Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra genetiky a mikrobiologie

Regulace virulence u *Bacillus anthracis*

bakalářská práce

Petra Lišková

Školitel: Doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

2006/2007

Abstrakt:
Bacillus anthracis je grampozitivní sporulující patogenní bakterie způsobující sněť slezinnou, anthrax. Vzhledem k důmyslným faktorům virulence a odolnosti endospor se tato bakterie stala v poslední době nástrojem bioterorismu. Tato práce má za úkol popsat a shrnout dosud známe regulační systémy a poznatky o regulaci hlavních virulenčních faktorů *Bacillus anthracis*, které jsou nezbytné pro vznik infekce a přežití *Bacillus anthracis* v hostiteli. Součástí práce je popis hlavních virulenčních faktorů a jejich determinant, popis patogenese anthraxu a další směry výzkumu *Bacillus anthracis* (vývoj vakciny a identifikace endospor). Patogenicita *Bacillus anthracis* zcela závisí na virulenčních plazmidech (pXO1, pXO2), které virulentní kmen *Bacillus anthracis* nese. Těmito plazmidy jsou kódovány hlavní virulenční faktory: edemogenní toxin (EdTx), letální toxin (LeTx) a pouzdro. Dále tyto plazmidy také kódují regulační proteiny, které řídí synthesu virulenčních faktorů. Plazmid pXO1 kóduje AtxA, hlavní pozitivní regulační protein hlavních virulenčních faktorů *Bacillus anthracis*, protein PagR, represor PA, a geny *gerX* operonu, které řídí germinaci bakteriálních spor. Plazmid pXO2 kóduje regulační proteiny AcpA a AcpB, které se účastní pozitivní regulace synthesy pouzdra. Regulace virulence se také účastní proteiny kódované chromozomálně – protein AbrB, regulátor přechodových fází růstu, některé proteiny rodiny Spo0, regulující přechod do sporulace, a jiné součásti regulace germinace spor. Na řízení virulence se též podílejí zvýšená koncentrace CO_2 a zvýšená teplota, jako indikátory vstupu do hostitelského organismu.

Klíčová slova: *Bacillus anthracis*, regulace virulence, bakteriální toxiny

Regulation of virulence in *Bacillus anthracis*

Abstract:

Bacillus anthracis is pathogenic bacterium causing disease anthrax. At present, this bacterium became suitable device of bioterrorism, due to its ingenious virulence factors and endurance of spores. This work summarizes recently known regulation systems of virulence in *Bacillus anthracis* that are necessary for triggering of infection and survival of *Bacillus anthracis* in the host. Main virulence factors and their determinants, anthrax pathogenesis are described. Pathogenicity of *Bacillus anthracis* is completely based on virulence plasmids (pXO1, pXO2) contained in virulent strain of *Bacillus anthracis*. These virulence plasmids encode main virulence factors: edema toxin (EdTx) and lethal toxin (LeTx) and enzymes of synthetic pathway of antifagocytic capsule. These plasmids also encode regulation proteins which induce virulence factor synthesis: AtxA protein, the main positive regulator of main virulence factors of *Bacillus anthracis*, a PagR protein, a PA represor, regulation proteins AcpA and AcpB that participate in positive regulation capsule synthesis and, at the same time, *gerX* operon genes, that drive germination of bacterial spores. There are also other regulation encoded chromosomally as AbrB protein, a transition state regulator, some proteins of Spo0 family that drive sporulation pathway and another parts of spore germination. Two important physical factors – concentration of CO_2 and temperature also regulate the virulence as indicators of entry into host organism.

Key Words: *Bacillus anthracis*, virulence regulation, bacterial toxin

Obsah

Abstrakt: ... 2
Klíčová slova: ... 2
Abstract: ... 3
Key Words: ... 3
Seznam zkratek ... 5
1. Úvod ... 6
2. *Bacillus anthracis* ... 6
2.1. Patogeneze sněti slezinné (anthraxu) ... 8
3. Virulenční faktory ... 9
3.1. Pouzdro ... 9
3.2. Toxiny ... 10
3.2.1. Protektivní antigen (PA) ... 11
3.2.2. Letální faktor (LF) ... 12
3.2.3. Edemogenní faktor (EF) ... 13
3.2.4. Internalizace toxinů do hostitelské buňky ... 14
4. Virulenční plazmidy ... 15
4.1. Plazmid pXO1 ... 15
4.2. Plazmid pXO2 ... 16
4.3. Závislost virulence na přítomnosti plazmidů pXO1 a pXO2 ... 16
5. Regulace virulence ... 17
5.1. Regulační protein AtxA ... 18
5.2. Regulační proteiny AcpA, AcpB ... 18
5.3. Regulace produkce toxinů ... 18
5.3.1. Regulace *pag* operonu ... 19
5.4. Regulace *cap* operonu ... 19
5.5. AbrB – negativní regulátor genů pro toxiny ... 21
5.6. Germinace a sporulace ... 22
6. Vakcina proti anthraxu ... 23
7. Anthrax a bioterorismus ... 24
8. Závěr ... 25
9. Seznam použité literatury ... 27

Seznam zkratek

AcpA	pozitivní regulační protein synthesy pouzdra, gen *acpA*
AcpB	pozitivní regulační protein synthesy pouzdra, gen *acpB*
AtxA	hlavní pozitivní regulační protein hlavních virulenčních faktorů, gen *atxA*
CaM	kalmodulin (calmodulin)
bp	pár basí (base pair)
cap	geny pro synthesu pouzdra (capsule)
cya	gen kódující protein EF
EdTx	edemogenní toxin (edema toxin), složený z PA a EF
EF	edemogenní faktor (edema factor), komponenta EdTx
gerX	germinační operon
lef	gen kódující protein LF
LeTX	letální toxin (lehal toxin), složený z PA a LF
LF	letální faktor (lehal factor), komponenta LeTx
ORF	otevřený čtecí rámec (open reading frame)
PA	protektivní antigen, komponenta EdTx a LeTx
pagA	gen kódující protein PA
pagR	represor protektivního antigenu (protective antigen represor)
wt	geneticky původní kmen (wild type)

1. Úvod

Bacillus anthracis je prokaryotní, obligátně parazitický organismus způsobující onemocnění slezinnou sněť (anthrax, uhlák), které zejména v minulosti způsobovalo značné obtíže v oblasti chovu zemědělských zvířat. Robert Koch zkoumal *Bacillus anthracis* a určil ho jako původce sněti slezinné, anthraxu (1877). Byl to historicky první patogenní organismus přiřazený ke konkrétní nemoci jako její původce. Na poznatcích o této bakterii formuloval Koch známé „Kochovy postuláty“. Později Louis Pasteur vyvinul proti sněti slezinné funkční vakcinu (1881).

Teprve v nedávné minulosti byly popsány virulenční plazmidy, které jsou nepostradatelné pro patogenicitu této bakterie, neboť zajišťují hlavní virulenční faktory – toxiny a pouzdro.

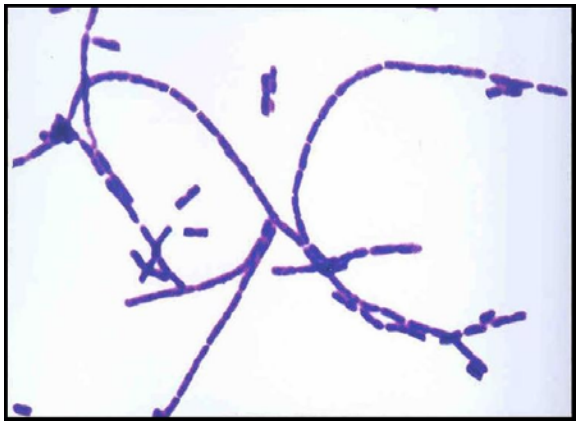
V dnešní době už *Bacillus anthracis* nemá vzhledem k existenci účinné vakciny (užívané ve veterinární medicině), tak zásadní hospodářský význam. Jeho důležitost však vzrostla na poli mezinárodních vztahů, neboť byl využit jako nástroj terorismu, kde se ukázal být „výhodnou zbraní“ vzhledem k účinným virulenčním faktorům a schopnosti tvorby vysoce odolných endospor.

2. *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis je grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčinkovitá nepohyblivá bakterie. Bakterie rodu *Bacillus* jsou schopné sporulace, přechodu vegetativní buňky do stavu dormance ve formě endospory. Proces sporulace a vyklíčení endospor závisí na podmínkách prostředí, které jsou u *Bacillus anthracis* dány přítomností či nepřítomností v hostiteli. Sporulace bakterií se uskutečňuje po uhynutí hostitele během opuštění těla hostitele. Vyklíčení endospor je zahájeno po vstupu do hostitelského organismu.

Vegetativní buňky mají velkost 1,2 um x 3-5 um, v tekutém mediu tvoří sedimentující řetízky (obr. 1). Na pevném mediu tvoří ploché, šedobílé zrnité kolonie se zprohýbaným povrchem okraje kolonie („caput Medusae“)(obr. 2). Slizovitý vzhled kolonie způsobuje produkce pouzdra, zvláště při kultivaci v přítomnosti pětiprocentního oxidu uhličitého (5% CO_2), s jehož vzrůstající koncentrací je

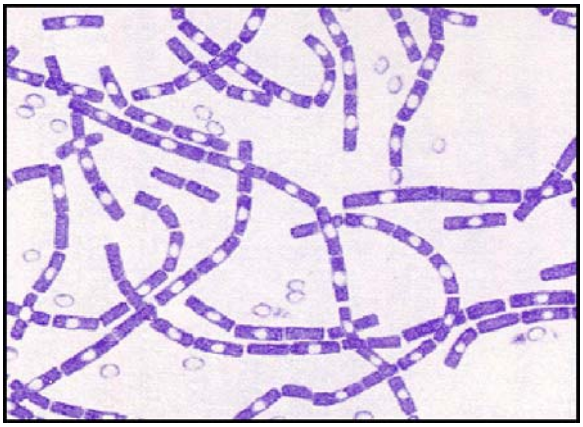
produkce pouzdra masivnější. *In vivo* se buňky sdružují po dvou až třech, tvoří typická pouzdra.



Obr.1: *B. anthracis*, nátěr z kultury. Barveno dle Grama (převzato z Votava a kolektiv, 2006).

Obr.2: Kolonie *B. anthracis* na krevním agaru („caput Medusae“). (převzato z Votava a kolektiv, 2006).

Jsou-li vnější podmínky pro vegetativní buňky nepříznivé, dochází ke sporulaci - vzniku endospor (obr. 3). Proces je závislý na přítomnosti volného atmosferického kyslíku, s nímž se do kontaktu bakterie dostanou po uhynutí hostitele. Endospory mají oválný tvar a jsou velice odolné k teplotním výkyvům, nízké vodní aktivitě prostředí, UV záření a působení některých dezinfekčních látek, v půdě jsou schopny přežít několik desítek let (Mock and Fouete, 2001).



Obr.3: Spory *B. anthracis*, barveno dle Grama (převzato z www.vaemergency.com).

Za patogenicitu *Bacillus anthracis* jsou zodpovědné následující virulenční faktory: pouzdro, které chrání buňku proti fagocytose, a toxiny, které znemožňují systémovou obranu hostitele. Edemogenní toxin (EdTx, edema toxin) způsobuje vyčerpání vnitrobuněčných zásob energie (ATP), čímž je porušena buněčná

homeostáze koncentrace iontů. Letální toxin (LeTx, lethal toxin) specificky degraduje členy MAPkinasové signalizační kaskády. Tyto hlavní virulenční faktory jsou kódovány dvěma plazmidy, na jejichž přítomnosti patogenicita *Bacillus anthracis* zcela závisí.

2.1. Patogeneze sněti slezinné (anthraxu)

Cílovou skupinou *Bacillus anthracis* jsou savci, především herbivorní savci. Rezervoár této patogenní bakterie tvoří zejména půda (a voda) kontaminovaná endosporami (sporami) této bakterie. Infekce je zahájena vstupem endospor do hostitele. Vzhledem ke způsobu vstupu do hostitelského organismu jsou známy a popsány tři klinické formy anthraxu: kožní, gastrointestinální a inhalační forma.

Ke klinickým projevům kožní formy anthraxu dochází, je-li inokulace uskutečněna poraněnou kůží při kontaktu s kontaminovaným materiálem (nejčastěji nemocná nebo mrtvá zvířata, kůže infikovaných zvířat určená k dalšímu zpracování), případně je způsobena bodnutím hmyzem. Forma kožní se projevuje zarudnutím v místě vstupu, kde se později objeví otok a nekrotický vřed (*pustula maligna*, eschar) (obr. 4) způsobený pomnožením bakterie a produkcí toxinu (edematogenní toxin, EdTx). Vřed je nebolestivý. Horečka, ani jiné celkové příznaky u kožní formy nebývají přítomny, vyskytuje se regionální lymfadenitida (zánět mízních uzlin).

Obr.4: Eschar, nekrotický vřed (kožní forma anthraxu) (převzato z CDC www.bt.cdc.gov).

Gastrointestinální forma propuká po pozření kontaminovaného masa nebo vody. V tomto případě lze rozlišovat nákazu intestinální, která se projevuje nevolnostmi, bolestmi břicha, horečkou se zvracením a krvavými průjmy, a vzácnější

oropharyngeální, kde bývají obvykle zasaženy mandle nebo ústní dutina (Böhm et al., 1998; Votava a kolektiv, 2006).

Plicní anthrax propuká, jsou-li endospory inhalovány. Plicní forma se projevuje zpočátku nespecificky (podobně jako chřipka) horečkou, kašlem a bolestí na hrudi. Postupem času se objevuje dyspnoe (dušnost). U neléčených případů stav vrcholí septickým šokem se selháním oběhu a ventilace s následkem smrti.

Po vstupu do organismu inhalační cestou zůstávají spory ve stavu latence v plicních alveolách, dokud nejsou fagocytovány makrofágy a transportovány do spádové lymfatické uzliny, kde dochází k započetí infekce vyklíčením endospor (Brittingham at al., 2005). Po vyklíčení jsou bakterie schopné uniknout z fagolysosomu makrofágů a pomnožit se v cytoplazmě makrofágů (Dixon et al., 2000). Vegetativní bakteriální buňky usmrcují makrofágy, v nichž se tyto bakterie nacházejí, a dále se množí v extracelulárním prostoru. Mechanismus úniku z makrofágů je závislý na časné expresi edemogenního (EdTx) a letálního toxinu (LeTx). Po překonání lymfatické bariéry, invadují bakterie do krevního (Mock and Fouet, 2001).

Všechny tyto formy se mohou vyvinout do formy septické, která je způsobena invazí pomnožených bakterií do krevního oběhu. Byla popsána též anthraxová meningitis.

Ve studiu patogenese a hostitelských obranných mechanismů je důležitým modelem myší model infekce, který se aplikuje zejména pro formu plicní a kožní. Onemocnění má podobný průběh jako u člověka. Myší model infekce je důležitý pro určování stupně virulence u výzkumu mutantních kmenů *Bacillus anthracis*.

3. Virulenční faktory

3.1. Pouzdro

Pouzdro je vnějším obalem bakterie, má za úkol chránit bakterii před imunitní odpovědi hostitele, je slabě imunogenní a inhibuje fagocytosu (Makino et al., 1989). Pouzdro *Bacillus anthracis* se skládá z polymeru γ-D-glutamové kyseliny, připojuje se

volně k povrchu bakteriální buňky. Prekurzor pro stavbu pouzdra je kyselina L-glutamová.

Synthesa pouzdra je kódována plazmidem pXO2 v *cap* lokusu, kde se nacházejí čtyři geny: *capB*, *capC*, *capA*, které jsou zodpovědné za synthesu, a *dep* gen zodpovědný za depolymeraci pouzdra. Při porovnávání genů kódujících proteiny účastnící se stavby pouzdra v *Bacillus anthracis* a *Bacillus subtilis*, byla nalezena sekvenční homologie *capB* a *capC* s geny *Bacillus subtilis* (*ywsC* a *ywtA*). Na základě této homologie byl CapA protein určen jako enzym katalytující polymeraci kyseliny L-glutamové a CapC jako možný integrální protein účastnící se transportu polymeru γ–D-glutamové kyseliny ven z buňky (Urushibata et al., 2002).

Tvorba pouzdra je obecně indukována podmínkami podobnými fyziologickému prostředí hostitelského organismu – zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého (nad koncentraci atmosferickou)/bikarbonátu (pro tekutá media) a zvýšenou teplotou.

3.2. Toxiny

Bacillus anthracis produkuje tři toxinové proteiny: protektivní antigen (PA, protective antigen), letální faktor (LF, lethal factor) a edemogenní faktor (EF, edema factor). Toxiny patří do skupiny A-B typu toxinů. Funkční toxin obsahuje vždy dvě složky: složka A je enzymatickou součástí toxinu, která je do hostitelské buňky doručena složkou B. Složka B s navázanou složkou A se váže na receptor hostitelské buňky a tím komplexu (A-B) zajistí receptorem zprostředkovanou endocytosu a je dále činná v doručení enzymu do cytoplasmy. Kombinací dvou z těchto třech proteinů jsou formovány dva druhy toxinů. Složkou B je zde protektivní antigen (PA) tvořící vždy s jednou ze složek A (buď letální faktor (LF), nebo edemogenní faktor (EF)) kompletní toxin – letální toxin (LeTx, lethal toxin) a edemogenní toxin (EdTx, edema toxin).

Geny kódující komponenty toxinů (*pagA* – PA, *lef* – LF, *cya* – EF) jsou lokalizovány na plazmidu pXO1. Toxiny hrají v pathogenesi zcela zásadní roli. Kmeny mutantní v genech pro toxiny nebo kmeny postrádající tento plazmid ($pXO1^-$) jsou avirulentní v myším experimentálním modelu pathogenese a nepůsobí letálně (Mock and Fouet, 2001).

3.2.1. Protektivní antigen (PA)

Název je odvozen ze skutečnosti, že je tento protein schopen vyvolat imunitní odpověď. Funkční protein (PA83; 735 aminokyselin) je tvořen čtyřmi doménami (obr. 5).

Doména 1 (aminokyselinové zbytky 1-249) obsahuje proteolyticky citlivé místo, *in vitro* štěpitelné trypsinem, *in vivo* buněčnými proteasami. Po štěpení v tomto místě je od celého protektivního antigenu oddělena N-koncová doména, PA20 (20 kDa). Větší zbývající část proteinu (PA63) poté může nasednout na plazmatickou membránu hostitelských buněk, zformovat heptamer (obr. 6) a navázat jeden z toxinogenních faktorů (LF nebo EF), čímž započne katalytickou funkci toxinů.

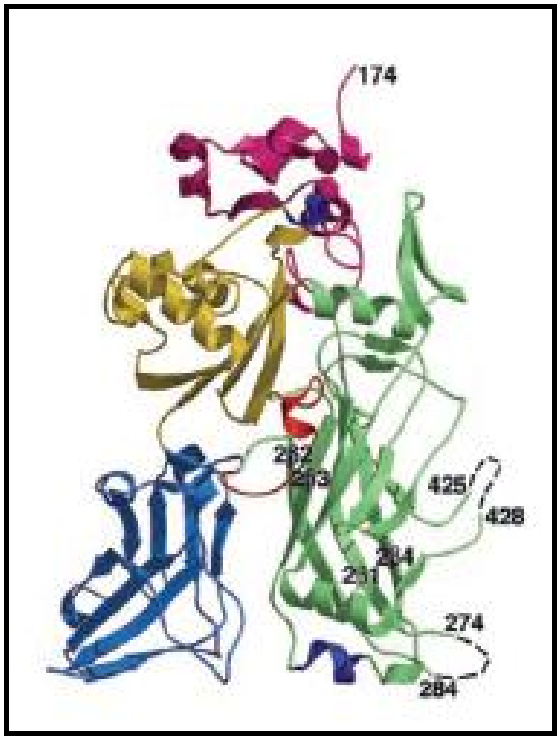
Doména 2 proteinu PA (aminokyselinové zbytky 250-487) tvoří β-barelové jádro protektivního antigenu s vnitřní smyčkou uplatňující se při tvorbě póru. Konformace této domény je závislá na pH. Pokles pH určuje konverzi prepóru ve funkční pór.

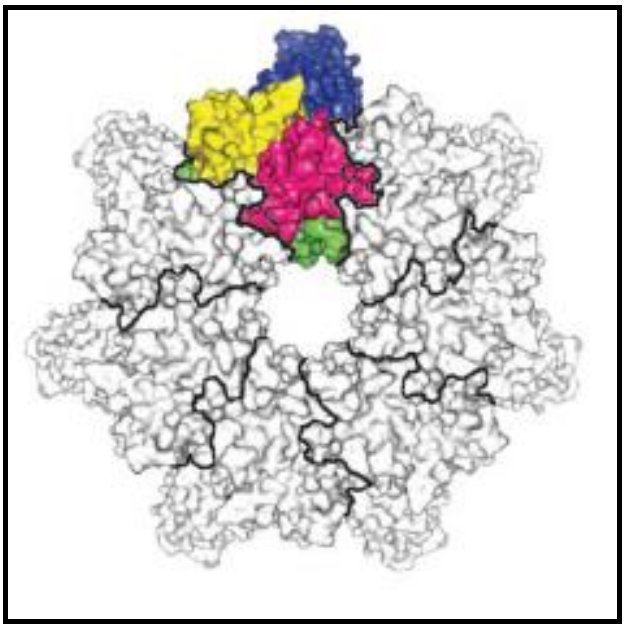
Doména 2 obsahuje místo citlivé k protease chymotrypsinu, které má zásadní význam pro toxicitu, pro translokaci složky A (LF) přes membránu. Experimentálně byly provedeny záměny aminokyselinových zbytků na pozicích Phe^{313}, Phe^{314} a Asp^{315} za menší aminokyselinu alanin. Jak jednoduchá substituce Ala315Asp, tak i dvojitá substituce Ala313Phe, Ala314Phe způsobila snížení schopnosti protektivního antigenu translokovat letální toxin (Singh et al, 1994).

Doména 3 (aminokyselinové zbytky 488-594) je nejmenší z domén. Obsahuje hydrofobní oblast a je místem protein-proteinové interakce, která je důležitá pro oligomerizaci.

Doména 4 (aminokyselinové zbytky 595-735) je místem vazby na receptor hostitelské buňky.

Protektivní antigen se váže na dva druhy receptorů: CMG-2 (capillary morphogenesis protein 2) a TEM8/ATR (Tumor Endothelium Marker 8). CMG-2 je membránový protein, který buňce zprostředkuje adhesi ke kolagenu (typ IV) a lamininu. TEM8 spojuje kolagen (typ I a IV) extracellulární matrix s aktinovým cytoskeletem buňky, umožňuje nasednutí na endoteliální buňky (Lacy at al., 2003; Faundez et al., 2006).





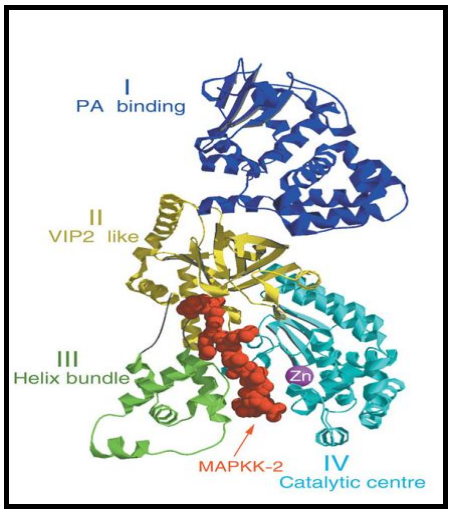
Obr.5: Monomer PA (PA63). Obr.6: Heptametr PA, prepór.

Domény: 1-růžová, 2-zelená, 3-žlutá a 4-modrá (převzato z Collier et al., 2004).

3.2.2. Letální faktor (LF)

Letální faktor (obr. 7) je proteasa tvořená 776 aminokyselinami. Pro svou aktivitu vyžaduje zinečnaté ionty. Letální faktor je enzym specificky štěpící N-koncové části buněčných proteinkinas MAPkinasové signální kaskády, čímž ji inaktivují.

Pro aktivaci makrofágů má MAPkinasová (Mitogen-activated protein kinases) signální kaskáda zásadní význam. V eukaryotických buněčných dějích má za úkol odpovídat na extracelulární stimuly a regulovat buněčné děje, převádí tedy vnější signál až do oblasti regulace transkripce odpovídajících genů. V důsledku svého působení letální toxin inhibuje děje indukované touto dráhou, tedy produkci NO (oxidu dusnatého vznikajícího zejména v makrofázích jako mikrobicidní látka), TNF (tumor necrosis factor, cytokin) a interleukinů IL-1, IL-6 (tkáňové hormony) a jiných cytokinů. Funkcí těchto cytokinů je aktivace leukocytů, amplifikace zánětu a zahájení systémové odpovědi na zánět. K zeslabení produkce TNF a interleukinů (IL-1, IL-6) dochází už 6 hodin po infekci (Brittingham et al., 2005).

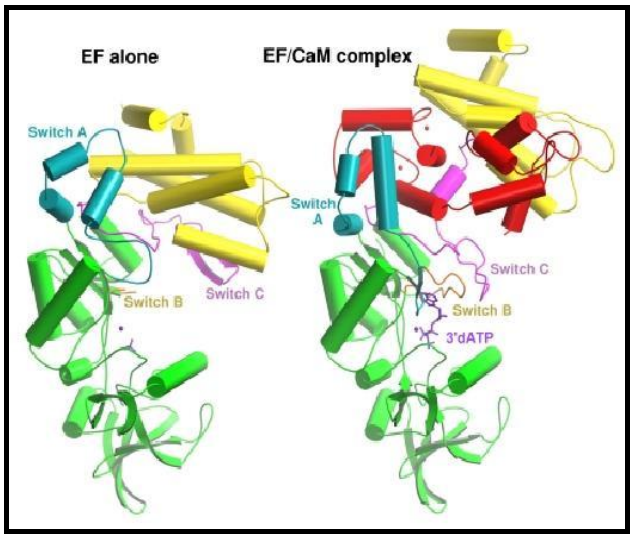


Obr.7: LF (převzato z Lidington et al., 2001).

3.2.3. Edemogenní faktor (EF)

Edemogenní faktor (obr. 8 vlevo) je tvořen 767 aminokyselinami. Funkčně tvoří adenylátcyklasu, enzym tvořící cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) z adenosintrifosfátu (ATP). Aktivita tohoto enzymu je vázána na kalmodulin (CaM) (obr. 8 vpravo), což je protein eukaryotní buňky vázající vápenaté ionty, který modifikuje enzymové funkce svých vazebných partnerů.

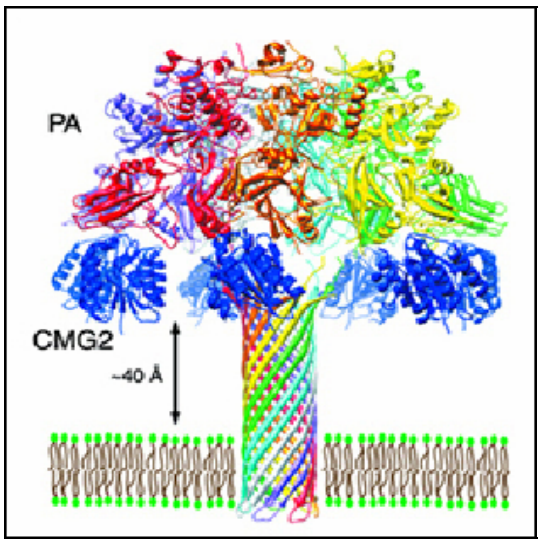
Edemogenní toxin mění energetické poměry hostitelské buňky (makrofágů) snížením hladinu ATP. Následkem toho je inhbována fagocytosa, schopnost oxidativního vzplanutí makrofágů, produkce cytokinů s následnou stimulací k chemotaxi neutrofilních granulocytů. Jsou porušeny iontové a vodní poměry buňky.



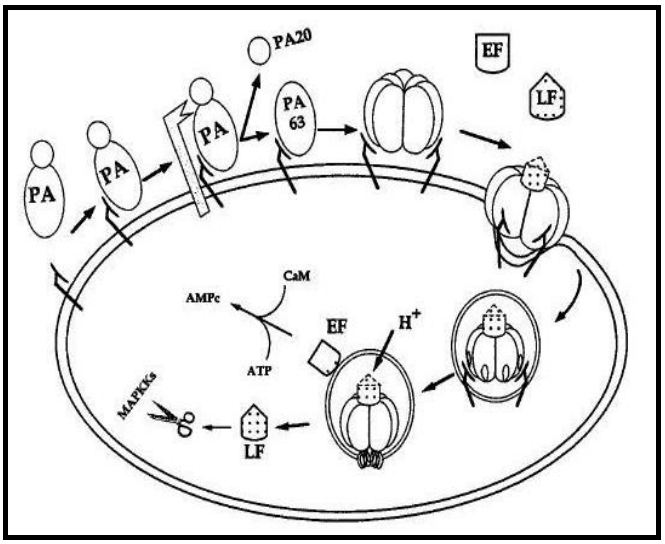
Obr.8: EF: vlevo – EF samotný, vpravo – s navázaným kalmodulinem, EF/CaM (převzato z www.tufts.edu, Bohm, 2004).

3.2.4. Internalizace toxinů do hostitelské buňky

Sekrece jednotlivých toxinů z bakterie *Bacilus anthracis* probíhá odděleně. Aby toxiny mohly vykonat svou enzymatickou funkci, musí být nejdříve doručeny dovnitř hostitelské buňky. Prvním členem, zprostředkujícím vazbu na membránu hostitelské buňky, je protektivní antigen – PA. PA se váže na receptory cílových buněk (obr. 9). Poté je proteolyticky štěpen v doméně 1, čímž je aktivován za vzniku PA63 a je schopen zformovat na plazmatické membráně hostitelské buňky heptamerní strukturu (prepór). Poté se letální faktor a edemogenní faktor kompetitivně vážou na protektivní antigen PA:LF/EF v poměru 1:1. Vznik hetero-oligomeru zahajuje receptorem zprostředkovanou endocytosu (obr. 10). Komplex receptor-heterooligomer za součinnosti buněčných proteinů clathrinů pak vpučí do hostitelské buňky za vzniku membránového váčku. Nízké pH panující v tomto váčku indukuje konformační změnu oligomerní struktury prepóru v pór. Letální toxin (LeTx) i edemogenní toxin (EdTx) požadují pro svou aktivitu kyselé prostředí, které indukuje jejich částečné rozbalení (denaturaci) a umožní toxinům transport přes vzniklý pór (von Heijne, 2005).



Obr.9: Model PA navázaného na receptor hostitelské buňky CMG-2 (capillary morphogenesis protein 2). (převzato z www.burnham.org, Liddington, 2001).



Obr.10: Internalizace hetero-oligomeru – vazba PA na receptor, – odštěpení PA20, tvorba oligomeru, vazba EF/LF na PA, inernalizace, tvorba póru, opuštění endosomu (EdTX, LeTx) a intracelulární působení (převzato z Mock and Fouet, 2001).

Transport toxinů z váčku umožňuje struktura, která je zformována na bazi póru v místě kontaktu oligomeru s plazmatickou membránou – kruh z aromatických

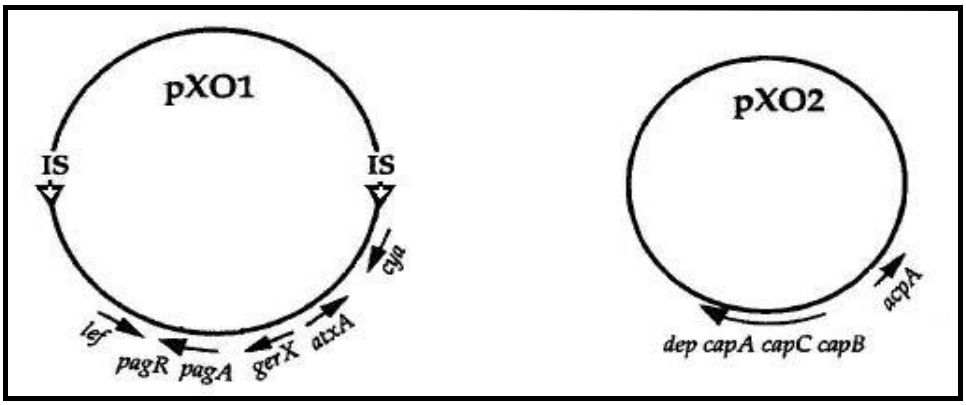
aminokyselin. Tento kruh (svorka) z aromatických aminokyselin je tvořen aminokyselinou fenylalaninem na pozici 427 (Phe^{427}) z každé z podjednotek protektivního antigenu z heptametru. Celkem je tedy tato struktura tvořena sedmi aminokyselinami, které jsou uspořádány v centru póru. Při záměně tohoto fenylalaninu na pozici 427 za menší aminokyselinu alanin (Ala427Phe), byla pozorována snížená (až zrušená) schopnost translokace toxinů. Tato skutečnost naznačuje, že kruh aromatických aminokyselin má podstatnou funkci v protažení toxinů pórem (Krantz et al., 2005).

4. Virulenční plazmidy

Hlavní virulenční faktory *Bacillus anthracis*, tedy toxiny a pouzdro, jsou kódovány dvěma plazmidy. Plně virulentní kmen nese dva velké plazmidy: pXO1 a pXO2 (obr. 11).

4.1. Plazmid pXO1

Velikost plazmidu je 182 GBP a obsahuje 143 otevřených čtecích rámců (ORF). Významnou součástí plazmidu je úsek o 44,8 GBP nesoucí *pag* operon, jehož součástí jsou geny *pagA* (kódující produkci protektivního antigenu) a *pagR* (kódující represor produkce protektivního antigenu). Dále tento úsek nese geny *lef* (letální faktor) a *cya* (edemogenní faktor), geny pro resolvasu, transposasu a *gerX* – tři geny germinačního operonu, které se účastní řízení klíčení spory. Dále tento plazmid kóduje regulační protein, produkt genu *atxA*, který je zodpovědný za regulaci virulenčních struktur, je to hlavní regulátor virulence *Bacillus anthracis*. Celá tato oblast je „ostrovem patogenity“ (pathogenicity island) (obr. 11), což je část genomu udávající bakterii virulenční fenotyp, typicky přítomný u patogenního kmene a nepřítomný u nepatogenního kmene, daného druhu bakterie. Ostrov patogenity je schopný horizontálního přenosu či transpozice dle dalších determinant, které obsahuje (J.Hacker; Ezzell et al., 1996; Okinawa et al., 1999).



Obr.11: Virulenční plazmidy *B. anthracis* pXO1 a pXO2. Černé šipky značí směr transkripce. Bílé šipky označují ostrov patogenicity (převzato z Mock and Fouet, 2001).

4.2. Plazmid pXO2

Velikost plazmidu je 96 GBP a obsahuje 85 otevřených čtecích rámců (ORF). Nese geny *capB*, *capC*, *capA* a *dep*, jejichž úkolem je řízení synthesy a degradace pouzdra a regulační geny *acpA* a *acpB*, jejichž produkty se účastní regulace exprese pouzdra (Mock and Fouet, 2001).

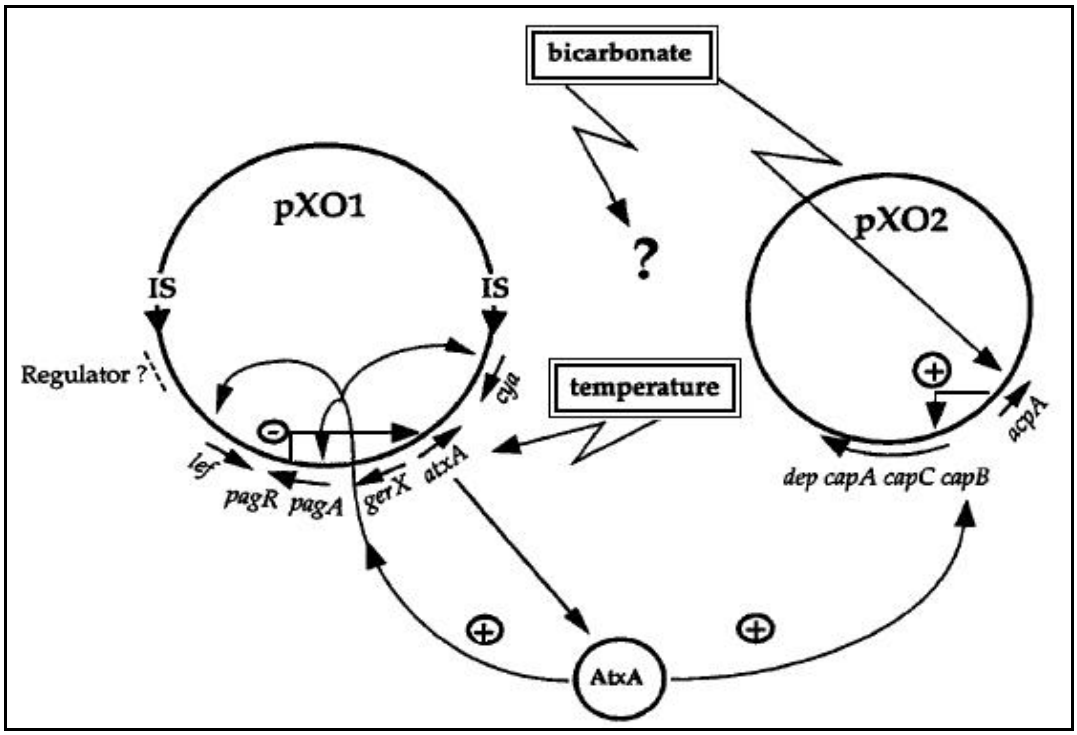
4.3. Závislost virulence na přítomnosti plazmidů pXO1 a pXO2

Virulence, tedy produkce pouzdra, toxinů a regulačních proteinů AtxA, AcpA a AcpA, je plně vázána na plazmidovou DNA. Ztráta jednoho z plazmidů způsobí, že daný kmen má oslabenou schopnost kolonizovat hostitele. Kmeny $pXO1^{+}$ $pXO2^{-}$, jsou v přírodě běžné, ale vzhledem k absenci antifagocytického pouzdra je jejich virulence omezena a nepůsobí letálně v myším modelu infekce. Kmeny $pXO1^{-}$ $pXO2^{+}$, jsou charakteristické slabší produkcí pouzdra a jsou zcela avirulentní v myším modelu infekce, protože neprodukují toxiny.

Cílené zbavení bakterie plazmidů (odléčení) je možné, dochází k němu za různých laboratorních podmínek, například při růstu v 43°C nebo v přítomnosti antibiotik. Přirozená ztráta plazmidu byla popsána jen pro plazmid pXO2, spontánní ztráta pXO1 je nepravděpodobná a v přírodě dosud nepozorovaná. Buňky se ztrátou plazmidu častěji sporulují, vykazují nižší růstové rychlosti na minimálním mediu a jsou náchylnější k infekci bakteriofágy (Mock and Fouet, 2001).

5. Regulace virulence

Obecně je germinace endospor a exprese hlavních virulenčních faktorů iniciována vstupem do hostitelského organismu. Fyziologické podmínky uvnitř teplokrevných živočichů, na rozdíl od prostředí například půdy, v níž mohou přetrvávat dormantní endospory, lze charakterizovat vzestupem teploty a koncentrace oxidu uhličitého. Virulenční faktory, pouzdro a toxiny, jsou produkovány krátce po vyklíčení endospor ve vegetativní, metabolicky plně aktivní buňky (Guidi-Rontani et al., 1999). Při dalším růstu probíhá regulace virulenčních faktorů regulačními proteiny. Na trakskripční úrovni jsou geny virulenčních faktorů kontrolovány regulačními proteiny AtxA, který je kódován virulenčním plazmidem pXO1, AcpA a AcpB, oba kódovány plazmidem pXO2 (obr. 12). Mechanismus kontroly virulence regulačními proteiny (AtxA, AcpA a AcpB) je dosud neobjasněn.



Obr.12: Schematické zobrazení virulenčních plazmidů *B. anthracis* (pXOP1, pXO2) a působení regulačních elementů – protein AcpB není zařazen (převzato z Mock and Fouet, 2001).

5.1. Regulační protein AtxA

AtxA je hlavním regulačním proteinem hlavních faktorů virulence a jediným známým regulátorem synthesy toxinových proteinů u *Bacillus anthracis*. Nachází se v ostrovu patogenity na virulenčním plazmidu pXO1. Samotný *atxA* gen a jeho exprese je regulována teplotou, nikoliv CO_2 (Dai and Koehler, 1997). Protein AtxA působí pozitivně na geny náležící k virulenčním plazmidům pXO1 a pXO2 a také na některé geny kódované chromozomálně, avšak nejvíce regulovaných genů je kódováno plazmidy (Bourgogne et al., 2003). Protein AtxA aktivuje geny, jejichž exprese je také zesilována zvýšenou koncentrací CO_2 (geny pro toxiny a synthesu pouzdra) (Dai et al., 1995; Uchida et al., 1997).

5.2. Regulační proteiny AcpA, AcpB

AcpA a AcpB jsou regulační proteiny, které pozitivně řídí expresi genů, jejichž produkty zajišťují produkci pouzdra (*capB*, *capC*, *capA* a *dep*). Oba regulační proteiny sdílejí s regulátorem AtxA určitou sekvenční homologii. Protein AcpA je s proteinem AtxA z 25% identický v aminokyselinové sekvenci a sdílí s proteinem AtxA 47% sekvenční podobnost (danou biochemickými vlastnostmi zúčastněných aminokyselinových zbytků) (Drysdale et al., 2003). Protein AcpB sdílí s proteinem AcpA 62% sekvenční podobnost, s proteinem AtxA 50% sekvenční podobnost (Bourgogne et al., 2004). Vzájemně jsou AcpA a AcpB částečnými funkčními homology.

Exprese těchto regulačních proteinů je závislá na regulaci AtxA, který působí na expresi AcpA i AcpB pozitivně. Delece v atxA genu znamená snížení produkce AcpA a AcpB proteinů. Synthesa obou proteinů je také zesílena vzrůstající koncentrací CO_2/bikarbonátu.

5.3. Regulace produkce toxinů

Geny kódované virulenčnímu plazmidu pXO1 – *lef* a *cya*, které kódují letální faktor (LF) a edemogenní faktor (EF), a *pag* operon (*pagA* – PA a *pagR* – represor PA) jsou pozitivně regulovány proteinem AtxA. AtxA je nezbytný pro tvorbu letálního

a edemogenního toxinu (LeTx a EdTx). Kmeny s delecí *atxA* genu neprodukují toxiny (Dai and Koehler, 1997) a nejsou virulentní v myším modelu infekce. Teplota (37°C) je podstatný faktor pro expresi těchto toxinů (Sirard et al., 1994).

5.3.1. Regulace *pag* operonu

V pag operonu jsou neseny dva geny v pořadí *pagA* (PA), *pagR* (represor PA). Produkt druhého genu (downstream od *pagA* genu) *pagR*, PagR protein, je represorem, negativním zpětnovazebním regulátorem genu *pagA* (Hoffmaster and Koehler, 1999)). Gen *pagR* je kotranskribován s *pagA* genem. Transkripce probíhající monocistronně dá pouze jeden produkt, PagA (PA). Bicistronní přepis dává vzniknout dvěma produktům, jak PagA (PA), tak i PagR. Způsob transkripce závisí na sekundární struktuře 3´ terminátorové oblasti *pagA* genu. V této oblasti se nachází invertovaná sekvence, která je schopná tvořit vlásenkovou strukturu (Hoffmaster and Koehler, 1999).

Transkripce *pag* operonu je pozitivně regulována proteinem AtxA. PagR reprimuje *in vitro* expresi *pagA* genu i *atxA* genu. Kmeny *pagR*$^-$ (*pagR*-null mutace; mutace v genu, jehož přepis nevede k funkčnímu produktu) produkují vyšší množství PagA (PA) a AtxA proteinu oproti nemutovanému kmeni. Kmen kódující více kopií promotoru *pagA* genu produkuje standardní množství PA. Zesílená exprese *atxA* genu má negativní účinek na produkci PagA (PA). Represor PagR reguluje celkové množství produkovaného PagA (PA). Je možné, že účinek PagR *in vitro* a *in vivo* není totožný: LD_{50} (Lethal dose, smrtelná dávka pro 50% z testovaných objektů) pro myší model infekce se u kmenů mutantních v *pagR* genu a kmenů nemutovaných neliší (Hoffmaster and Koehler, 1999).

Gen *pagR* je regulován pozitivně CO_2/bikarbonátem (Bartkus and Leppla, 1989).

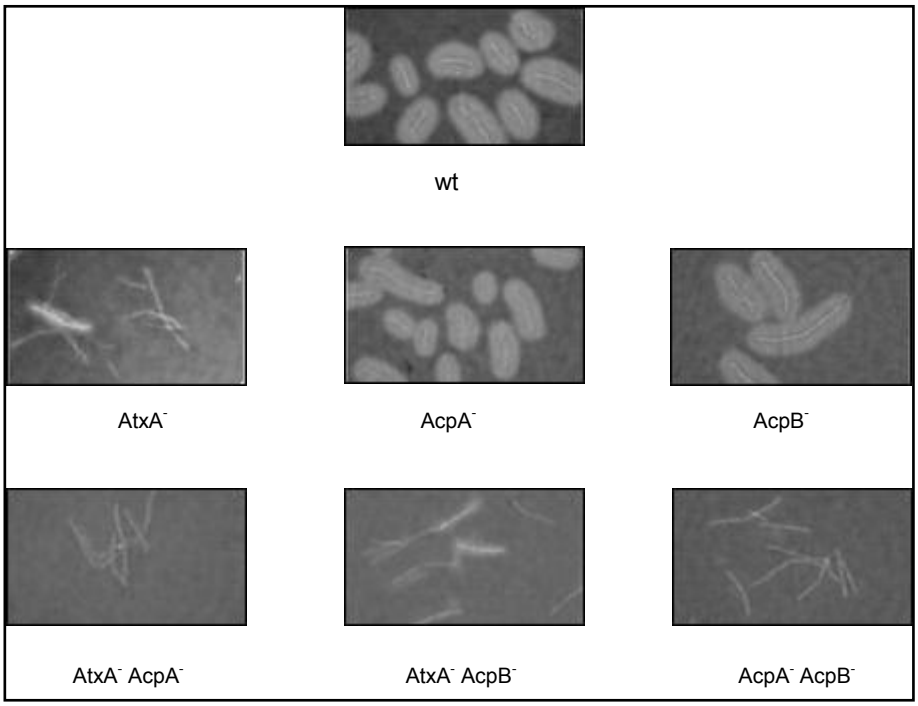
5.4. Regulace *cap* operonu

cap operon se nachází na virulenčním plazmidu pXO2, kóduje geny zodpovědné za stavbu antifagocytického pouzdra, které chrání bakteriální buňku. Jeho součástí jsou již výše zmiňované geny *capB*, *capC*, *capA* a *dep*. *cap* operon

podléhá kontrole regulačního proteinu AtxA, podobně jako geny kódující komponenty edemogenního a letálního toxinu (PA, EF a LF). Regulace exprese genů *cap* operonu AtxA proteinem je tedy pozitivní. Na rozdíl od genů pro tyto toxiny se v regulaci *cap* operonu zúčastňují ještě další regulační proteiny – AcpA a AcpB, které jsou kódované plazmidem pXO2. Na expresi genů *cap* operonu působí tyto dva regulátory také pozitivně. Skutečnost, že AtxA je aktivní i v regulaci transkripce genů *cap* operonu, potvrzuje pouze zeslabení synthesy pouzdra u kmenů s delecí v *acpA* nebo *acpB* genu (Drysdale et al., 2004). AtxA je hlavním pozitivním regulátorem genů *cap* operonu. Vliv AcpA je spíše přídatný v patogenním kmeni. Pozitivní vliv regulátoru AcpA působí viditelně až v nepřítomnosti proteinu AtxA. Protein AcpA působí s proteinem AtxA v součinnosti. Zesílení synthesy pouzdra (vedoucí patrně od zesílení synthesy prekurzoru až k viditelně tlustějšímu pouzdru) závislé na působení proteinu AtxA je nezávislé na přítomnosti AcpA. Kmeny s delecí v *atxA* genu vykazují zeslabení produkce pouzdra oproti kmenům geneticky původnímu (Drysdale et al., 2004).

Jednoduchá delece v genu *acpA* nebo v genu *acpB* (*acpA*$^-$ nebo *acpB*$^-$) nemá na produkci pouzdra význam. Efekt regulace těmito proteiny se projeví až při dvojité deleci obou těchto genů (*acpA*$^-$ *acpB*$^-$), která znamená, že pouzdro nebude synthetisováno (Drysdale, 2004). Způsob působení AcpA a AcpB byl sledován na dvojitých delečních mutantách: *atxA*$^-$ *acpA*$^-$ a *atxA*$^-$ *acpB*$^-$. Dvojitá delece *atxA*$^-$ *acpB*$^-$ má na pouzdro malý vliv, produkce pouzdra je pouze zeslabena (efekt je podobný jako u *atxA*$^-$). Dvojitá delece *atxA*$^-$ *acpA*$^-$ má zcela rozdílný efekt. Pouzdro produkováno není. Funkce regulačních proteinů AcpA a AcpB tedy není rovnocenná, tyto proteiny jsou pouze částečnými funkčními homology. Protein AcpA se podílí na pozitivní regulaci exprese genů *cap* operonu větší měrou než protein AcpB v geneticky kompletním kmeni (obr. 13).

Produkce pouzdra je ovlivněna také CO_2. Při zvětšující se koncentraci CO_2 se tloušťka pouzdra zvětšuje. Působení CO_2 je patrně uskutečňováno prostřednictvím proteinu AcpA, na který CO_2 působí také pozitivně.



Obr.13: Vizualizace synthesy pouzdra u wild type (wt) *B. anthracis* a odpovídajících mutant v genech pro regulační proteiny AtxA, AcpA a AcpB samostatně a v kombinaci. Barveno tuší (převzato z Drysdale et al., 2003).

5.5. AbrB – negativní regulátor genů pro toxiny

AbrB protein negativně reguluje expresi genů pro toxiny (*pagA*, *lef*, *cya*). *abrB* gen je kódován chromozomální DNA. Na virulenčním plazmidu pXO1 na ostrovu patogenicity se nachází sekvence shodná s chromozomálním *abrB* genem, ale produktu genu kódovanému plazmidem chybí oproti AbrB proteinu kódovanému chromozomálně 27 aminokyselin na N koncové části. Delecí chromozomálního *abrB* genu bylo docíleno častější a mohutnější exprese PA, efekt na produkci LF a EF není tak výrazný oproti PA (Saile, E. and Koehler, T.M.). Při deleci *abrB* genu neseného plazmidem pXO1 nebyla zaznamenána indukce exprese toxinů. Jako protein ovlivňující produkci toxinů lze tedy označit pouze protein, který je kódován chromozomálně.

AbrB je regulační protein, který kontroluje expresi toxinů v přechodných fázích růstu, při přechodu do exponenciální a do stacionární fáze růstu. V geneticky kompletním kmeni dosahuje produkce PA svého maxima ve fázi přechodu z exponenciální do stacionární růstové fáze. Současně hladina AbrB proteinu dosahuje maxima ve střední exponenciální fázi růstu. Z této skutečnosti by se dalo odvodit, že regulátor AbrB brzdí produkci EdTx a LeTx před exponenciální fází růstu,

má tedy za úkol načasování produkce toxinů do pozdní exponenciální růstové fáze, kdy infekce je již v pozdější fázi a vegetativní buňky *Bacillus anthracis* již invadovaly do krevního oběhu.

abrB je negativně regulován Spo0A proteinem. Rodina regulačních proteinů Spo0 se účastní v řízení sporulace. Nejvyšší produkce AbrB proteinu je načasovaná do střední exponenciální fáze růstu. Když množství regulačně aktivního Spo0A proteinu stoupá, je zaznamenán pokles množství AbrB proteinu. V kmeni s delecí *spo0A* genu je produkce AbrB vyšší a zasahuje až do stacionární fáze.

AbrB protein *Bacillus anthracis* sdílí 85% sekvenční homologii s dobře probádaným orthologem, AbrB proteinem, *Bacillus subtilis*. Mechanismus regulace tímto proteinem u *Bacillus anthracis* je předpokládán ze znalosti mechanismu regulace exprese AbrB proteinu u *Bacillus subtilis*, kde se AbrB protein přímo váže do promotorové oblasti kontrolovaných genů. N-koncová část AbrB proteinu u *Bacillus subtilis* obsahuje strukturu schopnou vázat se k DNA (Vaughn et al., 2000). Sekvence virulenčního plazmidu pXO1, na kterém se nacházejí regulované geny, obsahuje 16 potenciálních AbrB vazebných míst, z nichž některé se nacházejí v promotorových oblastech genů pro toxiny.

AbrB má zároveň malý negativní regulační účinek na expresi *atxA* (Saile and Koehler, 2002).

5.6. Germinace a sporulace

Germinace a sporulace jsou v životě *Bacillus anthracis* důležitými událostmi. Jeho schopnost po usmrcení hostitele vytvořit endospory a setrvat v půdě ve stavu dormance po dlouhou dobu znamená mimo jiné větší nezávislost na rezervoárovém zvířeti. Geny pro germinaci se nacházejí jak na chromozomu, tak i na virulenčním plazmidu pXO1 v germinačním operonu mezi *pag* operonem a *atxA* genem. Tento germinační operon je v bakteriální říši jediným dosud známým germinačním operonem nacházejícím se na plazmidové DNA. Ke germinaci obecně dochází při styku s hostitelským organismem, což je signalizováno zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého a zvýšenou teplotou – studie však naznačují, že samotná zvýšená teplota není kritickým faktorem pro úspěšnou germinaci (Sirard, et al., 1994), existuje více na sobě nezávislých recepčních systémů pro germinaci.

Studium na fůzním systému *gerX* s *lacZ* bylo zjištěno, že exprese z germinačního operonu probíhá již dvě až tři hodiny po iniciaci sporulace (Guidi-Rontani et al., 1999). Kmeny *Bacillus anthracis* mutantní v genech *gerX* operonu nevykazují tak vysokou virulenci – klíčení spor má nižší efektivitu oproti nemutovanému kmeni.

Hlavním signálem pro sporulaci je kontakt se vzduchem, resp. volným kyslíkem ve vyšší koncentraci, než je dána fyziologickým prostředím hostitele. Efektorovými členy signalizační kaskády, jsou sensorické histidin-kinasy, fosforylasy rodiny Spo0 (Bongiorni et al., 2007). Inhbičním činitelem je například Rap fosfatasa kódována plazmidem pXO1 (Bongiorni, et al., 2006). Zahrnuje také dvoukomponentové systémy. Signalizace probíhá fosforylací (defosforylací) jednotlivých členů, které se účastní regulační signalizační kaskády, a v případě podmínek nevhodných pro setrvání bakterií ve stavu vegetativní buňky (vhodných ke sporulaci) je tato kaskáda ukončena aktivací příslušných transkripčních faktorů.

6. Vakcina proti anthraxu

Anthrax byl první nemocí, proti které byla vyvinuta funkční vakcina. Tuto vakcinu zkonstruoval roku 1881 Louis Pasteur. Dodnes se ve veterinární medicíně používá kmen, který byl izolován okolo roku 1937 – „Sterne strain“. Tento kmen zkonstruoval M. Sterne (Nass, 2000). Nese jen jeden z virulenčních plazmidů, plazmid pXO1 ($pXO1^+$ $pXO2^-$), produkuje tedy pouze EdTx a LeTX, nikoliv pouzdro, které je pro úspěšnou kolonizaci hostitele rozhodující. Bezpečnější variantou této vakciny je detoxifikovaný Sterne strain, v němž byly inaktivovány geny kódující EF a LF, nedochází k produkci funkčních EF a LF (tedy nevznikají ani funkční EdTx a LeTx). Pro svou částečnou virulenci je živá vakcina nevhodná pro imunizaci lidí. Proto byla v 50. letech 20.století, po objevu toxinů, vyvinuta bezbuněčná vakcina. Imunizační efekt této vakciny je založen na podání PA jako imunogenního proteinu. Použití PA je bezpečné, nicméně živá vakcina poskytuje nositeli větší ochranu. Pro účinnější imunizaci je nutné použít ve vakcíně více imunogenních proteinů z *Bacillus anthracis* než jen PA. Z tohoto důvodu byla do bezbuněčné vakciny přidána další imunizující složka, LF. Některé používané vakciny jsou uvedeny na obr. 14. Další

vhodné struktury pro konstrukci vakciny se hledají zejména z produktů virulenčního plazmidu pXO1 (Ariel et al., 2002).

Agent	Vaccine name	Antigen	Year(s) developed
Anthrax	Live Spore Vaccine	Whole spore, attenuated	1937
	Anthrax Vaccine, Adsorbed	PA	1960s
	United Kingdom Vaccine	PA, LF	1950s

Obr.14: Některé používané vakciny proti anthraxu: jméno, antigen, rok vyvinutí (převzato z Cieslak et al., 2000).

7. Anthrax a bioterorismus

Spory *Bacillus anthracis* se ukázaly být účinným nástrojem bioterorismu. V nedávné minulosti, v letech 2001-2003 byly zneužity spory *Bacillus anthracis* teroristy k útokům na vládní činitele Spojených států amerických (Guarner et al., 2003). Spory byly rozesílané poštou v obálkách. Nebezpečí těchto útoků spočívá v tom, že že se spory dostanou do vzduchu a mohou být vdechnuty. Po vdechnutí spor dochází k inhalační formě anthraxu, jak je uvedeno v kapitole 2.1. Ačkoliv je *Bacillus anthracis* dobře citlivý k antibiotické léčbě (penicilinová antibiotika; ciprofloxacin, doxycyklin, erytromycin, chloramfenikol, aminoglykosidy, vankomycin), podaná antibiotika usmrtí jen živé bakterie v hostiteli. Toxiny (EdTx, LeTx) vyprodukované bakteriemi před podáním antibiotika dále působí i po usmrcení bakterií. Proto léčba antibiotiky v pokročilé fázi onemocnění nebývá účinná. V souvislosti s hrozbou útoků touto biologickou zbraní bylo uvažováno o alternativním způsobu léčby postižených osob. V tomto způsobu léčby by měly být použity protilátky proti imunogenním částicím *Bacillus anthracis* (PA), které jsou izolovány z krevní plazmy dobrovolných dárců z řad vojáků armády USA, kteří podstoupili vakcinaci (Enserink, 2002). Je pouze otázkou, je-li tento způsob léčby vhodný, bude-li možné tímto způsobem vyprodukovat dostatečné množství protilátek a pro jaký počet osob by byla tato léčba dostupná.

Okolo případu „Anthrax v obálkách“, spor *Bacillus anthracis* rozesílaných poštou byly vedeny diskuse v souvislosti s jejich původem. Na jedné straně stála domněnka, že spory *Bacillus anthracis* pocházely z „domácí“ laboratoře. Zjistilo se, že byly spory obohaceny o silikátové částice („polymerized glass“, „sol gel“, „spin-on-glass“; o velikosti řádově v nanometrech), které se nacházely na povrchu spor a tím zabraňovaly vzájemné adhesi jednotlivých spor. Takto upravené spory mohly být dobře přenášeny vzduchem, na rozdíl od neupravených spor. Spory *Bacillus anthracis* tedy patrně pocházely z dobře vybavené laboratoře a při přípravě sporové suspenze byly použity pokročilé postupy (Matsumoto, 2003).

V souvislosti s těmito útoky a následnými úmrtími na anthrax byl urychlen vývoj přístroje pro rychlou detekci spor *Bacillus anthracis*. Jedním ze zdařilých pokusů se stal přenosný laserový detektor (vyvinul R. Van Duyene, Service, 2005). Metoda detekce se nazývá „Surface-enhanced Raman spectroscopy“ (SERS). Vzorek je položen na kovovou destičku, která má drsný povrch, a je osvícen. Drsný povrch je určen k lepšímu osvětlení vzorku, odraz světla od drsné destičky zintenzivňuje elektromagnetické pole obklopující vzorek. Paprsek dojde ke vzorku a odrazí se od něj. Po nárazu paprsku na vzorek SERS sleduje posun vlnové délky světla od původní vlnové délky. Na základě změny intenzity paprsku a změny vlnové délky jsou naměřené hodnoty srovnány se známými hodnotami standardů látek. Tak je určeno chemické složení látky. Jako specifická látka, která má indikovat přítomnost spor *Bacillus anthracis*, byl zvolen kalcium dipikolinát, látka obsažená v bakteriálních endosporách. Tento přístroj je schopen vyhodnotit vzorek v několika minutách (Service, 2005).

8. Závěr

Ačkoliv dnes již běžné bakteriální infekce zpravidla nepředstavují fatální hrozbu, jak tomu bylo v minulosti zejména před objevením antibiotik, téma anthraxu je vzhledem k mezinárodním teroristickým útokům stále aktuální. Hrozba plošného použití spor *Bacillus anthracis* jako biologické zbraně motivuje k hlubšímu poznání tohoto organismu pro vývoj bezpečné a účinné preventivní ochrany a efektivní léčby. Znalost mechanismů podílejících se na regulaci virulence je důležitou součástí tohoto

úsilí a může v budoucnosti znamenat lepší schopnost preventivní ochrany před patogenním organismem. V neposlední řadě nám rozmanitost regulace dává najevo, o jak komplexní a dokonalé organismy v případě bakterií jde. Dnešní znalosti v tomto oboru mohou zaujímat pouhý zlomek celkové obsažnosti, kterou regulace virulence *Bacillus anthracis* zaujímá.

9. Seznam použité literatury

Ariel, N., Zvi, A., Grosfeld, H., Gat, O., Inbar, Y., Velan, B., Cohen, S. and Shafferman, A. (2002); Search for Potential Vaccine Candidate Open Reading Frames in the *Bacillus anthracis* Virulence Plasmid pXO1: In Silico and In Vitro Screening; Infection and Immunity, 70:6817–6827.

Bartkus, J.M. and Leppla, S.H. (1989); Transcriptional Regulation of the Protective Antigen Gene of *Bacillus anthracis*; Infection and Immunity, 57:2295-2300.

Böhm, R., Cosivi, O., Doganay, M., Hugh-Jones, ME., Joshi, D.D., Lalitha, MK. and de Vos, V. (1998); Guidelines for the Surveillance and Control of Anthrax in Humans and Animals; WHO/EMC/ZDI./98.6.

Bongiorni, C., Stoessel, R., Shoemaker, D. and Perego, M. (2006); Rap Phosphatase of Virulence Plasmid pXO1 Inhibits *Bacillus anthracis* Sporulation; Journal of Bacteriology, 188:487–498.

Bongiorni, C., Stoessel, R. and Perego, M. (2007); Negative regulation of *Bacillus anthracis* sporulation by the Spo0E family of phosphatases; Journal of Bacteriology, 189:2637–2645.

Bourgogne, A., Drysdale, M., Hilsenbeck, S.G., Peterson, S.N. and Koehler, T.M. (2003); Global Effects of Virulence Gene Regulators in a *Bacillus anthracis* Strain with Both Virulence Plasmids; Infection and Immunity, 71:2736–2743.

Brittingham, K.C., Ruthel, G., Panchal, R.G., Fuller, C.L., Ribot, W.J., Hoover, T.A., Young, H.A., Anderson, A.O. and Bavari, S. (2005); Dendritic Cells Endocytose *Bacillus anthracis* Spores: Implications for Anthrax Pathogenesis; The Journal of Immunology, 174:5545– 5552.

Burnham Institute for Medical Research, www.burnham.org.

Cieslak, TJ., Christopher, G.W., Kortepeter, M.G., Rowe, J.R., Pavlin, J.A., Culpepper, R.C. and Eitzen, E.M. Jr. (2000); Immunization against Potential Biological Warfare Agents; Clinical Infectious Diseases, 30:843–50.

CDC, Center for Disease Kontrol and Prevention, www.bt.cdc.gov.

Collins, P.M.; Anthrax: The latest bomb scare (2001); Virginia Department of Emergency Management, www.vaemergency.com.

Cote, Ch.K., Van Rooijen, N. and Welkos, S.L. (2006); Roles of Macrophages and Neutrophils in the Early Host Response to *Bacillus anthracis* Spores in a Mouse Model of Infection; Infection and Immunity, 74:469–480.

Dai, Z., Sirard, J.C., Mock, M. and Koehler, T.M. (1995); The atxA gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence; Molecular Microbiology, 16:1171-81.

Dai, Z. and Koehler, T.M. (1997); Regulation of Anthrax Toxin Activator Gene (*atxA*) Expression in *Bacillus anthracis*: Temperature, Not CO_2/Bicarbonate, Affects AtxA Synthesis; Infection and Immunity, 65:2576–2582.

Dixon, T.C., Fadl, A.A., Koehler, T.M., Swanson, J.A. and Hanna, P.C. (2000); Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape; Cellular Microbiology, 2:453-463.

Drysdale, M., Bourgogne, A., Hilsenbeck, S.G. and Koehler, T.M. (2004); *atxA* Controls *Bacillus anthracis* Capsule Synthesis via acpA and a Newly Discovered Regulator, *acpB*; Journal of Bacteriology, 186:307–315.

Ezzell, J.W. Jr. and Abshire, T.G. (1988); Immunological Analysis of Cell-Associated Antigens of *Bacillus anthracis*; Infection and Immunity, 56:349-356

Groisman, E.A. and Ochman, H. (1996); Pathogenicity Islands: Minireview Bacterial Evolution in Quantum Leaps; Cell, 87:791–794.

Guarner, J., Jernigan, J.A., Shieh, W-J., Tatti, K., Flannagan, L.M., Stephens, D.S., Popovic, T., Ashford, D.A., Perkins, B.A. and Zaki, S.R. (2003); Pathology and Pathogenesis of Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax; American Journal of Pathology, 163:2.

Guidi-Rontani, Ch., Pereira, Y., Ruffie S., Sirard, J.C., Weber-Levy, M. and Mock, M. (1999); Identification and characterization of a germination operon on the virulence plasmid pXOI of *Bacillus anthracis*; Molecular Microbiology, 33:407-414.

Gunnar von Hejkne (2005); Translocation of Anthrax Toxin: Lord of the Rings; Science, 309:709-710.

Hacker, J. and Kaper, J.B. (2000); Pathogenicity islands and the evolution of microbes; Annual Review Microbiology, 54:641-79.

Hoffmaster, A.R. and Koehler, T.M. (1997); The Anthrax Toxin Activator Gene *atxA* Is Associated with CO2-Enhanced Non-Toxin Gene Expression in *Bacillus anthracis*; Infection and Immunity, 65:3091–3099.

Hoffmaster, A.R. and Koehler, T.M. (1999); Autogenous Regulation of the *Bacillus anthracis pag* Operon; Journal of Bacteriology, 181:4485–4492.

Koehler,T.M., Dai, Z. and Kaufman-Yarbray, M. (1994); Regulation of the *Bacillus anthracis* Protective Antigen Gene: CO2 and a trans-Acting Element Activate Transcription from One of Two Promoterst; Journal of Bacteriology, 176:586-595.

Krantz, B.A., Melnyk, R.A., Zhang, S., Juris, S.J., Lacy, D.B., Wu, Z., Finkelstein, A. and Collier, R.J. (2005); A Phenylalanine Clamp Catalyzes Protein Translocation Through The Anthrax Toxin Pore (Supporting Online Materials); Science, 309:777 – 781.

Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Melnyk, R.A., Harrison, S.C. and Collier, R.J. (2004); Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: A role for receptor in pH-dependent pore formation; PNAS, 101:36.

Makino, S-I., Uchida, I., Terakado, N., Sasakawa, Ch. and Yoshikawa, M. (1989); Molecular Characterization and Protein Analysis of the cap Region, Which Is Essential for Encapsulation in *Bacillus anthracis*; Journal of Bacteriology, 171:722-730.

Enserink, M. (2002); 'Borrowed Immunity' May Save Future Victims; Science, 295:777.

Matsumoto, G. (2003); Anthrax Powder: State of the Art?; Science, 302:1492-1497.

Mock, M. and Fouet, A. (2001); Anthrax; Annual Review Microbiology, 55:647-671.

Nass, M. (2000); Biological Warfare and Vaccines: Anthrax; Applied Science and analysis, www.asanltr.com.

Okinaka, R.T., Cloud, K., Hampton, O., Hoffmaster, A.R., Hill, K.K., Keim, P., Koehler, T.M., Lamke, G., Kumano, S., Mahillon, J., Manter, D., Martinez, Y., Ricke, D., Svensson, and Jackson, P.J. (1999); Sequence and Organization of pXO1, the Large *Bacillus anthracis* Plasmid Harboring the Anthrax Toxin Genes; Journal of Bacteriology, 181:6509–6515.

Pannifer, A.D., Wong, T.Y., Schwarzenbacher, R., Renatu, M., Petosa, C., Bienkowska, J., Lacy, D.B., Collier, R.J., Park, S., Leppla, S.H., Hanna, P. and Liddington, R.C. (2001); Crystal structure of the anthrax lethal factor; Nature, 414:229-233.

Saile, E. and Koehler, T.M. (2002); Control of Anthrax Toxin Gene Expression by the Transition State Regulator *abrB;* Journal of Bacteriology, 184:370–380.

Service, R.F. (2005); Fast, Sensitive Scan Targets Anthrax; Science, 308:45.

Singh, Y., Klimpel, K.R., Arora, N., Sharma, M. and Leppla, S.H. (1994); The Chymotrypsin-sensitive Site FFD315, in Anthrax Toxin Protective Antigen Is Required for Translocation of Lethal Factor; The Journal of Biological Chemistry, 266:15493–15497.

Sirard, J-C., Mock, M. and Fouet, A. (1994); The Three *Bacillus anthracis* Toxin Genes Are Coordinately Regulated by Bicarbonate and Temperature; Journal of Bacteriology, 176:5188-5192.

Tufts University, www.tufts.edu/med/biochemistry/faculty/bohm/bohm.html.

Uchida, I., Makino, S., Sekizaki, T. and Terakado, N. (1997); Cross-talk to the genes for *Bacillus anthracis* capsule synthesis by *atxA*, the gene encoding the trans-activator of anthrax toxin synthesis; Molecular Microbiology, 23:1229-1240.

Urushibata,Y., Tokuyama, S. and Tahara, Y. (2002); Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* Gene, Involved in γ-Polyglutamic Acid Production; Journal of Bacteriology, 184:337–343.

Vaughn, J.L., Feher, V., Naylor, S., Strauch, M.A. and Cavanagh, J. (2000); Novel DNA binding domain and genetic regulation model of *Bacillus subtilis* transition state regulator AbrB; Nature structural biology, 7:1139-1146.

Votava, M a kol. (2006); Lékařská mikrobiologie speciální;Brno, Neptun.

Werner, E., Kowalczyk, A.P., and Faundez, V. (2006); Anthrax Toxin Receptor 1/Tumor Endothelium Marker 8 Mediates Cell Spreading by Coupling Extracellular Ligands to the Actin Cytoskeleton; The Journal of Biolobical Chemistry, 281:23227–23236.