačních systémů. Zároveň by se další výzkum mohl zaměřit na mechanismus a faktory, které spouští virulentní fázi Bvg⁺. Dnes je za jediný faktor navozující virulentní stav Bvg⁺ považována teplota 37 °C.

Vzhledem ke krátké době, po kterou je T3SS studován jako faktor virulence *B. pertussis*, zůstává v této problematice mnoho otevřených otázek. Zájem o studium T3SS u lidského patogenu *B. pertussis* je založen především na znalostech získaných u jiných příbuzných patogenů, kde hraje T3SS významnou roli v infekci hostitele a patogenezi onemocnění. Přestože dosavadní výzkum potvrdil význam T3SS ve virulenci *B. bronchiseptica*, význam T3SS ve virulenci *B. pertussis* zůstává nejasný. Další výzkum je proto potřeba zaměřit na zjištění, zda a jakým způsobem *B. pertussis* využívá T3SS k infekci svého hostitele, tedy člověka. K tomu bude mimo jiné zapotřebí optimalizovat práci s tímto patogenem v *in vitro* podmínkách, jelikož není s jistotou známo, jaké faktory mají vliv na spuštění exprese T3SS v *B. pertussis*.

Dodnes také není známo, které faktory virulence *B. pertussis* slouží pouze ke zprostředkování infekce a které mají za následek patologické projevy infekce spojené s černým kašlem. I proto je potřeba pokračovat v detailním výzkumu mechanismů virulence tohoto patogenu s cílem možnosti následného navržení účinné vakcinace či léčby černého kašle.

Tato bakalářská práce bude sloužit jako podklad pro mou diplomovou práci, která se bude zabývat studiem klinických izolátů *B. pertussis* a významem T3SS ve virulenci tohoto patogenu.

Seznam použité literatury

Review jsou označena symbolem *

- Abrusci, P., Vergara-Irigaray, M., Johnson, S., Beeby, M.D., Hendrixson, D.R., Roversi, P., Friede, M.E., Deane, J.E., Jensen, G.J., Tang, C.M., Lea, S.M., 2013. Architecture of the major component of the type III secretion system export apparatus. *Nat Struct Mol Biol* 20, 99-104.
- Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., Rappuoli, R., 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6671-6675.
- *Armstrong, G.D., Howard, L.A., Pepler, M.S., 1988. Use of glycosyltransferases to restore pertussis toxin receptor activity to asialoagalactofetuin. *J Biol Chem* 263, 8677-8684.
- Baikalov, I., Schroder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., Dickerson, R.E., 1996. Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* 35, 11053-11061.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., Goodwin, M.S., 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol* 173, 720-726.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., Sebo, P., 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269, 27231-27239.
- Bokoch, G.M., Katada, T., Northup, J.K., Hewlett, E.L., Gilman, A.G., 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* 258, 2072-2075.
- Boucher, P.E., Maris, A.E., Yang, M.S., Stibitz, S., 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* 11, 163-173.
- Boucher, P.E., Yang, M.S., Stibitz, S., 2001. Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the *fha* promoter of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* 40, 991-999.
- Carbonetti, N.H., 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* 5, 455-469.
- *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, 6358-6366.
- Collazo, C.M., Galan, J.E., 1996. Requirement for exported proteins in secretion through the invasion-associated type III system of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 64, 3524-3531.
- Confer, D.L., Eaton, J.W., 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217, 948-950.
- Cookson, B.T., Tyler, A.N., Goldman, W.E., 1989. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* 28, 1744-1749.

- 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.
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L., Manclark, C.R., 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 25, 896-901.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A., Miller, J.F., 2006. Species- and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella BvgAS*. *J Bacteriol* 188, 1775-1785.
- *Decker, K.B., James, T.D., Stibitz, S., Hinton, D.M., 2012. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor *BvgA*. *Microbiology* 158, 1665-1676.
- Deora, R., Bootsma, H.J., Miller, J.F., Cotter, P.A., 2001. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a *Bvg*-intermediate phase gene. *Mol Microbiol* 40, 669-683.
- Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., Cornelis, G.R., 2010. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *EMBO J* 29, 1928-1940.
- Dupre, E., Herrou, J., Lensink, M.F., Wintjens, R., Vagin, A., Lebedev, A., Crosson, S., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2015. Virulence regulation with Venus flytrap domains: structure and function of the periplasmic moiety of the sensor-kinase *BvgS*. *PLoS Pathog* 11, e1004700.
- Dupre, E., Wohlkonig, A., Herrou, J., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F., Antoine, R., 2013. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase *BvgS*: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiol* 13, 172.
- 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, 79-83.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., Leclerc, C., 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* 278, 38514-38521.
- 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, 40-48.
- 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, 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, 1257-1266.
- Flak, T.A., Goldman, W.E., 1999. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* 1, 51-60.
- Flak, T.A., Heiss, L.N., Engle, J.T., Goldman, W.E., 2000. Synergistic epithelial responses to endotoxin and a naturally occurring muramyl peptide. *Infect Immun* 68, 1235-1242.
- French, C.T., Panina, E.M., Yeh, S.H., Griffith, N., Arambula, D.G., Miller, J.F., 2009. The *Bordetella* type III secretion system effector *BteA* contains a conserved N-terminal motif that guides bacterial virulence factors to lipid rafts. *Cell Microbiol* 11, 1735-1749.

- 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, 3677-3682.
- *Galan, J.E., 2008. Energizing type III secretion machines: what is the fuel? *Nat Struct Mol Biol* 15, 127-128.
- Galan, J.E., Ginocchio, C., Costeas, P., 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* 174, 4338-4349.
- *Galan, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., Wagner, S., 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol* 68, 415-438.
- Gentile, F., Knipling, L.G., Sackett, D.L., Wolff, J., 1990. Invasive adenyl cyclase of *Bordetella pertussis*. Physical, catalytic, and toxic properties. *J Biol Chem* 265, 10686-10692.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O., Ullmann, A., 1988a. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med* 13 Suppl, 239-252.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., Danchin, A., 1988b. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2, 19-30.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A., 1988c. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 7, 3997-4004.
- Goldman, W.E., Klapper, D.G., Baseman, J.B., 1982. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* 36, 782-794.
- 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.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., Leclerc, C., 2001. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha(M)\beta(2)$ integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193, 1035-1044.
- Guttman, C., Davidov, G., Shaked, H., Kolusheva, S., Bitton, R., Ganguly, A., Miller, J.F., Chill, J.H., Zarivach, R., 2013. Characterization of the N-terminal domain of BteA: a *Bordetella* type III secreted cytotoxic effector. *PLoS One* 8, e55650.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266, 433-435.
- Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E.T., 2017. Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front Microbiol* 8, 28.
- Hegerle, N., Rayat, L., Dore, G., Zidane, N., Bedouelle, H., Guiso, N., 2013. In-vitro and in-vivo analysis of the production of the *Bordetella* type three secretion system effector A in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Microbes Infect* 15, 399-408.

- Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R., Goldman, W.E., 1993. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect Immun* 61, 3123-3128.
- Herrou, J., Bompard, C., Wintjens, R., Dupre, E., Willery, E., Villeret, V., Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2010. Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17351-17355.
- Hewlett, E., Wolff, J., 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *J Bacteriol* 127, 890-898.
- Hiramatsu, Y., Yoshino, S., Yamamura, Y., Otsuka, N., Shibayama, K., Watanabe, M., Kamachi, K., 2017. The proline residue at position 319 of BvgS is essential for BvgAS activation in *Bordetella pertussis*. *Pathog Dis*.
- Hoiczky, E., Blobel, G., 2001. Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4669-4674.
- *Hueck, C.J., 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 379-433.
- Ibuki, T., Imada, K., Minamino, T., Kato, T., Miyata, T., Namba, K., 2011. Common architecture of the flagellar type III protein export apparatus and F- and V-type ATPases. *Nat Struct Mol Biol* 18, 277-282.
- 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, 1015-1024.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P., Cornelis, G.R., 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* 302, 1757-1760.
- Jungnitz, H., West, N.P., Walker, M.J., Chhatwal, G.S., Guzman, C.A., 1998. A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infect Immun* 66, 4640-4650.
- 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, 5587-5597.
- Kashimoto, T., Katahira, J., Cornejo, W.R., Masuda, M., Fukuoh, A., Matsuzawa, T., Ohnishi, T., Horiguchi, Y., 1999. Identification of functional domains of *Bordetella dermonecrotizing* toxin. *Infect Immun* 67, 3727-3732.
- Katada, T., Ui, M., 1982. ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* 257, 7210-7216.
- 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, 3227-3230.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., Aizawa, S.I., 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280, 602-605.

- Kuwae, A., Matsuzawa, T., Ishikawa, N., Abe, H., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S., Abe, A., 2006. BopC is a novel type III effector secreted by *Bordetella bronchiseptica* and has a critical role in type III-dependent necrotic cell death. *J Biol Chem* 281, 6589-6600.
- Lacey, B.W., 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)* 58, 57-93.
- Lee, S.H., Galan, J.E., 2004. Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* 51, 483-495.
- Lefebvre, M.D., Galan, J.E., 2014. The inner rod protein controls substrate switching and needle length in a Salmonella type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 817-822.
- Legarda, D., Klein-Patel, M.E., Yim, S., Yuk, M.H., Diamond, G., 2005. Suppression of NF-kappaB-mediated beta-defensin gene expression in the mammalian airway by the *Bordetella* type III secretion system. *Cell Microbiol* 7, 489-497.
- Leslie, P.H., Gardner, A.D., 1931. The Phases of *Haemophilus pertussis*. *J Hyg (Lond)* 31, 423-434.
- *Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F., 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* 4, 82-89.
- *Locht, C., Coutte, L., Mielcarek, N., 2011. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* 278, 4668-4682.
- *Macnab, R.M., 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57, 77-100.
- Marlovits, T.C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D.R., Galan, J.E., Unger, V.M., 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* 306, 1040-1042.
- Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C., Sebo, P., 2005. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* 44, 12759-12766.
- Masin, J., Osicka, R., Bumba, L., Sebo, P., 2015. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog Dis* 73, ftv075.
- *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, 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, 492-504.
- *Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F., Cotter, P.A., 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol* 12, 274-288.
- Merkel, T.J., Barros, C., Stibitz, S., 1998. Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 180, 1682-1690.
- Merkel, T.J., Boucher, P.E., Stibitz, S., Grippe, V.K., 2003. Analysis of *bvgR* expression in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 185, 6902-6912.

- Michiels, T., Vanooteghem, J.C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P., Cornelis, G.R., 1991. Analysis of virC, an operon involved in the secretion of Yop proteins by *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 173, 4994-5009.
- Morse, S.I., 1965. Studies on the Lymphocytosis Induced in Mice by *Bordetella Pertussis*. *J Exp Med* 121, 49-68.
- Morse, S.I., Morse, J.H., 1976. Isolation and properties of the leukocytosis- and lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 143, 1483-1502.
- Mota, L.J., Journet, L., Sorg, I., Agrain, C., Cornelis, G.R., 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* 307, 1278.
- Mu, H.H., Cooley, M.A., Sewell, W.A., 1994. Studies on the lymphocytosis induced by pertussis toxin. *Immunol Cell Biol* 72, 267-270.
- Mueller, C.A., Broz, P., Muller, S.A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A., Cornelis, G.R., 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* 310, 674-676.
- 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, 3073-3088.
- Neyt, C., Cornelis, G.R., 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol Microbiol* 33, 971-981.
- *Nguyen, L., Paulsen, I.T., Tchieu, J., Hueck, C.J., Saier, M.H., Jr., 2000. Phylogenetic analyses of the constituents of Type III protein secretion systems. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2, 125-144.
- 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, 3806-3813.
- Otero, A.S., Yi, X.B., Gray, M.C., Szabo, G., Hewlett, E.L., 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* 270, 9695-9697.
- 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, 2822-2832.
- Pallen, M.J., Bailey, C.M., Beatson, S.A., 2006. Evolutionary links between FliH/YscL-like proteins from bacterial type III secretion systems and second-stalk components of the FoF1 and vacuolar ATPases. *Protein Sci* 15, 935-941.
- 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, 267-279.
- Parfentjev, I.A., Goodline, M.A., 1948. Histamine shock in mice sensitized with *Hemophilus pertussis* vaccine. *J Pharmacol Exp Ther* 92, 411-413.
- Parker, C.W., Morse, S.I., 1973. The effect of *Bordetella pertussis* on lymphocyte cyclic AMP metabolism. *J Exp Med* 137, 1078-1090.

- Parkhill, J., Sebahia, 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., Rabbinowitsch, 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, 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, 119-125.
- Perraud, A.L., Rippe, K., Bantscheff, M., Glocker, M., Lucassen, M., Jung, K., Sebald, W., Weiss, V., Gross, R., 2000. Dimerization of signalling modules of the EvgAS and BvgAS phosphorelay systems. *Biochim Biophys Acta* 1478, 341-354.
- Pittman, M., 1979. Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis* 1, 401-412.
- Pittman, M., 1984. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis* 3, 467-486.
- Portaliou, A.G., Tsolis, K.C., Loos, M.S., Zorzini, V., Economou, A., 2016. Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci* 41, 175-189.
- Register, K.B., Ivanov, Y.V., Jacobs, N., Meyer, J.A., Goodfield, L.L., Muse, S.J., Smallridge, W.E., Brinkac, L., Kim, M., Sanka, R., Harvill, E.T., Losada, L., 2015. Draft Genome Sequences of 53 Genetically Distinct Isolates of *Bordetella bronchiseptica* Representing 11 Terrestrial and Aquatic Hosts. *Genome Announc* 3.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., Ladant, D., 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 270, 26370-26376.
- Roy, C.R., Falkow, S., 1991. Identification of *Bordetella pertussis* regulatory sequences required for transcriptional activation of the *fhaB* gene and autoregulation of the *bvgAS* operon. *J Bacteriol* 173, 2385-2392.
- Roy, C.R., Miller, J.F., Falkow, S., 1989. The *bvgA* gene of *Bordetella pertussis* encodes a transcriptional activator required for coordinate regulation of several virulence genes. *J Bacteriol* 171, 6338-6344.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., Ladant, D., 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 267, 13598-13602.
- Salmond, G.P., Reeves, P.J., 1993. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* 18, 7-12.
- Scarlato, V., Prugnola, A., Arico, B., Rappuoli, R., 1990. Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 10067.

- Sebo, P., Ladant, D., 1993. Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol Microbiol* 9, 999-1009.
- Shea, J.E., Hensel, M., Gleeson, C., Holden, D.W., 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2593-2597.
- Schmidt, G., Goehring, U.M., Schirmer, J., Lerm, M., Aktories, K., 1999. Identification of the C-terminal part of *Bordetella dermonecrotic* toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *J Biol Chem* 274, 31875-31881.
- 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, 4647-4652.
- Skinner, J.A., Reissinger, A., Shen, H., Yuk, M.H., 2004. *Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state. *J Immunol* 173, 1934-1940.
- Skoff, T.H., Baumbach, J., Cieslak, P.R., 2015. Tracking Pertussis and Evaluating Control Measures through Enhanced Pertussis Surveillance, Emerging Infections Program, United States. *Emerg Infect Dis* 21, 1568-1573.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., Read, R.J., 1994a. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* 2, 45-57.
- Stein, P.E., Boodhoo, A., Armstrong, G.D., Heerze, L.D., Cockle, S.A., Klein, M.H., Read, R.J., 1994b. Structure of a pertussis toxin-sugar complex as a model for receptor binding. *Nat Struct Biol* 1, 591-596.
- Stenson, T.H., Allen, A.G., Al-Meer, J.A., Maskell, D., Peppler, M.S., 2005. *Bordetella pertussis* *risA*, but not *risS*, is required for maximal expression of Bvg-repressed genes. *Infect Immun* 73, 5995-6004.
- Stibitz, S., Yang, M.S., 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 173, 4288-4296.
- Szabo, G., Gray, M.C., Hewlett, E.L., 1994. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* 269, 22496-22499.
- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M., Ishii, S., 1982. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* 21, 5516-5522.
- Toyota, T., Kakizaki, M., Kimura, K., Yajima, M., Okamoto, T., Ui, M., 1978. Islet activating protein (IAP) derived from the culture supernatant fluid of *Bordetella pertussis*: effect on spontaneous diabetic rats. *Diabetologia* 14, 319-323.
- *Troisfontaines, P., Cornelis, G.R., 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* 20, 326-339.
- Tuomanen, E., Towbin, H., Rosenfelder, G., Braun, D., Larson, G., Hansson, G.C., Hill, R., 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med* 168, 267-277.

- Uhl, M.A., Miller, J.F., 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1163-1167.
- Uhl, M.A., Miller, J.F., 1996a. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* 271, 33176-33180.
- Uhl, M.A., Miller, J.F., 1996b. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J* 15, 1028-1036.
- Utsumi, S., Sonoda, S., Imagawa, T., Kanoh, M., 1978. Polymorphonuclear leukocyte-inhibitory factor of *Bordetella pertussis*. I. Extraction and partial purification of phagocytosis- and chemotaxis-inhibitory activities. *Biken J* 21, 121-135.
- 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, 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, 2831-2843.
- Weiss, A.A., Goodwin, M.S., 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* 57, 3757-3764.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., Falkow, S., 1983. Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 42, 33-41.
- Wilharm, G., Lehmann, V., Krauss, K., Lehnert, B., Richter, S., Ruckdeschel, K., Heesemann, J., Trulzsch, K., 2004. *Yersinia enterocolitica* type III secretion depends on the proton motive force but not on the flagellar motor components MotA and MotB. *Infect Immun* 72, 4004-4009.
- Young, B.M., Young, G.M., 2002. YplA is exported by the Ysc, Ysa, and flagellar type III secretion systems of *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 184, 1324-1334.
- Yuk, M.H., Harvill, E.T., Cotter, P.A., Miller, J.F., 2000. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the *Bordetella* type III secretion system. *Mol Microbiol* 35, 991-1004.
- 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, 945-959.
- Zhang, J.H., Xiao, G., Gunsalus, R.P., Hubbell, W.L., 2003. Phosphorylation triggers domain separation in the DNA binding response regulator NarL. *Biochemistry* 42, 2552-2559.
- Zhang, Y.L., Sekura, R.D., 1991. Purification and characterization of the heat-labile toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 59, 3754-3759.