

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Veronika Kincová**

**Role proteinu BopN v sekrečním aparátu typu 3 u bakterií  
rodu *Bordetellae***

BopN function in the *Bordetella* type III secretion system

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jana Kamanová, Ph.D.

Praha, 2018

Tato diplomová práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i. v Praze.

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne 13. srpna 2018

Bc. Veronika Kincová

*Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Janě Kamanové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost, cenné rady a zkušenosti, které mi předávala po celou dobu studia.*

*Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře prof. Ing. Petrovi Šebovi CSc. za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR. Také děkuji všem mým kolegům, kteří mi kromě rad a zkušeností vytvořili příjemné pracovní prostředí.*

*V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině za podporu během celého mého studia.*

**Abstrakt:**

Bakterie rodu *Bordetella* jsou původci vysoce nakažlivého černého kašle u lidí (*B. pertussis*, *B. parapertussis*) nebo respiračních onemocnění u ostatních savců (*B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*). Jedním z faktorů virulence rodu *Bordetella* je i sekreční systém typu 3 (T3SS), který slouží k dopravě efektorových proteinů přímo z cytozolu bakterie do cytozolu eukaryotické buňky. Protein BopN je substrátovým proteinem T3SS, jemuž je přisuzována efektorová funkce. Nicméně proteiny homologní proteinu BopN u jiných bakterií zprostředkovávají regulaci hierarchické sekrece skrze T3SS a některé z nich jsou zodpovědné i za inhibici sekrece skrze T3SS v prostředí s 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , např. v tělních tekutinách hostitele, pokud ještě nedošlo ke kontaktu bakterie s cílovou buňkou. Tato práce se zabývá funkcí proteinu BopN a rovněž rolí vápenatých iontů v aktivitě T3SS u *B. bronchiseptica*. Aktivita T3SS v médiu bez vápníku a po přidavku 2 mM vápníku byla stanovena 2 nezávislými metodami. Bylo zjištěno, že 2 mM přídavek vápníku vede ke snížení sekrece T3SS reportéru do média a tato regulace je závislá na přítomnosti proteinu BopN. Podobný vliv vápenatých iontů na sekreci skrze T3SS byl pozorován i pomocí hmotnostní spektrometrie. BopN protein reguloval mobilizaci a sekreci translokátorového proteinu T3SS, BopD. Role proteinu BopN v sekreci T3SS efektoru BteA nebyla pozorována. Tato data naznačují regulační roli proteinu BopN ve funkci T3SS u *B. bronchiseptica*.

**Klíčová slova:**

protein BopN, sekreční systém typu 3, *Bordetella bronchiseptica*, vápenaté ionty, homologní rekombinace, reportérový systém pro monitorování sekreční aktivity, hmotnostní spektrometrie



**Abstract:**

Species of the *Bordetella* genus cause the highly contagious whooping cough disease in humans (*B. pertussis*, *B. parapertussis*) and related respiratory diseases in other mammals (*B. bronchiseptica*, *B. parapertussis*). One of the virulence systems of *Bordetellae* is the type III secretion system (T3SS) employed for translocation of effector proteins directly from bacterial cytosol into the cytosol of host cells. The T3SS protein BopN protein has been categorized as a *Bordetella* effector protein. Nevertheless, the homologous proteins in other gram-negative bacteria function in establishing the secretion hierarchy through T3SS and some of them block T3SS secretion in high calcium environments before bacteria-host cell contact has been established. In this thesis I examined the function of the BopN protein and the role of calcium ions in T3SS activity of *B. bronchiseptica*. Two independent methods have been used for determination of T3SS secretion activity. Addition of 2 mM calcium ions into bacterial media decreased secretion of the T3SS reporter, while no such effect was observed in a *B. bronchiseptica* strain lacking the *bopN* gene. Mass spectrometry data confirmed the inhibition of T3SS activity in the presence of calcium ions. Enhanced calcium levels resulted in decreased mobilization and secretion of the T3SS translocator protein BopD, while secretion of the BteA effector protein was unaffected. Deletion of the *bopN* gene then reversed the effect of calcium ions on T3SS secretion activity. Our data suggest a regulatory role of BopN protein in the function of *B. bronchiseptica* T3SS.

**Key words:**

protein BopN, type III secretion system, *Bordetella bronchiseptica*, calcium ions, homologous recombination, reporter system for monitoring of secretion activity, mass spectrometry

## Obsah

Seznam použitých zkratk.....	9
1 Úvod.....	10
2 Cíle práce .....	11
3 Přehled literatury .....	12
3.1 Rod <i>Bordetellae</i> .....	12
3.1.1 Klasické druhy rodu <i>Bordetellae</i> .....	12
3.1.1.1 <i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	12
3.1.1.2 <i>Bordetella pertussis</i> .....	14
3.1.1.3 <i>Bordetella parapertussis</i> .....	15
3.1.2 Ostatní druhy rodu <i>Bordetellae</i> .....	16
3.2 BvgAS zprostředkovaná regulace u rodu <i>Bordetellae</i> .....	17
3.3 Faktory virulence u klasických druhů rodu <i>Bordetellae</i> .....	19
3.3.1 Filamentózní hemaglutinin .....	19
3.3.2 Fimbrie.....	20
3.3.3 Pertaktin.....	20
3.3.4 Adenylát cyklázový toxin .....	21
3.3.5 Pertusový toxin.....	22
3.3.6 Dermonekrotický toxin.....	23
3.3.7 Tracheální cytotoxin .....	23
3.3.8 Lipopolysacharid.....	24
3.3.9 Sekreční systém typu 3.....	24
3.4 Sekreční systém typu 3.....	24
3.4.1 Stavba sekrečního systému typu 3.....	25
3.4.2 Mechanismus sekrece pomocí sekrečního systému typu 3.....	28
3.4.3 Sekreční systém typu 3 u rodu <i>Bordetellae</i> .....	29
3.4.3.1 Role sekrečního systému typu 3 v průběhu infekce .....	29
3.4.3.2 Regulace exprese sekrečního systému typu 3 .....	30
3.4.3.3 Komponenty sekrečního systému typu 3 .....	32
3.5 Protein BopN .....	34
3.5.1 Role proteinu BopN v průběhu infekce <i>B. bronchiseptica</i> .....	34
3.5.2 Struktura proteinu BopN a jeho homologie.....	35

3.5.3	Biologická funkce homologů proteinu BopN .....	36
3.5.3.1	Protein YopN u bakterií rodu <i>Yersinia</i> .....	36
3.5.3.2	Protein MxiC bakterie <i>Shigella flexnerii</i> .....	37
3.5.3.3	Protein CopN bakterie <i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	37
4	Materiál a metodika.....	38
4.1	Přístrojové vybavení, chemikálie a ostatní materiál.....	38
4.1.1	Přístrojové vybavení.....	38
4.1.2	Seznam použitých chemikálií, komerčních sad a ostatního materiálu .....	39
4.1.3	Seznam použitých enzymů.....	42
4.1.4	Seznam použitých protilátek a sér a jejich ředění.....	42
4.1.5	Seznam použitých primerů .....	43
4.1.5.1	Primery použité při konstrukci plazmidů .....	43
4.1.5.2	Sekvenační primery.....	44
4.1.6	Použité roztoky a pufry .....	44
4.1.7	Použitá kultivační média.....	49
4.1.8	Použité plazmidy.....	52
4.1.9	Použité bakteriální kmeny .....	52
4.1.10	Použitý software.....	53
4.2	Metody .....	54
4.2.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	54
4.2.2	Elektroforéza v agarózovém gelu .....	54
4.2.3	Izolace DNA pomocí komerční sady Geneaid.....	55
4.2.4	Štěpení DNA pomocí restrikčních endonukleáz .....	55
4.2.5	Ligace DNA fragmentů pomocí T4 ligázy.....	56
4.2.6	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i> XL-1 Blue a <i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir .....	56
4.2.7	Transformace plazmidu metodou teplotního šoku .....	57
4.2.8	Minipreparace plazmidové DNA .....	57
4.2.9	Příprava sekvenační reakce a sekvenace DNA .....	58
4.2.10	Uchovávání bakteriálních kmenů <i>B. bronchiseptica</i> .....	58
4.2.11	Kultivace bakteriálních kmenů <i>B. bronchiseptica</i> .....	58
4.2.12	Konjugace plasmidu pBBRI do <i>B. bronchiseptica</i> .....	59
4.2.13	Homologní rekombinace v <i>B. bronchiseptica</i> .....	59

4.2.14	Precipitace supernatantu bakteriální kultury pomocí kyseliny trichlorooctové kyseliny (TCA).....	59
4.2.15	Měření proteinové koncentrace metodou dle Bradfordové.....	60
4.2.16	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	60
4.2.17	Western blot.....	61
4.2.18	Stanovení adenylát cyklázové aktivity.....	62
4.2.19	Hmotnostní spektrometrie.....	63
4.2.19.1	Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii .....	63
4.2.19.2	Hmotnostní spektrometrie a vyhodnocení dat.....	65
5	Výsledky .....	66
5.1	Konstrukce kmenů s delecí v genech <i>bopN</i> , <i>bscN</i> a <i>bteA</i> .....	66
5.1.1	Příprava kmene s delecí genu <i>bopN</i> .....	67
5.1.2	Příprava kmene s delecí genu <i>bscN</i> .....	71
5.1.3	Příprava kmene s delecí genu <i>bteA</i> .....	74
5.1.4	Sekvenace vytvořených kmenů .....	77
5.1.5	Ověření vytvořených kmenů metodami SDS-page a Western Blot .....	77
5.2	Navržení a konstrukce reportérových kmenů .....	80
5.2.1	Konstrukce plazmidů pBBRI obsahující reportérové geny .....	81
5.2.2	Detoxifikace kmenů nesoucích delecí genů <i>bteA</i> a <i>bscN</i> .....	87
5.2.3	Delece genu <i>bopN</i> v detoxifikovaném kmeni $\Delta bteA$ .....	93
5.2.4	Vnesení reportérových plazmidů pBBRI do detoxifikovaných kmenů.....	94
5.3	Regulace aktivity sekrečního systému typu 3 v médiu v závislosti na vápenatých iontech a role proteinu BopN v této regulaci .....	94
5.3.1	Stanovení s využitím reportérových kmenů .....	94
5.3.2	Stanovení za pomoci hmotnostní spektrometrie .....	100
6	Diskuze .....	104
7	Souhrn.....	108
8	Seznam použité literatury.....	110

## Seznam použitých zkratek

AC	adenylát cyklázová doména
ACT	adenylát cyklázový toxin
Amp	ampicilin
BG	Bordet-Gengou médium
Cm	chloramfenikol
Cphx	cefalexin
DNT	dermonekrotický toxin
FHA	filamentózní hemaglutinin
FIM	fimbrie
IL	interleukin
Km	kanamycin
LC-MS	kapalinová chromatografie propojená s hmotnostním spektrometrem
LB	Luria-Bertani médium
LPS	lipopolysacharid
Neo	neomycin
NF- $\kappa$ B	transkripční faktor, z ang. „nuclear factor $\kappa$ B“
pb	pár bází
PRN	pertaktin
PT	pertusový toxin
RT	pokožová teplota, z angl. „room temperature“
RTX	motiv vyskytující se v bakteriálních toxinech, z angl. „repeat-in-toxin“
SDS	dodecylsírán sodný
SS	Stainer-Scholte médium
Str	streptomycin
TEM	enzym $\beta$ -laktamáza
TCT	tracheální cytotoxin
T3SS	sekreční systém typu 3

# 1 Úvod

Cílem předkládané diplomové práce bylo charakterizovat roli proteinu BopN bakterie *Bordetella bronchiseptica* v sekreci skrze sekreční systém typu 3 (T3SS). Protein BopN se skládá z 364 aminokyselin a napříč gram-negativními bakteriemi má BopN mnoho homologních proteinů. Jedním z nich je i protein nacházející se u bakterií rodu *Yersiniae*, YopN. Funkce proteinu YopN je regulace sekrece skrze T3SS, přičemž jeho delece způsobí konstitutivní sekreci efektorů T3SS do média a ztrátu polarizované translokace po kontaktu s eukaryotickou buňkou. Byl popsán i vliv vápníku na sekreci efektorových proteinů, přičemž zvýšená koncentrace vápníku v kultivačním médiu inhibovala sekreci efektorů skrze T3SS. Pokud byl ale deletován gen *yopN* nebo jiný gen jehož protein vytváří komplex mající regulační aktivitu T3SS, k inhibici sekrece v přítomnosti vápenatých iontů nedocházelo. Dle literatury je proteinu BopN přisuzována funkce efektoru translokovaného do eukaryotické buňky. V eukaryotické buňce by protein BopN měl modulovat prozánětlivou signalizaci jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) blokadí jaderné translokace podjednotky NF- $\kappa$ B65 při současném umožnění translokace podjednotky NF- $\kappa$ B50. Toto by následně mělo vést ke zvýšení produkce protizánětlivého cytokinu interleukinu 10. Dále byl v literatuře popsán pomocný efekt proteinu BopN na cytotoxicitu zprostředkovanou jiným efektozem T3SS *Bordetellae*, a to efektozem BteA. Na základě těchto informací vyvstala otázka, zda je protein BopN regulátorem sekrece efektorů skrze T3SS a popsané efekty na buněčnou signalizaci jsou zprostředkované nebo zda je translokován jako další z efektorů přímo do cytozolu hostitelské buňky. Avšak není vyloučena ani duální role toho proteinu.

Cílem této diplomové práce bylo přispět k objasnění funkce proteinu BopN vytvořením reportérového systému, který bude později využit k monitorování translokace efektorových proteinů T3SS do cytozolu buněk a charakterizovat roli proteinu BopN v sekreci T3SS do média. Objasnění funkce proteinu BopN může vést k lepšímu porozumění funkce T3SS u *Bordetellae*. Může tak dojít k porozumění vztahů mezi jednotlivými proteiny podílející se jak na výstavbě T3SS, tak i na sekreci skrze tento sekreční systém. T3SS je bezpochyby jedním z faktorů virulence u bakterií rodu *Bordetellae*, které jsou patogeny zvířat i lidí se značným klinickým i hospodářským významem.

## 2 Cíle práce

- 1) Zkonstruovat kmen bakterie *Bordetella bronchiseptica* D445 s deletovaným genem *bopN* a rovněž kmeny s delecemi v genech *bscN* a *bteA*, které budou sloužit jako experimentální kontroly
- 2) Navrhnout a vytvořit reportérové systémy pro sledování aktivity sekrečního systému typu 3 tak, aby bylo umožněno stanovit sekreci substrátových proteinů T3SS do média a později i translokaci efektorů do cytozolu eukaryotických buněk
- 3) Objasnit vliv vápenatých iontů na sekreci skrze sekreční systém typu 3 do média a určit roli proteinu BopN v této regulaci

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Rod *Bordetellae*

Rod *Bordetellae* zahrnuje množství klinických a řadu přírodních izolátů identifikovaných na základě fylogenetické analýzy dle 16S rRNA. Tyto gram-negativní, obligátně aerobní bakterie osidlují široké spektrum ekologických nik čítajících vodu, půdu nebo rostliny, ale i respirační trakt ptáků a savců, včetně člověka (Hamidou Soumana *et al.*, 2017).

#### 3.1.1 Klasické druhy rodu *Bordetellae*

Mezi takzvané klasické druhy *Bordetellae* se značným klinickým významem patří *B. bronchiseptica*, *B. parapertussis* a *B. pertussis*. Sekvenování genomu těchto tří druhů ukázalo nezávislost vývoje *B. parapertussis* a *B. pertussis* ze společného předka *B. bronchiseptica* (Parkhill *et al.*, 2003).

##### 3.1.1.1 *Bordetella bronchiseptica*

*Bordetella bronchiseptica* byla popsána jako patogenní bakterie po izolaci z respiračního traktu psů v roce 1910 a byla pojmenována jako *Bacillus bronchicanis* (Ferry, 1910 dle Goodnow, 1980). V průběhu let byla následně ještě několikrát přejmenována, až v roce 1952 ji Manuel Moreno Lopéz pojmenoval jako *Bordetella bronchiseptica* (Lopéz 1952 dle Goodnow, 1980). *B. bronchiseptica* je gram-negativní, nesporeující, pleomorfní kokobacil a její pohyblivost je dána přítomností bičíků v peritrichu. Z biochemického hlediska nemetabolizuje glukózu a dokáže růst na médiu s kombinací aminokyselin (kyselina glutamová, prolin, leucin), nebo na médiu obsahující citrát, nebo laktát. Optimální růstová teplota se pohybuje okolo 35-37 °C a kolonie jsou viditelné po 40-72 hodinách (Proom, 1955). Disponuje všemi faktory virulence (3.3), kromě pertusového toxinu (Arico a Rappuoli, 1987).



*B. bronchiseptica* je patogenní bakterie s širokým spektrem hostitelů zahrnující různé druhy savců včetně člověka. *B. bronchiseptica* způsobuje tracheobronchitidu projevující se jako kašel u psů. Mikroskopické nálezy mohou být dvojího typu: ohniskové degenerace řasinkového epitelu průdušnice s nekrózami bez výrazného počtu makrofágů a lymfocytů, anebo jako přítomnost mukopurulentního exsudátu v lumen dýchacích cest s velkým počtem polymorfonukleárních leukocytů. Infekce bývá také komplikována pneumonií (Mattoo a Cherry, 2005). Pomocí elektronového mikroskopu byly vizualizovány bakterie na řasinkovém epitelu průdušnice respiračního traktu psů, kde po přichycení způsobovaly inhibici pohybu řasinek. Napadené řasinky byly slepeny dohromady a jejich pohyb byl výrazně zpomalen (Bemis a Kennedy, 1981). Dalším možným hostitelem je prase, u kterého infekce dýchacích cest způsobuje atrofickou rýmu projevující se zkroucením nebo zkrácením nosu, kýcháním a celkovým zpomalením růstu. Infekce je doprovázena epiteliální hyperplazií a dysplazií, zvýšením produkce hlenu a počtu epiteliálních cyst. Prasata kolonizovaná bakteriemi *B. bronchiseptica* jsou predisponovaná k infekci dalšími patogeními bakteriemi (Magyar et al., 1988). Dalšími hostiteli jsou laboratorní zvířata: myši, krysy, opice, králíci a morčata. Infekce dýchacích cest králíka se projevují kýcháním, výtokem z nosu, ztrátou hmotnosti a nechutí k jídlu (Oldenburg, 1972 dle Goodnow, 1980). U morčat se může projevit i zánět středouší (Boot a Walvoort, 1986). Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem je *B. bronchiseptica* vhodným modelovým patogenem pro studium přirozeného průběhu infekce u řady živočichů a získaná data nejsou zkreslena nevhodným infekčním modelem. Ojediněle může být hostitelem i člověk. V literatuře bylo popsáno několik případů potvrzujících kolonizaci člověka bakteriemi *B. bronchiseptica*, a to nejčastěji u ošetřovatelů zvířat (M'Gowan, 1911; Winsser, 1960 dle Woolfrey a Moody, 1991). Bakterie byla také izolována z dýchacího traktu pacienta s akutní bronchitidou a pneumonií. Tento pacient také trpěl chronickou lymfocytární leukémií a podstoupil chemoterapeutickou léčbu (Papasian et al., 1987). Jiný případ popisuje pozitivní nález *B. bronchiseptica post mortem* ve vzorku sleziny, jater a v krevním vzorku i u pacienta, který ale nebyl v kontaktu s infekčním zvířetem (Katzenstein et al., 1984). V kontaktu se psem trpícím rozvinutým kašlem, na který následně zemřel, byla pacientka s Hodgkinovým lymfomem, pneumonií a pleurální infekcí (Stoll et al., 1981). Projevy dávivého kašle vykazovaly děti z rodiny farmářů poté,

co jejich zvířata zemřela na respirační infekci (Kristensen, 1962 dle Woolfrey a Moody, 1991).

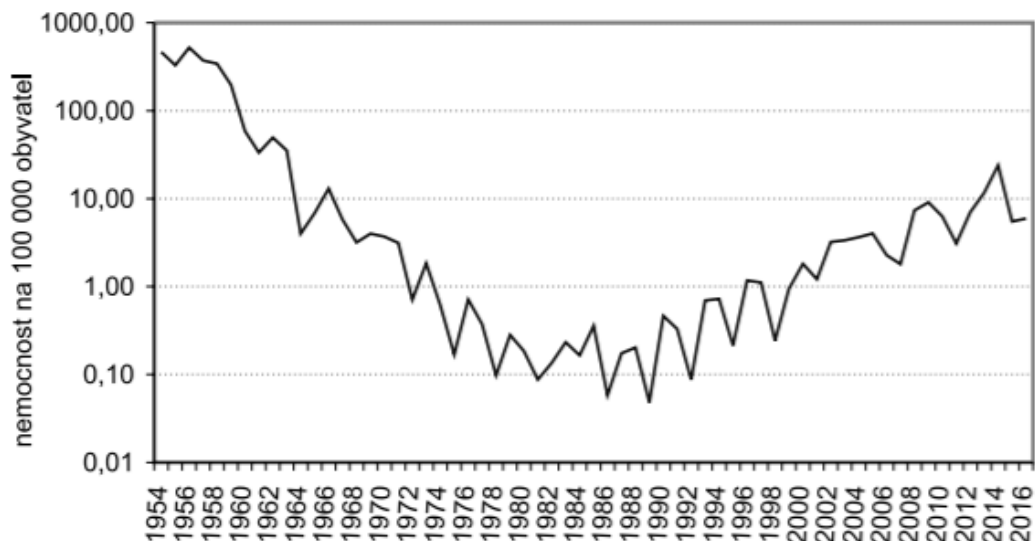
### **3.1.1.2 *Bordetella pertussis***

*Bordetella pertussis* je nepohyblivá bakterie, jejímž hostitelem je výhradně člověk. Poprvé byla izolována v roce 1906 na speciálním médiu, jež se používá dodnes pod názvem Bordet-Gengou (BG) (Bordet, 1906 dle Guiso, 2014).

*B. pertussis* způsobuje onemocnění zvané dávivý nebo také černý kašel, šířící se kapénkovou infekcí. Po přenosu dochází k adhezi bakterií k řasinkám epitelu horních a dolních dýchacích cest, lokálnímu poškození sliznice a projevům příznaků respiračního onemocnění. Inkubační doba trvá 7 až 10 dnů a celková doba onemocnění může přesáhnout i 12 týdnů. Dávivý kašel se typicky projevuje ve 3 stádiích označovaných katarální, paroxysmální a rekonvalescentní. První stádium symptomaticky připomíná obyčejné nachlazení bez přítomnosti horečky. Až po dvou týdnech nastává paroxysmální fáze, která je charakterizovaná urputným kokrhavým kašlem. Toto stádium je spojeno s cyanózou, vyklenutýma očima, sliněním, slzením a nezřídka je doprovázeno zvracením, úbytkem tělesné váhy a zlomeninami žeber. Záchvaty kašle se objevují periodicky a končí vyčerpáním, avšak mezi záchvatovými periodami pacient neprojevuje žádné známky onemocnění. Paroxysmální stádium běžně trvá okolo 8 týdnů a je následované postupným, snižujícím se počtem záchvatů kašle. Následující rekonvalescentní fáze trvá 1-2 týdny (Mattoo a Cherry, 2005).

Celosvětově odhadovaný počet případů dávivého kašle ve světě v roce 2014 byl 24.1 milionů, přičemž 160 700 případů onemocnění u neočkovaných dětí mladších pěti let skončilo úmrtím. U kojenců mladších 1 roku bylo těchto úmrtí 85 900. Nejvýznamnější podíl na tomto počtu mají africké státy (Yeung *et al.*, 2017). V posledních letech stoupla incidence dávivého kašle i ve vyspělejších státech světa, jako je USA, Austrálie, Nizozemí (Burns *et al.*, 2014) nebo Velká Británie (Amirthalingam, 2013). Ani Česká republika není výjimkou, co se týče zvyšujícího se počtu onemocnění dávivým kašlem (Fabianova *et al.*, 2017) jak je ukázáno na obrázku 1. Tento trend může být způsoben přechodem z celobuněčné vakcíny na bezbuněčnou. Celobuněčná obsahovala usmrcené bakterie *B. pertussis* a začala se používat v první polovině 20.

století. Od 90. let používaná bezbuněčná vakcína obsahuje až 5 faktorů virulence: fimbrie (Fim2/Fim3), pertusový toxin (PT), pertaktin (PRN) a filamentózní hemaglutinin (FHA) (Locht a Mielcarek, 2012). Protektivní vlastnosti obou typů vakcín byly porovnávány u imunizovaných paviánů v několika časových bodech po infekci divokým kmenem *B. pertussis*. Ačkoliv zvířata imunizovaná před infekcí bezbuněčnou vakcínou nevykazovala typické příznaky dávivého kašle, kolonizace plicního epitelu se ukázala oproti druhé imunizované skupině jako výrazně vyšší a docházelo dokonce k dalšímu přenosu pertuse na okolní nevakcinovaná zvířata (Warfel *et al.*, 2014). Zmíněné pozorování velmi dobře koreluje s dramatickým nárůstem počtu případů černého kašle po přechodu na bezbuněčnou vakcínu. Avšak důvody zvýšené incidence můžou být i jiné. Za uvážení stojí evoluce bakterie *B. pertussis* nebo také celosvětová globalizace.



**Obrázek č. 1: Incidence onemocnění černým kašlem v České republice v letech 1954-2016.** Graf zobrazuje počet hlášených onemocnění černého kašle na 100 000 obyvatel v České republice v průběhu let 1954-2016. V roce 1958, kdy bylo zavedeno plošného očkování celobuněčnou vakcínou proti černému kašli nemocnost dramaticky klesala, avšak z grafu je patrný vzestupný trend nemocnosti od roku 1993, který může být způsoben změnou vakcíny na bezbuněčnou. Převzato (Fabianova *et al.*, 2017).

### 3.1.1.3 *Bordetella parapertussis*

Tato nepohyblivá bakterie byla poprvé izolována z respiračního traktu pacientů s dávivým kašlem. Při srovnání s *B. pertussis* vykazovala několik odlišností, a to kratší dobu růstu, přítomnost intenzivnější hemolýzy po delší dobu a produkci katalázy (Bradford a Slavin, 1937). *B. parapertussis* byla izolována i Elderingem (Eldering a Kendrick, 1938), který ji pojmenoval jako *Bacillus para-pertussis*.

Jako patogenní bakterie způsobuje onemocnění podobné dávivému kašli, avšak jeho forma je méně závažná s kratší dobou nemoci. Ani v jednom případě studie z roku 1994 nebyla zaznamenána horečka vyšší než 38 °C. Počet leukocytů a lymfocytů byl signifikantně vyšší u pacientů infikovaných bakterií *B. pertussis* (Heininger *et al.*, 1994). Mírnější projev nemoci dokládá i studie z roku 1998, kde průměrná délka kašle trvala 25 dní a typický kokrhavý kašel (*whooping*) pouze 3 dny (Mastrantonio *et al.*, 1998). *B. parapertussis* nebyla detekována jen u lidí, ale její nálezy byly potvrzeny i v plicích ovcí (Porter *et al.*, 1994).

### 3.1.2 Ostatní druhy rodu *Bordetellae*

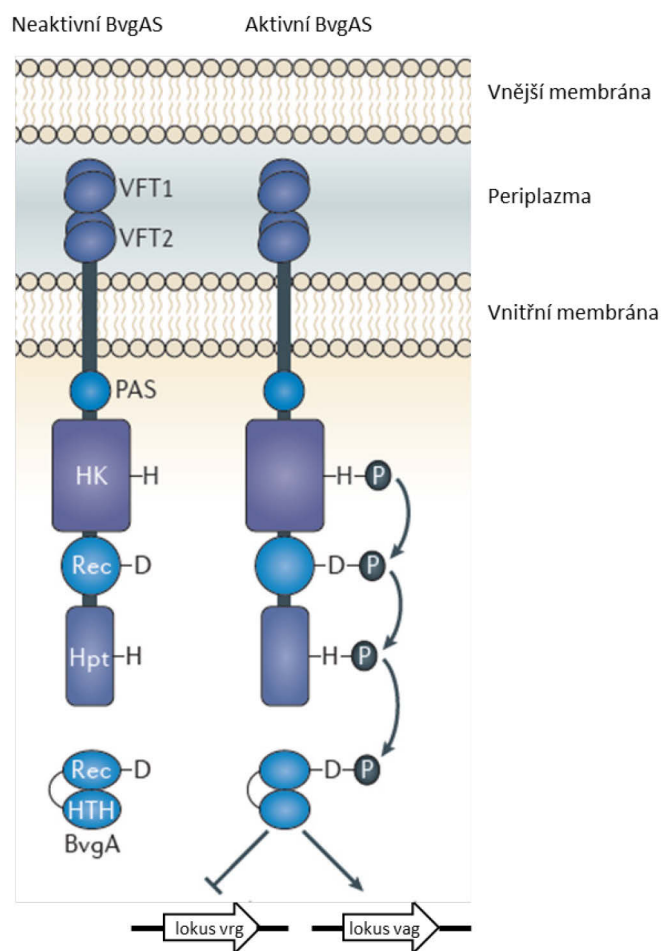
Jednou z dalších bakterií řadící se mezi ne-klasické druhy *Bordetellae* je i lidský patogen *B. holmesii* identifikovaný po izolaci z lidských krevních kultur (Weyant *et al.*, 1995). U imunokompromitovaných pacientů je příčinou bakterémie, endokarditidy a respiračních chorob (Shepard *et al.*, 2004). Z dýchacích cest pacientů s cystickou fibrózou byly izolovány kmeny *B. bronchialis*, *B. sputigena* a *B. flabilis* (Vandamme *et al.*, 2015). Na rozdíl ode všech dosud popisovaných bakterií, *B. trematum* nebyla izolována z respiračního traktu, ale z ušních a ranných infekcí člověka (Vandamme *et al.*, 1996). Kromě chronických infekcí podkoží u pacientů s diabetem (Daxboeck *et al.*, 2004; Almagro-Molto *et al.*, 2015) je nálezy *B. trematum* spojován i s bakterémií doprovázenou septickým šokem, která byla popsána u pacienta s rozvinutou infekcí měkké tkáně dolní končetiny (Majewski *et al.*, 2016). Stejně jako *B. trematum*, i *B. ansorpii* kolonizuje kožní tkáň u pacientů (Ko *et al.*, 2005). První klinický izolát *B. petrii* byl popsán u pacienta s mandibulární osteomyelitidou (Fry *et al.*, 2005). Tento druh byl také vykultivován z respiračního traktu pacientů s cystickou fibrózou (Biederman *et al.*, 2015) nebo u imunokompromitovaného pacienta s chronickou sinusitidou (Nagata *et al.*, 2015). *B. petrii* byla prvním druhem z rodu *Bordetellae*, který byl izolován z různých druhů prostředí a může se tak běžně vyskytovat mimo svého hostitele (von Wintzingerode *et al.*, 2001). V půdním prostředí může degradovat chlorbenzeny a používat tyto součiny jako zdroj uhlíku a energie (Wang *et al.*, 2007). *B. avium* je striktně aerobní bakterie kolonizující respirační trakt drůbeže a dalších ptáků, kde způsobuje onemocnění dýchacích cest (Kersters *et al.*, 1984). *B. hinzii* byla poprvé popsána v roce 1995, kdy byla nalezena

v drůbežích a lidských izolátech. V obou typech izolátů se *B. hinzii* ukázala jako nepatogenní bakterie a je tak i všeobecně přijímána (Vandamme *et al.*, 1995), přestože některé kmeny dokáží infikovat tracheu drůbeže za vzniku drobných lézí, avšak bez symptomatických příznaků nemoci (Register a Kunkle, 2009). *B. pseudohinzii* osidluje dýchací cesty laboratorních myší (Ivanov *et al.*, 2016). Nejnovější objevené druhy *B. muralis*, *B. tumulicola* a *B. tumbae* pochází z 1 300 let staré nástěnné malby z pohřební mohyly Takamatsuzuka v Japonsku (Tazato *et al.*, 2015).

### 3.2 BvgAS zprostředkovaná regulace u rodu *Bordetellae*

BvgAS je dvoukomponentový systém signální transdukce, který u rodu *Bordetellae* kontroluje expresi desítek genů včetně faktorů virulence. Systém je společný všem klasickým druhům *Bordetellae*, je kódován lokusem *bvg* a skládá se z transmembránové sensorové kinázy BvgS o velikosti 135 kDa a cytoplazmatického 23 kDa proteinu BvgA, plnícího funkci regulátoru odpovědi (Weiss *et al.*, 1983).

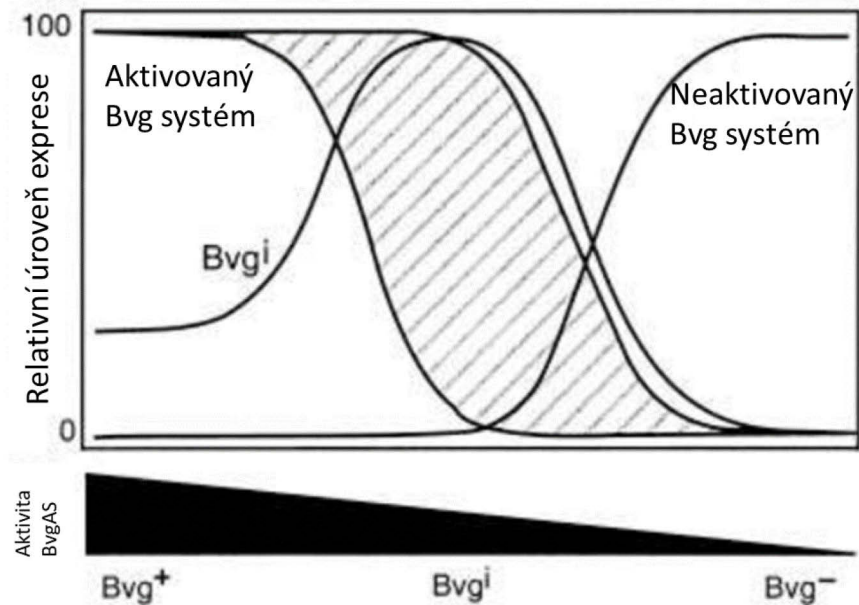
Protein BvgS zasahuje svou N-koncovou částí do periplazmatického prostoru, což umožňuje přijímat signály z okolního prostředí (Stibitz a Yang, 1991) pomocí dvou domén typu *Venus flytrap* (VFT1,2) (Herrou *et al.*, 2009; Herrou *et al.*, 2010, Uhl, 1994). BvgA protein se skládá ze dvou domén, přičemž přijímací (Rec) doména je příjemcem fosfátu a HTH (helix-turn-helix) doména je schopna vazby na DNA (Decker *et al.*, 2012). Přenos signálu probíhá ve čtyřech krocích, jak je znázorněno na obrázku 2. Aktivace systému BvgAS začíná dimerizací proteinu BvgS. Adenozin trifosfát (ATP) je následně využit k autofosforylaci histidinu v HK doméně BvgS a dále přenášen přes aspartát až na histidin Hpt domény BvgS, která následně fosforyluje aspartát proteinu BvgA v jeho Rec doméně. Po fosforylaci BvgA, dochází k vazbě BvgA přes jeho HTH doménu na DNA a následné aktivaci či inhibici transkripce příslušných genů (Uhl, 1994).



**Obrázek č. 2: Regulační systém BvgAS.** BvgS je senzorový protein, který na svém C-konci obsahuje dvě venus flytrap domény nacházející se v periplazmě. V cytoplazmě se nachází transmembránová doména PAS, HK doména, Rec doména a Hpt doména. BvgA je regulační protein, který se skládá z N-koncové Rec domény a C-koncové HTH domény. Po aktivaci systému BvgAS dochází k transkripci genů *vag* a represí genů *vrg*. Převzato a upraveno (Melvin et al., 2014).

Systém BvgAS je aktivován pomocí teploty (37 °C) a jeho inaktivace je způsobena nízkou teplotou (25 °C), kyselinou nikotinovou nebo síranem hořečnatým (Melton a Weiss, 1993). Novější studie ale ukazují, že inaktivace systému BvgAS nízkou teplotou platí pouze pro bakterii *B. bronchiseptica*, protože *B. pertussis* je schopna produkovat faktory virulence i při teplotě 24 °C (Seydlova et al., 2017). V závislosti na aktivitě systému BvgAS byly popsány 3 různé fáze, které znázorňuje obrázek 3. Bvg<sup>+</sup> je virulentní fáze, ve které jsou exprimovány geny *vag* (virulence-activated genes), např. pertusový toxin a jeho transportní systém (operon *ptx-ptl*), adenylát cyklázový toxin (operon *cyaA-E*). Bvg<sup>i</sup> je přechodná fáze, která nastává při kultivaci v médiu s nízkou koncentrací modulátorů (0,5 mM kyselina nikotinová, 5 mM MgSO<sub>4</sub>) nebo při přechodu z Bvg<sup>-</sup> fáze do Bvg<sup>+</sup> fáze. V této fázi jsou exprimovány pouze některé *vag* geny (Deora et al., 2001; Cotter a Jones, 2003). V avirulentní Bvg<sup>-</sup> fázi jsou exprimovány geny *vrg* (virulence-repressed genes), které jsou během Bvg<sup>+</sup> fáze

reprimovány cytoplazmatickým proteinem BvgR (Merkel a Stibitz, 1995). Jedná se zejména o geny pro syntézu bičíku u *B. bronchiseptica* (Deora *et al.*, 2001, Cotter a Jones, 2003).



**Obrázek č. 3: Přejít mezi fázemi Bvg je závislý na aktivitě systému BvgAS.** Aktivací systému BvgAS dochází k přechodu z fáze Bvg<sup>-</sup> do fáze Bvg<sup>i</sup>, současně dochází k inaktivaci genů *vrg* a k aktivaci časných a středních genů *vag*. Přejít z fáze Bvg<sup>i</sup> do fáze Bvg<sup>+</sup> je doprovázen expresí pozdních genů *vag*. Přejato a upraveno (Deora *et al.*, 2001).

### 3.3 Faktory virulence u klasických druhů rodu *Bordetellae*

Faktory virulence umožňují klasickým druhům rodu *Bordetellae* kolonizovat dýchací trakt hostitele a ustanovit infekci. Zatímco adhesivní molekuly: filamentózní hemaglutinin (FHA), fimbrie (Fim), pertaktin (PRN) zajišťují uchycení bakterií na řasinkový epitel dýchacích cest, kombinace toxinů a ostatních faktorů: adenylát cyklázový toxin (ACT), pertusový toxin (PT), dermonekrotický toxin (DNT), tracheální cytotoxin (TCT), lipopolysacharid (LPS) a sekreční systém typu 3 (T3SS) umožňuje *Bordetellae* modulovat imunitní systém hostitele.

#### 3.3.1 Filamentózní hemaglutinin

Filamentózní hemaglutinin (FHA) je důležitý pro adhezi *Bordetellae* na epiteliální buňky. Tento 230 kDa velký exoprotein využívá sekreční systému typu 2. FHA

je exprimován v podobě 367 kDa pre-proteinu FhaB, který je po průchodu přes vnitřní cytoplazmatickou membránou rozpoznán v periplasmatickém prostoru partnerským proteinem FhaC je maturován a translokován na povrch bakterií (Mazar a Cotter, 2006). Následně je prezentován na povrchu buněk, nebo může být uvolňován do extracelulárního prostoru. Heparin-vazebná doména FHA je zodpovědná za přichycení a následnou perzistenci bakterií na řasinkovém epitelu dýchacího traktu (Inatsuka *et al.*, 2005).

### **3.3.2 Fimbrie**

Fimbrie jsou povrchové polymerní struktury sloužící k přichycení na cílovou buňku při počáteční fázi infekce. Rovněž plní pomocnou funkci při adhezi filamentózního hemaglutininu (Scheller *et al.*, 2015). Operon fimBCD obsahuje geny kódující proteiny podílející se na výstavbě fimbrí: FimB (chaperon), FimC (usher) a FimD, který slouží jako adhezivní špička (Willems *et al.*, 1990; Willems *et al.*, 1992).

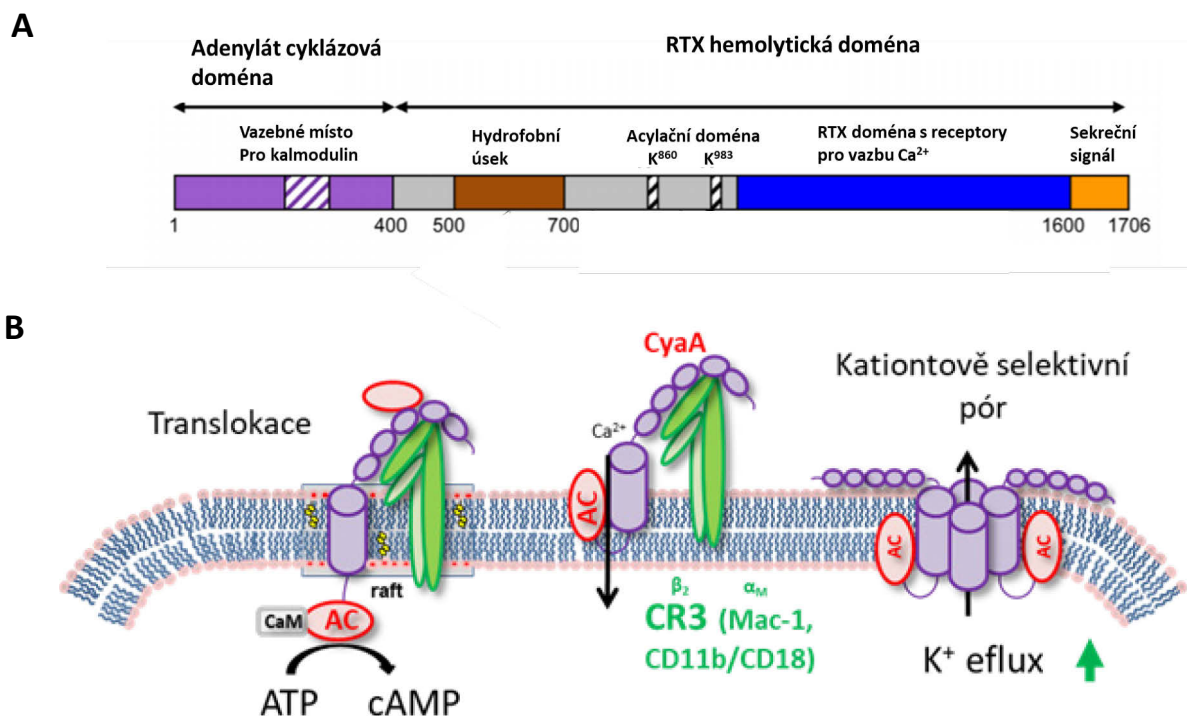
### **3.3.3 Pertaktin**

Pertaktin náleží do skupiny autotransportních proteinů. Je asociován s povrchem vnější membrány bakterie, ve které vytváří beta strukturu, skrze níž je sekretovaná přenašečová doména kódovaná na N-konci proteinu. Hraje roli v přichycení na povrchové adhezivní receptory cílové buňky prostřednictvím sekvence aminokyselin Arg-Gly-Asp (Emsley *et al.*, 1994; Khelef *et al.*, 1994).



### 3.3.4 Adenylát cyklázový toxin

Adenylát cyklázový toxin (ACT) je jedním z klíčových faktorů virulence rodu *Bordetellae*. Tento 177 kDa velký protein, který náleží do rodiny RTX (z angl. repeats in toxin) toxinů, je kódován v operonu *cyaA-E* genem *cyaA*. Zbývající geny operonu *cyaA-E* poté kódují podjednotky sekrečního systému typu 1, skrze nějž je toxin sekretován, a CyaC acyl-transferázu, která posttranslačně acyluje a aktivuje tento toxin (Glaser *et al.*, 1988). Z hlediska funkce je možno ACT rozdělit do 2 hlavních domén, jak je schématicky znázorněno na obrázku 4A-B, N-koncovou katalytickou adenylát cyklázovou (AC) doménu a C-koncovou RTX doménu, která zprostředkovává cílení a vazbu toxinu na myeloidní buňky imunitního systému exprimující integrinový receptor  $\alpha_M\beta_2$ , tvorbu membránových pórů (Ehrmann *et al.*, 1991) a přenáší katalytickou AC doménu do cytozolu buňky (Iwaki *et al.*, 1995). Katalytická AC doména čítá 400 aminokyselin (Ladant *et al.*, 1986). Prvních 237 aminokyselin slouží jako aktivní místo enzymu, zbylé (237-400) aminokyseliny obsahují kalmodulin vazebnou doménu. Kalmodulin přítomný v cytoplazmě eukaryotických buněk zapříčiní svou vazbou AC domény aktivaci enzymu (Glaser *et al.*, 1988). Enzym adenylát cykláza následně katalyzuje nekontrolovanou přeměnu ATP na cyklické AMP (cAMP) (Glaser *et al.*, 1989), čímž dochází ke změnám v buněčné signalizaci a rozvratu imunitního systému hostitele (Guermonprez *et al.*, 2001).



**Obrázek č. 4: Schéma molekuly adenylát cyklázového toxinu (ACT) a jeho interakce s hostitelskou buňkou (A)** Schéma molekuly ACT, která je tvořena 1706 aminokyselinami. Skládá se z adenylát cyklázové domény, která obsahuje vazebné místo pro kalmodulin a RTX domény vázající vápník. Struktura obsahuje hydrofobní úsek zodpovědný za vznik póru, posttranslačně modifikované molekuly lysinu K<sup>860</sup> K<sup>983</sup> a sekreční signál kódovaný 100 C-koncovými aminokyselinami. Převzato a upraveno (Masin *et al.*, 2017). **(B)** Mechanismus interakce ACT s hostitelskou buňkou. ACT je po sekreci skrze sekreční systém typu 1 navázán na integrinový receptor  $\alpha_M\beta_2$  na povrchu myeloidních buněk imunitního systému. Následně je do hostitelské membrány zabudovaná RTX doména, která zajišťuje přenos AC domény do cytoplazmy. V cytoplazmě hostitelské buňky je adenylát cykláza aktivována kalmodulinem a katalyzuje přeměnu ATP na cyklické AMP. Převzato a upraveno (Fedele *et al.*, 2017).

### 3.3.5 Pertusový toxin

Pertusový toxin (PT) je jedním z prvních objevených faktorů virulence u *B. pertussis* a zároveň jeden z nejvíce studovaných. Patří do rodiny AB<sub>5</sub> toxinů a je kódován lokusem *ptx-ptl*. Do extracelulárního prostředí je PT uvolňován pomocí sekrečního systému typu 4, který je také kódován též lokusem a spolu s PT sdílí společný promotor (Kotob *et al.*, 1995). Přestože genom *B. bronchiseptica* i *B. parapertussis* obsahuje geny pro PT, transkripčně aktivní jsou pouze u *B. pertussis* (Arico a Rappuoli, 1987).

PT je 105 kDa velký protein složený z 5 subjednotek (S1-S5) zaujímající modelovou AB strukturu. Monomerní složce A odpovídá subjednotka S1, která má

adenosindifosfát (ADP)-ribosylační katalytickou aktivitu závislou na NAD (Katada *et al.*, 1983). Složku B tvoří 5 subjednotek zakomponovaných do kruhu, který je tvořen dvěma dimery (S2-S4; S3-S4) spojenými pomocí S5. Tento pentamer zprostředkovává vazbu na povrchové struktury hostitelské buňky a přenáší monomerní subjednotku S1 do cytoplazmy cílové buňky (Tamura *et al.*, 1982). Po rozpoznání specifických glykoproteinů na povrchu buněk je toxin endocytován, prochází retrográdním transportem do Golgiho aparátu, ze kterého putuje do endoplasmatického retikula. Následně dochází k přesunu S1 podjednotky do cytoplazmy, kde katalyzuje ADP-ribosylaci G proteinu, což má za následek narušení buněčné signalizace (Graf *et al.*, 1992).

### 3.3.6 Dermonekrotický toxin

Dermonekrotický toxin (DNT) je termolabilní, 160 kDa velký protein náležící mezi AB toxiny. DNT se skládá z N-koncové receptorové domény a C-koncové katalytické domény (Kashimoto *et al.*, 1999). Mechanismus působení DNT začíná vazbou na hostitelskou buňku, je endocytován a v endozomu proteolyticky štěpen, čímž dochází k enzymatické aktivaci toxinu (Matsuzawa *et al.*, 2004). Po intradermálním vpichu způsobuje DNT nekrotické léze (Cowell *et al.*, 1979), u prasat je příčinou atrofické rýmy (Brockmeier, 2002). *In vitro* podmínkách je dermonekrotický toxin schopen deaminovat glutamin 63 v GTPáze RhoA, což vede k její konstitutivní aktivaci a *in vivo* k ovlivnění cytoskeletu hostitelských buněk (Schmidt *et al.*, 1999).

### 3.3.7 Tracheální cytotoxin

Tracheální cytotoxin (TCT) je malý peptid korespondující s monomerním peptidoglykanu, který vzniká při přestavbě buněčné stěny (Cookson *et al.*, 1989). TCT není aktivován systémem BvgAS. TCT má pyrogenní a artritogenní účinky, také stimuluje leukocyty k produkci interleukinu 1 (IL-1). Produkovaný IL-1 je zodpovědný za destrukci řasinkových buněk epitelu dýchacího traktu (Heiss *et al.*, 1993; Goldman *et al.*, 1982).

### 3.3.8 Lipopolysacharid

Lipopolysacharid (LPS) je stavebním kamenem vnější membrány gram-negativních bakterií. Sestává se ze tří částí: lipidu A, polysacharidového jádra a O-antigenu. Takto kompletní složení lipopolysacharidu vykazují *B. bronchiseptica* i *B. parapertussis*, avšak *B. pertussis* O-antigen postrádá (Caroff *et al.*, 2001). LPS je rozpoznáván *Toll-like* receptorem 4, který spolu se svým koreceptorem aktivuje transkripční faktor NF- $\kappa$ B, jenž potencuje vznik prozánětlivých mediátorů (Kawai a Akira, 2010).

### 3.3.9 Sekreční systém typu 3

Jako další faktor virulence rodu *Bordetellae* je často uváděn a v poslední době intenzivně studován sekreční systém typu 3. Tato jehlovitá struktura rozkládající se od vnitřní cytoplazmatické membrány až po vnější membránu slouží k sekreci efektorových proteinů přímo do cytoplazmy hostitelské buňky. Sekrečnímu systému typu 3 je podrobně věnována následující kapitola.

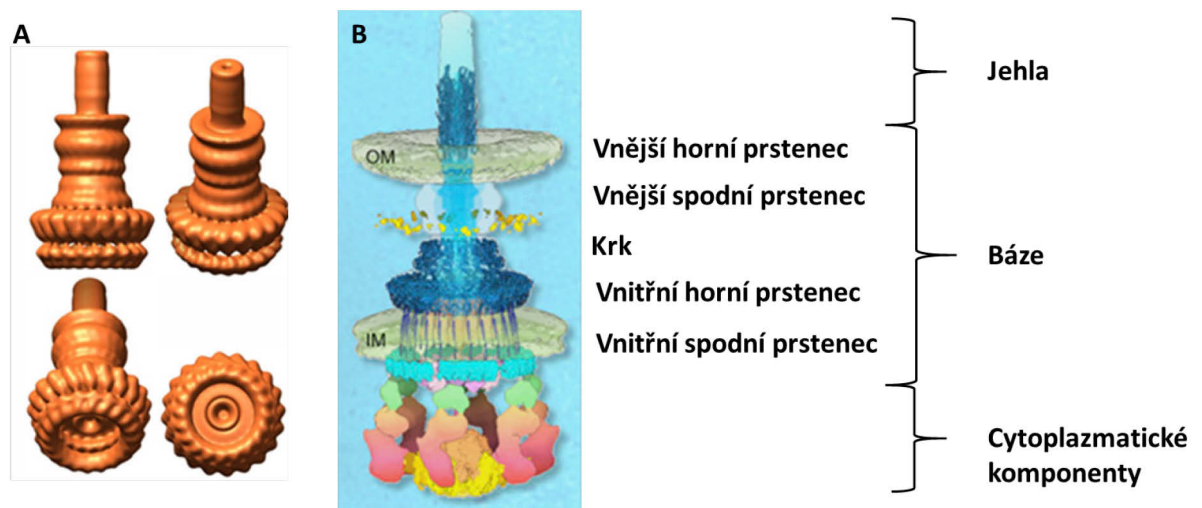
## 3.4 Sekreční systém typu 3

Sekreční systém typu 3 (T3SS) je jedním ze sedmi dosud objevených sekrečních systémů. Tento systém slouží k transportu bakteriálních proteinů, takzvaných efektorů přímo do cytozolu eukaryotické hostitelské buňky. Kromě bakterií rodu *Bordetellae* byl sekreční systém typu 3 popsán i u mnoha dalších gram-negativních bakterií: *Yersinia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Chlamydia* spp., některé druhy *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa* (Gal *et al.*, 1999; Hsia *et al.*, 1997). U bakterií rodu *Bordetellae* byl objeven pouze jeden typ sekrečního systému typu 3, ale u některých bakterií se vyskytuje i více (Coburn *et al.*, 2007). Přítomnost T3SS není omezená pouze pro živočišné bakterie, některé rostlinné patogeny (Buttner a He, 2009) nebo endosymbiotické bakterie (Viprey *et al.*, 1998) rovněž disponují tímto aparátem. Fylogenetické analýzy porovnávající bakterie na základě podobnosti proteinů T3SS ukazují, že exportní mechanismus bakteriálního bičíku a T3SS mají společného předka.

Po oddělení těchto struktur byl jejich vývoj odlišný. K rozšíření genů kódujících T3SS došlo pravděpodobně horizontálním přenosem, čemuž nasvědčuje i nález klastrů genů kódujících T3SS v nestabilních oblastech DNA (na plazmidu nebo ostrovech patogenity)(Gophna *et al.*, 2003).

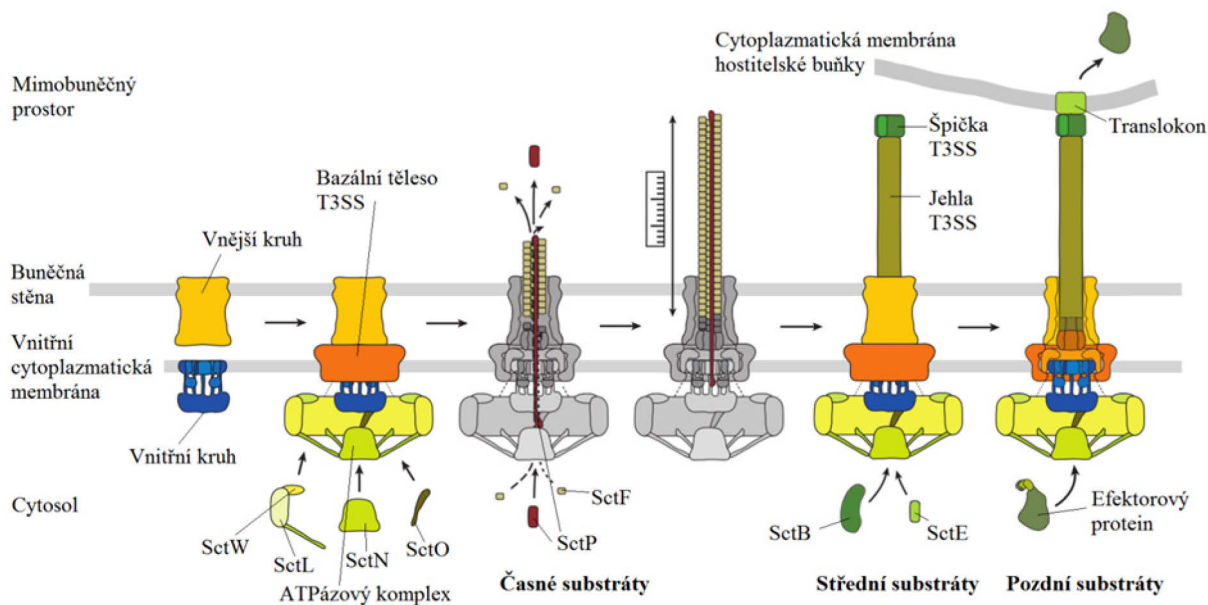
### 3.4.1 Stavba sekrečního systému typu 3

T3SS je multimerní struktura jehlovitého tvaru někdy označovaná jako injektozom a je jednou z nejkompexnějších proteinových struktur. Aparát se zpravidla skládá z více než 20 proteinů a je velký přibližně 3,5 MDa. Tento aparát můžeme rozdělit na bázi zabudovanou ve vnitřní a vnější bakteriální membráně a jehlovitý útvar vyčnívající z bakteriálního povrchu, jak ukazuje obrázek 5 A-B. Báze o šířce 25 nm a délce 30 nm se skládá ze dvou prstenců – vnitřního a vnějšího. Vnitřní prstenec T3SS se dále rozděluje na spodní a vrchní. Vnější prstenec se také dělí na spodní a vrchní a je situován ve vnější membráně. Oba prstence jsou spojeny „krkem“, který se nachází v oblasti periplazmy. Skrze oba prstence prochází a z povrchu vyčnívá takzvaná jehla o velikosti asi 50 nm (Marlovits *et al.*, 2004). Na špičce jehly se nachází proteiny, které po kontaktu s cílovou buňkou tvořících pór/translokon v membráně hostitelské buňky (Erskine *et al.*, 2006).



**Obrázek č. 5: Schéma struktury T3SS.** Sekreční systém se skládá ze tří základních složek – cytoplazmatických komponent, báze a jehly. Báze se dále skládá ze dvou vnitřních prstenců nacházejících se v cytoplazmatické membráně, krku umístěného v periplazmě a dvou vnějších prstenců, které se rozkládají v šíři vnější membrány. **(A)** Rekonstrukce báze T3SS z dat získaných kryo-elektronovou mikroskopií. **(B)** Architektura T3SS včetně cytoplazmatické komponenty. Převzato a upraveno (Marlovits *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2017).

Na výstavbě T3SS se podílí dráha *sec*, která přepravuje časné stavební složky do bakteriální membrány, jak je znázorněno na obrázku 6, výstavba sekrečního aparátu začíná vytvoření vnějšího prstence ve vnější membráně. Nezávisle na vnějším prstenci je vytvářen vnitřní prstenc, přesněji výstavba začíná dolním vnitřním prstencem. Po zformování obou prstencových struktur jsou tyto dva komponenty co nejdříve propojeny (Diepold *et al.*, 2010). Poté, co je vytvořena báze, nastává formování cytoplazmatické části T3SS, aby systém mohl být sekrečně aktivní. Jakmile je dokončen cytoplazmatický komponent, T3SS začíná sekretovat strukturální proteiny potřebné pro výstavbu jehly (Lara-Tejero *et al.*, 2011; Sukhan *et al.*, 2001). Jehla je dutý útvar vznikající polymerací jednoho proteinu. Tato struktura roste směrem od špičky a prodlužuje se přidáním podjednotky proteinu tvořícího jehlu. Podjednotka tohoto proteinu putuje dutou strukturou částečně vytvořené jehly, kde je následně připojena k narůstající špičce (Crepin *et al.*, 2005). Proces je nápadně podobný syntéze bičíku, kde také dochází k přidávání podjednotek flagelinu ke špici již vytvořené struktury (Yonekura *et al.*, 2002). Po určitém čase dochází k zastavení sekrece substrátů nutných pro výstavbu jehly a nastává sekrece proteinů tvořících špičku jehly, proteinů zodpovědných za vznik translokony, takzvaných translokátorů a konečně samotných efektorových proteinů. Kdy a jak k tomuto přepnutí dochází, není zatím plně objasněno.



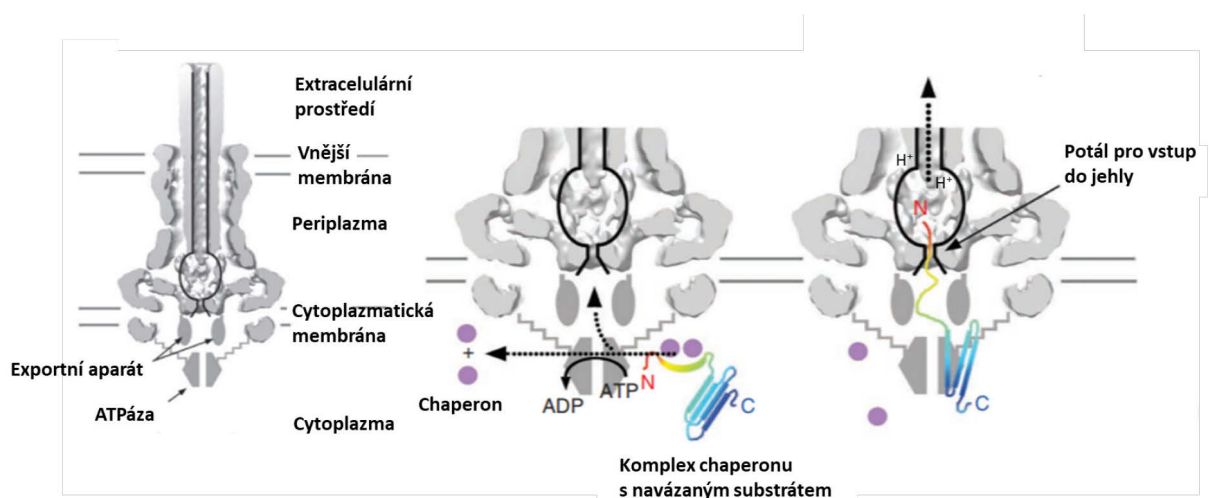
**Obrázek č. 6: Model výstavby T3SS.** Nejprve je pomocí *sec* dráhy vytvořen vnější prstenec ve vnější membráně a nezávisle na něm je vytvořen vnitřní prstenec. Následně jsou tyto prstence propojeny a je formována cytoplazmatická komponenta. Po dokončení cytoplazmatické části T3SS jsou pomocí ní sekretovány ostatní proteiny T3SS. Jakmile jehla T3SS dosáhne požadované velikosti, jsou sekretovány střední substráty zodpovědné za výstavbu špičky jehly. Po kontaktu s eukaryotickou buňkou je vytvořen translokon, skrze něhož jsou translokovány efektorové proteiny. Převzato a upraveno (Galan *et al.*, 2014).

Jedním z možných mechanismů je takzvané „molekulární pravítko“, protein, který určuje velikost jehly a následné přepnutí sekrece. Journet (2003) popsal protein *YscP* u bakterie *Y. enterocolitica*, který je jedním koncem ukotven v bázi sekrečního aparátu a druhým koncem k rostoucí jehle. Díky tomuto ukotvení může *YscP* kontrolovat velikost rostoucí jehly. Po dosažení finální délky je pomocí *YscP* přepnuta sekrece na jiné substráty popsané výše (Journet *et al.*, 2003). Dalším mechanismem ovlivňujícím délku jehly je načasování přepnutí sekrece pomocí proteinu, který je součástí vnitřního prstence báze aparátu. Takový protein byl popsán u bakterie rodu *Salmonellae*, kde je označován jako *PrgJ*. *PrgJ* přenáší signál z jehly k cytoplazmatickým elementům T3SS, které jsou důležité pro sekreci (Lefebvre a Galan, 2014). Jiné práce ovšem ukazují, že nadprodukce monomerních podjednotek proteinu, který je stavební složkou jehly, vede k prodloužení délky jehly. To naznačuje, že limitujícím faktorem pro délku jehly je pouze dostupné množství monomerních podjednotek proteinu jehly (Crepin *et al.*, 2005).

Špička jehly je tvořena translokátorovými proteiny, které jsou zodpovědné za vznik translokonu v membráně cílové buňky (Neyt a Cornelis, 1999). Po vytvoření translokonu následuje sekrece efektorových proteinů skrze T3SS do hostitelské buňky.

### 3.4.2 Mechanismus sekrece pomocí sekrečního systému typu 3

Jednou z hlavních složek cytoplazmatické struktury T3SS je ATPázový komplex. Substrátový protein s navázaným chaperonem prochází cirkulární, póru podobnou strukturou ATPázového komplexu a kontaktuje jeho C-konec, který za hydrolýzy ATP odstraní chaperon z proteinu, jak je znázorněno na obrázku 7. Pokud není T3SS aktivní, je ATPázový pór uzavřen. Průměr otvoru v jehle je 20 Å což je příliš málo na to, aby mohly proteiny procházet skrze jehlu ve sbalené podobě. Další funkcí ATPázy je schopnost pozměnit strukturu substrátového proteinu na rozbalený (Akeda a Galan, 2005; Muller *et al.*, 2006). Po odstranění chaperonu a změně struktury prochází substrátový protein přes další strukturu, jíž je cytoplazmatický prstencový protein exportního aparátu. Ten pomáhá nesbalenému substrátu procházet skrze centrální kanál (Abrusci *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že k sekreci substrátu skrze T3SS dochází polarizovaným způsobem. Nejdříve do aparátu vstupuje protein svým N-koncem, který obsahuje sekreční signál a následně prochází v nesbalené podobě přes sekreční systém. Následná translokace proteinu do cytoplazmy hostitelské buňky probíhá nejspíše za pomoci protonmotivní síly (Radics *et al.*, 2014).



**Obrázek č. 7: Schéma stavby a mechanismu sekrece pomocí T3SS.** Komplex substrátu s navázaným chaperonem je dopraven k cytoplazmatickým komponentám T3SS. Prostřední schéma ukazuje odstranění chaperonu pomocí hydrolýzy ATP. Nakonec je substrátový protein polarizovaně transportován jehlovitou strukturou. Převzato a upraveno (Radics *et al.*, 2014).



### 3.4.3 Sekreční systém typu 3 u rodu *Bordetellae*

#### 3.4.3.1 Role sekrečního systému typu 3 v průběhu infekce

Pro ustanovení infekce v hostiteli mají bakterie velmi často vyvinuté mechanismy, které slouží k narušení imunitní odpovědi v hostiteli. Tyto mechanismy jsou obzvláště důležité v případě, že bakterie je schopna působit chronické onemocnění hostitele. Bylo ukázáno, že v případě persistence *B. bronchiseptica* v průdušnici je u myší (Yuk *et al.*, 2000), krys (Yuk *et al.*, 1998) i prasat (Nicholson *et al.*, 2014) klíčová právě role T3SS. Účinku T3SS je v hostiteli dosaženo skrze proteiny sekretované pomocí T3SS, takzvané efektorové proteiny T3SS. Ty mohou negativně regulovat humorální imunitní odpověď v hostiteli (nižší produkce anti-*Bordetellae* protilátek), a tím usnadnit úspěšnou perzistenci infekce dolních cest dýchacích. Tyto sekretované proteiny také mají schopnost vyvolat buněčnou smrt makrofágů a neutrofilů a tím je inaktivovat. T3SS rovněž negativně ovlivňuje i aktivitu NF- $\kappa$ B jakožto hlavního regulátoru transkripce prozánětlivých cytokinových genů (Yuk *et al.*, 2000, Legarda *et al.*, 2005). V myším modelu přítomnost T3SS u *B. bronchiseptica* potencuje migraci imunosuprimovaných dendritických buněk z dýchacích cest do lokálních lymfatických uzlin. T3SS také v průběhu infekce potlačuje produkci IFN- $\gamma$  a pozitivně ovlivňuje hladinu interleukinu 10 (IL-10) (Skinner *et al.*, 2005). S T3SS v procesu narušení imunitní odpovědi spolupracují i ostatní faktory virulence, např. ACT, který má společně s T3SS synergický účinek (Skinner *et al.*, 2004).

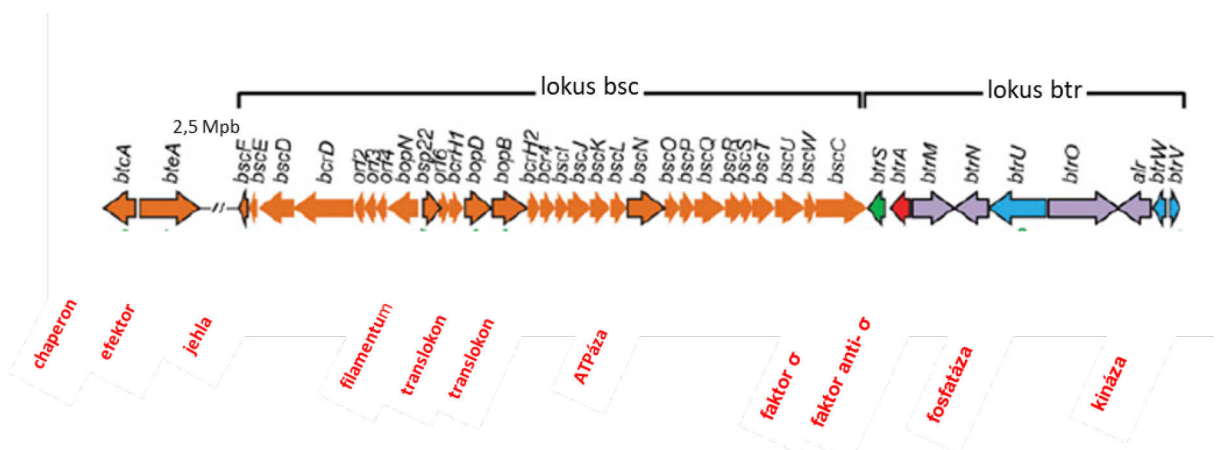
Delece genu *bscN*, kódující protein sloužící jako ATPáza T3SS u prasečího izolátu *B. bronchiseptica*, vede k deaktivaci sekrečního systému typu 3. V patologii respiračního traktu byl porovnáván stupeň atrofické rýmy, který byl nižší u mutantních kmenů v porovnání s divokým typem. U pneumonie divokého kmene byly popsány větší léze, které se mění v závislosti na době trvání infekce. U mutantního kmene byla bronchopneumonie, charakterizována mikroskopickými lézemi, nalezena pouze u několika málo případů. Z toho lze usoudit, že T3SS vyvolává zvýšení patologických změn v respiračním traktu prasat. T3SS také ovlivňuje imunitní odpověď zvyšováním hladiny IL-10 na úrovni mRNA a také snižováním produkce IgG (Nicholson *et al.*, 2014).

Přestože je sekreční systém typu 3 uvažovaný jako jeden z faktorů virulence bakterií rodu *Bordetellae*, jedinou práci potvrzující toto stanovisko u *B. pertussis* publikoval Fenelly (2008). Byla prokázána virulenční aktivita T3SS u bakterie *B. pertussis* tak, že klinické izoláty *B. pertussis* exprimovaly funkčně aktivní T3SS, který se podílel na potlačení imunitní odpovědi buňky, a tím napomáhal ke kolonizaci a perzistenci infekce. Pokud *B. pertussis* měly deletovaný gen *bscN*, docházelo k lokální zánětlivé odpovědi v plicích infikovaných myši. (Fennelly *et al.*, 2008).

Opakováním pasážování bakterie *B. pertussis* v laboratoři může dojít k transkripční inaktivaci T3SS. Avšak po opětovném kontaktu bakterie s hostitelskou buňkou může být jeho exprese obnovena (Gaillard *et al.*, 2011).

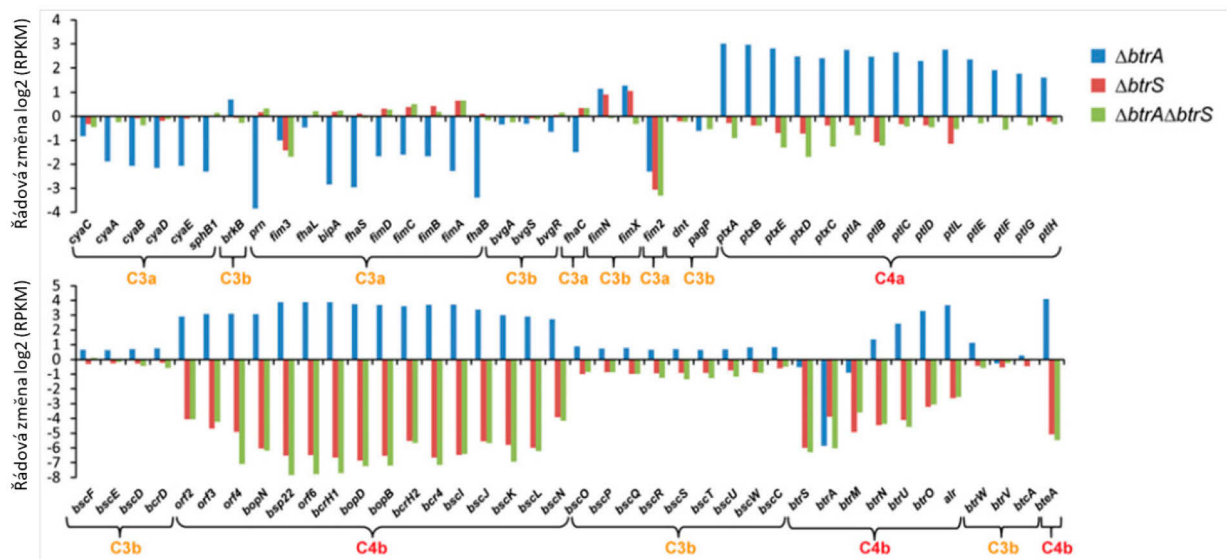
### 3.4.3.2 Regulace exprese sekrečního systému typu 3

T3SS je regulován pomocí dvoukomponentového systému BvgAS. Složky T3SS jsou kódovány v lokusech *bsc* a *btr*, přičemž strukturní složky a ATPáza jsou kódovány v lokusu *bsc* a regulační proteiny jsou kódovány v lokusu *btr*. 2,5 Mpb „upstream“ od lokusu *bsc* leží geny pro efektor BteA a jeho chaperon (Ahuja *et al.*, 2016)(obr. č. 8).



**Obrázek č. 8: Schéma uspořádání genů lokusu *bsc-btr*.** Oranžově jsou označeny strukturní a regulační geny T3SS v lokusu *bsc*, modré ORF lokusu *btr* poté kódují partnerské proteiny regulující transkripci *bsc* genů, fialové ORF nejsou charakterizovány. Sigma faktor *btrS* je značen zeleně, anti-sigma faktor *btrA* je značen červeně. Šipky naznačují směr transkripce genů. Převzato a upraveno (Ahuja *et al.*, 2016).

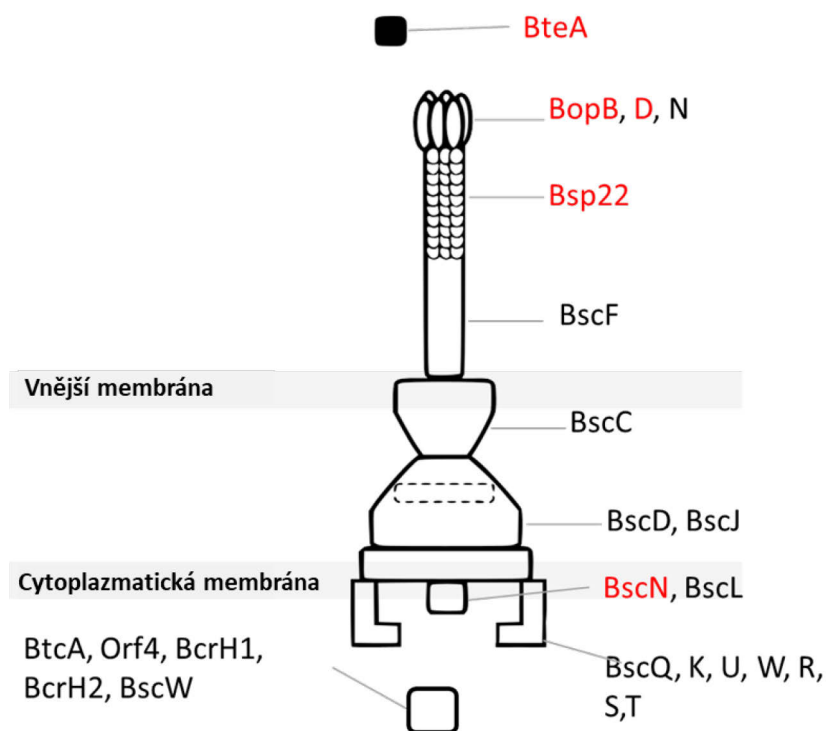
Aktivita sekrečního aparátu je kontrolována pomocí sigma faktoru BtrS, jeho antagonistou, anti-sigma faktorem BtrA, nebo proteiny BtrU, BtrW a BtrV, které pomocí fosforylace a defosforylace serinu brání transkripci genů T3SS (Kozak *et al.*, 2005). Geny podléhající regulaci BvgAS se nacházejí ve čtyřech různých klastrech, přičemž klastry 3 a 4 jsou ještě rozděleny na 3a, 3b a 4a, 4b (obr. č. 9) Geny pro expresi T3SS jsou umístěny v lokusech 3b, jež jsou nezávislé na regulaci pomocí sigma faktoru BtrS, a 4b, jež na BtrS závislé jsou. V rámci BvgAS regulonu anti-sigma faktor BtrA ovlivňuje ve fázi Bvg<sup>+</sup> adhezinové a toxinové geny, které vyžadují BtrA pro úplnou expresi. BtrA také potlačuje expresi genů lokusu *bsc-btr*, které aktivuje sigma faktor. Ve fázi Bvg<sup>-</sup> negativně reguluje lokus kódující geny pro bičík. Bylo zjištěno, že delecí genu pro BtrA v *B. bronchiseptica* dochází k expresi chemotaktických a bičíkových genů. Dochází také k aktivaci exprese genů *ptxA-E* a *ptIA-H*, což jsou homology lokusů *B. pertussis* kódující pertusový toxin a sekreční systém typu 4, pomocí kterého je PT sekretován (Ahuja *et al.*, 2016).



**Obrázek č. 9: Klastry genů podléhající regulaci BvgAS systému.** Znázornění míry exprese selektovaných genů v uvedených mutantních kmenech postrádajících faktory BtrA, BtrS nebo jejich kombinaci. Obrázek ukazuje regulaci transkripce genů těmito faktory rozdělenou do čtyř různých klastrů u bakterie *B. bronchiseptica* RB50. Převzato a upraveno (Ahuja *et al.*, 2016).

### 3.4.3.3 Komponenty sekrečního systému typu 3

Funkci strukturálních genů T3SS u rodu *Bordetellae* lze odvodit na základě homologií, jak je ukázáno na obrázku 10. Mezi prostudované a popsané proteiny patří BscN, Bsp22, BopB, BopD, BopN a BteA.



**Obrázek č. 10:** Schéma sekrečního systému typu 3 u bakterií rodu *Bordetellae*. Doposud byl popsán protein BscN plnící ATPázovou funkci, Bsp22 tvořící samostatně polymerizující filamentózní strukturu jehly, translokační proteiny BopB a BopD sloužící pro vytvoření póru v membráně hostitele, efektorový cytotoxický protein BteA a protein BopN, u kterého byla zatím popsána efektorová funkce a pomocný efekt na funkci efektorového proteinu BteA. Převzato a upraveno (Ahuja *et al.*, 2016).

BscN se skládá ze 444 aminokyselin a poprvé byl popsán v roce 1998. Je regulovaný systémem BvgAS a v T3SS funguje jako ATPáza. Na své ATP vazebné místo je schopen navázat ATP a hydrolyzovat jej. Delece BscN způsobuje inaktivaci sekrece a také sníženou cytotoxicitu (Yuk *et al.*, 1998).

Bsp22 je unikátní 22 kDa velký protein, který je součástí jehly T3SS. Každá struktura T3SS jehly je tvořena polymerním proteinem homologním k proteinu BscF u *Bordetellae*. Nicméně protein Bsp22 tvoří takzvaný appendix nad samotnou jehlou tvořenou proteinem BscF. Podobný appendix byl rozpoznán i u bakterie *E. coli* mající protein pojmenovaný EspA homologní právě k proteinu Bsp22. Protein Bsp22 je schopen samostatně polymerizovat a tvořit filamentární strukturu injektozomu

s variabilní délkou. Jako složka jehlovité struktury T3SS je schopen vázat protein BopD, který je součástí špičky aparátu a je nezbytný pro vytvoření translokonu v cílové buňce. Dále bylo zjištěno, že imunizace myši pomocí Bsp22 vedla k poklesu kolonizace plic, a tudíž představuje alespoň částečnou ochranu před infekcí *B. bronchiseptica* (Medhekar *et al.*, 2009; Yuk *et al.*, 2000). Na rozdíl od *B. bronchiseptica* nebyl pozorován protektivní efekt imunizace Bsp22 během infekce *B. pertussis* (Villarino Romero *et al.*, 2013).

Protein BopB se skládá z 331 aminokyselin a v roce 2003 byla popsán jako protein podílející se na cytotoxicitě eukaryotických buněk. *In vitro* byl nalezen v supernatantu bakteriálních kultur, kam byl sekretován pomocí T3SS. Je konzervovaný ve všech klasických druzích bakterií rodu *Bordetellae* (Kuwaie *et al.*, 2003). Jak již bylo zmíněno výše, váže se na protein Bsp22 a je důležitý pro tvorbu translokonu (Medhekar *et al.*, 2009). BopD dokáže vytvořit komplex s proteinem BopB a spolu se podílí na vzniku translokonu v cytoplazmatické membráně hostitelské buňky (Nogawa *et al.*, 2004).

BteA, někdy také v literatuře označován jako BopC, je efektorový protein, který prochází do cytoplazmy hostitelské buňky pomocí T3SS a je odpovědný za pozorovanou cytotoxicitu během infekce *B. bronchiseptica*. BteA je 69 kDa velký protein konzervovaný ve všech klasických druzích bakterií rodu *Bordetellae*. Geny *bteA* a jeho chaperonu *btcA* jsou umístěny „upstream“ od lokusu *bsc-btr*, nicméně jsou regulovány systémem BvgAS, stejně jako ostatní složky sekrečního aparátu. BteA je sekretován pomocí T3SS do cytozolu hostitelské buňky, kde působí cytotoxicky. Cytotoxická aktivita BteA se projevuje buněčnou smrtí, která je extrémně rychlá. Role BteA v cytotoxicitě je stěžejní, protože po jeho delecii v genomu *B. bronchiseptica* nedochází k buněčné smrti. Pokud je gen *bteA* vnesen do eukaryotické buňky transfekcí, buněčná smrt nastává krátce po transfekci, ačkoli ještě nebyla detekována exprese proteinu BteA. (Kuwaie *et al.*, 2006, Panina *et al.*, 2005).

Studie ukazují, že BteA se skládá z dvou funkčních domén, přičemž prvních 130 aminokyselin N-koncové domény má schopnost lokalizovat BteA do lipidických raftů, vázat chaperon BtcA a také obsahuje T3SS sekreční signál, a C-koncová doména (131-656 aminokyselin) je zodpovědná za cytotoxicitu. Dále je N-koncová část BteA

(1-282 aminokyselin) je bohatá na  $\alpha$ -helikální struktury a prvních 31 aminokyselin domény je spjata s agregační schopností (Guttman *et al.*, 2013; French *et al.*, 2009). Je překvapivé, že BteA není produkován druhem *B. parapertussis* ačkoli stejně jako ostatní klasické druhy ve svém genomu gen *bteA* obsahuje (Hegerle *et al.*, 2013).

BopN je protein popisovaný v literatuře jako efektor, který je schopen vyvolat produkci IL-10 (Nagamatsu *et al.*, 2009). Novější studie ale popisují jeho pomocnou funkci u BteA zprostředkované cytotoxicity (Abe *et al.*, 2017). Proteinem BopN se podrobněji zabývá následující kapitola.

## 3.5 Protein BopN

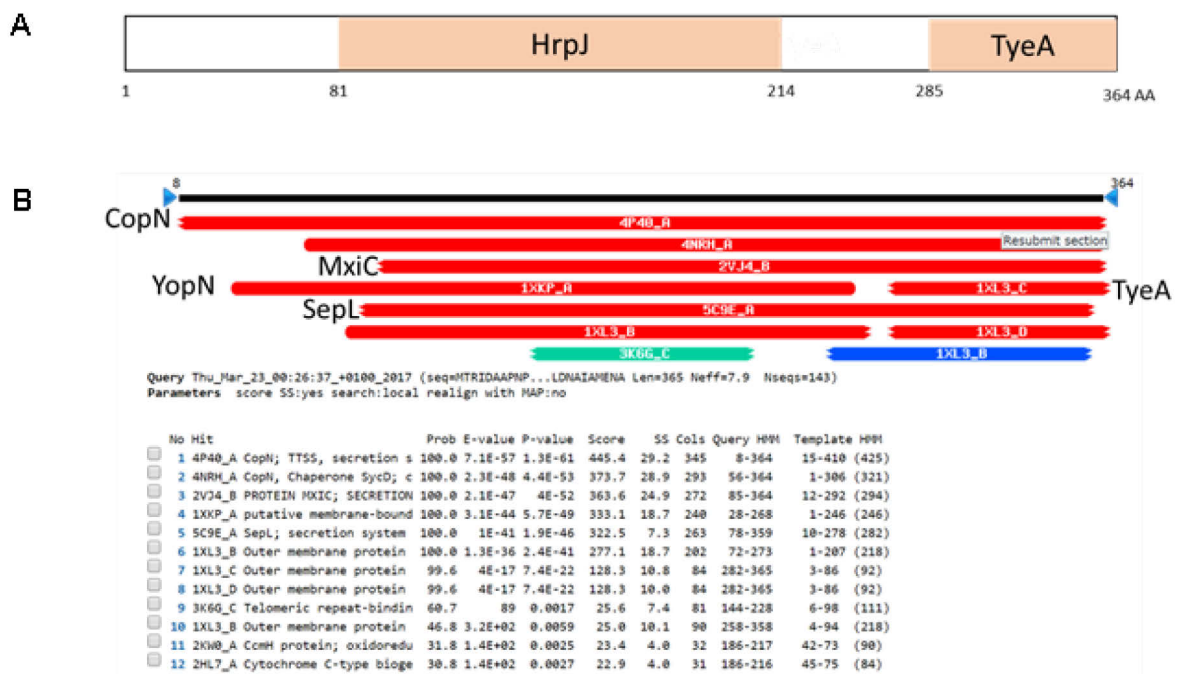
### 3.5.1 Role proteinu BopN v průběhu infekce *B. bronchiseptica*

U infekce myší kmenem s deletovaným genem kódující protein BopN byla zaznamenána silnější zánětlivá odpověď, která korelovala se snížením produkce protizánětlivého cytokinu interleukinu 10. Dále byla u tohoto kmene pozorována zvýšená poškození plicní tkáně a také zvýšená migrace myeloidních buněk imunitního systému CD11b<sup>+</sup> do místa infekce v porovnání s infekcí divokým kmenem. Pokud byl *bopN* gen vnesen na plazmidu do eukaryotické buňky a zde přímo exprimován, lokalizoval do jádra a zároveň moduloval signální dráhu NF- $\kappa$ B. Došlo k blokaci jaderného faktoru NF- $\kappa$ Bp65 a zároveň stimulaci translokace jaderného faktoru NF- $\kappa$ Bp50. Zvýšená translokace jaderného faktoru NF- $\kappa$ Bp50 poté vedla ke zvýšení produkce protizánětlivého cytokinu IL-10. Z hlediska struktury bylo ukázáno, že prvních 182 aminokyselin N-koncové domény BopN je zodpovědných za translokaci BopN do jádra hostitelské buňky, přičemž C-koncová část proteinu BopN způsobuje již zmíněnou blokaci jaderného faktoru NF- $\kappa$ Bp65 a zároveň podporuje translokaci jaderného faktoru NF- $\kappa$ Bp50. Tento protein tedy nepůsobí cytotoxicky, ale účinkuje jako imunosupresivní modulátor, který inhibuje zánětlivou odpověď imunitní buňky. Na základě těchto dat byla proteinu BopN přiřazena funkce efektorového proteinu (Nagamatsu *et al.*, 2009).

Novější studie, ale ukázala pomocný efekt proteinu BopN na cytotoxicitu zprostředkovanou efektořem T3SS, BteA, v průběhu infekce *B. bronchiseptica*. Byla tak vyslovena hypotéza, že by protein BopN mohl regulovat translokaci efektorového proteinu BteA do cytoplazmy eukaryotické buňky nebo by mohl aktivovat jeho funkci přímo v hostitelské buňce (Abe *et al.*, 2017).

### 3.5.2 Struktura proteinu BopN a jeho homologie

Protein BopN se skládá z 364 aminokyselin a jeho struktura obsahuje HrpJ doménu a oblast TyeA, která je homologní k chaperonu proteinu YopN u bakterie *Yersinia pestis*. Pro porovnání jeho homologie s ostatními bakteriálními proteiny byl použit software HHpred (predikční software pro proteinovou strukturu). Na základě výsledků získaných z tohoto softwaru je zřejmé, že protein BopN je homologní s dalšími proteiny gram-negativních bakterií, jmenovitě s YopN bakterie *Yersinia pestis*, CopN *Chlamydia pneumoniae*, MxiC *Shigella flexnerii* a SepL *Escherichia coli* (obr. č. 11).



**Obrázek č. 11: (A)** Schéma proteinu BopN, který se skládá z 364 aminokyselin. Spolu s HrpJ doménu je ve struktuře proteinu BopN zakomponován i úsek TyeA, který je homologní k chaperonu proteinu YopN bakterie *Yersinia pestis*. Dle struktury je tedy protein BopN chimérou HrpJ domény a chaperonu. **(B)** Obrázek znázorňuje homologie proteinu BopN s proteiny ostatních gram-negativních bakterií, jmenovitě YopN bakterie *Yersinia pestis*, CopN *Chlamydia pneumoniae*, MxiC *Shigella flexnerii* a SepL *Escherichia coli*. Dostupné z toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred.

### 3.5.3 Biologická funkce homologů proteinu BopN

Proteiny homologní k proteinu BopN zmíněné v kapitole 3.5.2 jsou součástí T3SS, ve kterém mají regulační roli. Fungují jako „zátky“ nebo také „hlídači“ znemožňující sekreci efektorů, dokud nenastanou vhodné podmínky (například kontakt s cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky). Proteiny „zátky“ se podílejí na časové regulaci sekrece pomocí T3SS a jejich delecí dochází ke zvýšení úrovně sekretovaných efektorů. Nicméně účinky na sekreci translokátorů jsou odlišné.

#### 3.5.3.1 Protein YopN u bakterií rodu *Yersinia*

Již v roce 1994 byl popsán proces sekrece efektorového proteinu YopE do cytoplazmy hostitele, který byl regulován proteinem YopN. Bylo navrženo, že protein YopN se nachází na povrchu bakterie, kde monitoruje koncentraci  $Ca^{2+}$  a povrchové struktury cílových buněk, a následně přenáší signál intracelulárním regulátorům (Rosqvist *et al.*, 1994). Delece genu *yopN* vede ke zvýšené sekreci pomocí T3SS, což dokazuje jeho roli jako regulátoru množství sekretovaných proteinů skrze T3SS. Sám o sobě však není translokován do hostitelské buňky (Boland *et al.*, 1996).

YopN svou N-koncovou CBD doménou (32–76 aminokyselin) váže na chaperony SycN/YscB, což je příčinou translokace proteinu YopN. Naopak vazba s chaperonem TyeA jeho C-koncovou TBD doménou způsobuje redukci translokace proteinu YopN. Po kontaktu s hostitelskou buňkou je TyeA disociován a sekrece je zahájena. Novější studie dokládají, že YopN/TyeA/SycN/YscB komplex kontroluje sekreci z cytozolu, je tedy cytozolickou strukturou T3SS (Cheng *et al.*, 2001, Plano a Schesser, 2013). Nejen YopN, ale i celý regulační komplex YopN/TyeA/SycN/YscB je citlivý na přítomnost  $Ca^{2+}$ . Během růstu divokého typu bakterií *Yersinia* v médiu s vápenatými ionty je pozorována sekrece časných a středních substrátů T3SS, zatímco pozdní substráty se ve velkém množství neuvolňují, dokud nedojde k chelataci vápenatých iontů nebo kontaktu s hostitelskou buňkou. Sekrece středních a pozdních efektorových proteinů nastává po delecí jakéhokoliv proteinu z komplexu YopN/TyeA/SycN/YscB a již nezáleží na přítomnosti či nepřítomnosti vápenatých iontů (Dewoody *et al.*, 2013) Novější studie potvrdila dřívější data, že YopN není translokován do cytozolu hostitelské buňky



a za translokaci efektorových proteinů je odpovědná centrální část YopN (Bamyaci *et al.*, 2018).

### **3.5.3.2 Protein MxiC bakterie *Shigella flexnerii***

MxiC se skládá z 355 aminokyselin a je nezbytný k zabránění předčasné sekrece efektorů skrze T3SS u *Shigella flexnerii*. Po kontaktu s hostitelskou buňkou se pomocí MxiC aktivuje sekrece efektorů, přičemž sám MxiC je translokován do cytoplazmy hostitelské buňky. Inaktivace MxiC vedla k deregulované sekreci efektorů, avšak bez efektu na translokátorové proteiny nebo na ostatní proteiny T3SS. Byl prokázán i kontakt MxiC s ATPázou, což naznačuje, že MxiC může zabránit sekreci efektorů blokováním T3SS zevnitř (Botteaux *et al.*, 2009). Model sekrece skrze T3SS u *S. flexnerii* naznačuje, že špička jehly snímá povrch hostitelské buňky a tento signál je přenášen do cytoplazmy, kde nejprve dojde k uvolnění a sekreci proteinu MxiC a posléze k zahájení sekrece efektorových proteinů. Studie z roku 2013 uvádí, že kromě potlačení sekrece efektorů, MxiC blokuje i sekreci translokátorů (Martinez Argudo a Blocker, 2010).

### **3.5.3.3 Protein CopN bakterie *Chlamydia pneumoniae***

I protein CopN, produkováný bakteriemi *Chlamydie* ssp., slouží jako regulační „zátká“ při sekreci efektorových proteinů pomocí T3SS. Stejně jako MxiC je i CopN translokován do hostitelské buňky (Fields a Hackstadt, 2000). Role proteinu CopN je tedy dvojitá - působí jako efektor, ale i jako „zátká“ pro sekreci efektorů. Svým N-koncem váže chaperon a umí také kontrolovat buněčné dělení (Archuleta *et al.*, 2011).

## 4 Materiál a metodika

### 4.1 Přístrojové vybavení, chemikálie a ostatní materiál

#### 4.1.1 Přístrojové vybavení

aparatura pro DNA elektroforézu - Bio-rad, USA

CO2 inkubátor – Sanyo MCO-18 AIC, Panasonic, Japonsko

digitální analytické váhy - Mettler Toledo AB 104-8, SRN

dokumentace agarózových gelů - G-BOX Syngene, Biocon, Indie

hmotnostní spektrometr - Thermo Orbitrap Fusion, Thermo Fisher Scientific, USA

laminární box - Gelaire, Flow Laboratories, Skotsko

mikrovlnná trouba - Daewoo, Korea

mrazící box (-20 °C) - Zanussi, Itálie

mrazící box (-80 °C) - Jouan, Francie

odstředivka - Biofuge pico, Heraeus Instruments, SNR

odstředivka - Sorval Lynx 400, Thermo Fisher Scientific, USA

PCR cykler - T100 Thermal Cycler, Bio-rad, USA

pH-metr InoLab - WTW, SRN

předvážky Nagemma - OWA Labor, NDR

scintilační kapalinový počítač - Hidex SL 600, Finsko

Spektrometr - CO 8000 cell density meter, WPA, Velká Británie

suchý termostatovaný blok - Accu Block™ Labmet International, Inc., USA

termostatová vodní lázeň - Memmert, Unimed ČR

třepačka- innova® 43, New Brunswick Scientific, Edison, USA

vakuová odparní centrifuga - Savant SpeedVac Concentrator,  
Thermo Fisher Scientific, USA

vortex - Minishake 1, IKA-Works, Internacional, USA

zařizování pro Western Blot - Trans-Blot® SD, BioRad, USA

zařizování pro detekci chemiluminiscenčních signálů - G-BOX Chemi XT 16,

Syngene, Velká Británie

zdroj pro elektroforézu - PowerPac™ Basic, BioRad, USA

#### **4.1.2 Seznam použitých chemikálií, komerčních sad a ostatního materiálu**

[2,8-3H]cAMP, Amersham, USA adenosin-5'-trifosfát (ATP) - Amersham, USA

[ $\alpha$ -32P]ATP - Amersham, USA

1,4-dithiotreitol (DTT) - Stratagene, USA

aceton - VWR, Francie

acetonitril - Lachema, Neratovice

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

agaróza pro DNA elektroforézu - Appligene, Francie

akrylamid - Biochemical Corp., USA

amonium bikarbonát- AcrosOrganics, USA

ampicilin - Biotika, SR

analytická voda - VWR, Francie

bakteriologický agar - Oxoid, Velká Británie

bakto-trypton - Oxoid, Velká Británie

bromfenolová modř - Sigma, USA

CaM (kalmodulin) - MBÚ, Praha

CAS - BD, Francie

cefalexin - Sigma, USA

Coomassie blue R-250 - Serva, SRN

cyklodextrin - Zibo Qianhui Biological Technology Co., Ltd, Čína

DF pufr - Geneaid Biotech, Taiwan

dihydrogenfosforečnan draselný - Sigma-Aldrich, USA

dimethylsulfoxid (DMSO) - Sigma-Aldrich, USA

DNA vazebné kolonky - Geneaid Biotech, Taiwan

dNTP mix (roztok 10 mmol/l) - MBI Fermentas, Litva  
ethanol - Lachema, Brno  
ethidium bromid - Serva, SRN  
ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) - Serva, SRN  
glukosa - Lachema, Brno  
glutamát sodný - Sigma, USA  
glycerol - Lachema, Neratovice  
hovězí sérový albumin (BSA) - Sigma, USA  
hydrogenfosforečnanisodný (dodekahydrát) - Lachema, Neratovice  
hydrolyzát kaseinu - Oxoid, Velká Británie  
hydroxid sodný - Lachema, Neratovice  
chloracetamid - abcam, Velká Británie  
chloramfenikol - Sigma, USA  
chlorid draselný - Lachema, Neratovice  
chlorid hořečnatý - Fluka, Švýcarsko  
chlorid sodný - Lachema, Neratovice  
chlorid vápenatý - Lachema, Neratovice  
isopropanol - Lachema, Brno  
kanamycin - Sigma, USA  
kvasničný extrakt - Oxoid, Velká Británie  
kyselina askorbová - Sigma, USA  
kyselina chlorovodíková - Lachema, Neratovice  
kyselina mravenčí - Sigma, USA  
kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES) - Serva, SRN  
kyselina nikotinová - Sigma, USA  
kyselina octová - Lachema, Neratovice  
kyselina orthofosforečná - Lachema, Neratovice  
kyselina trichloroctová (TCA) - Sigma, USA  
L- cystein hydrochlorid - Sigma, USA  
L-glutathion - Appli Chem, Německo

methanol - Lachema, Neratovice  
mléko odtučněné sušené - Milli, Opočno  
močovina - Lachema, Neratovice  
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethan (TEMED) - Merck, SRN  
nitrocelulóková membrána - BioTrace NT, Pall, USA  
octan draselný - Lachema, Neratovice  
odsolovací kolonky Acclaim PepMap300 - Thermo Fisher Scientific, USA  
oxid hlinitý - Merck, Germany  
pankreatická ribonukleáza (RNáza) - Fermentas International Inc., Kanada.  
peroxodisíran amonný (APS) - Serva, SRN  
prolin - Sigma, USA  
proteinový standard - Thermo Fisher Scientific, USA  
scintilační roztok - Opti Fluor®, Perkin Elmer®, USA  
SDS - Serva, SRN  
separační kolony EASY-Spray column - Thermo Fisher Scientific, USA  
síran hořečnatý - Sigma-Aldrich, USA  
souprava pro izolaci DNA - Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Cat. no. DF300  
Geneaid Biotech, Taiwan  
SuperSignal® West Femto - Thermo Fisher Scientific, USA  
tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) - Serva, SRN  
tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl) - Serva, SRN  
tris-báze - Serva Electrophoresis, SRN  
triton X-100 - Amersham, USA  
trypsin GOLD - Promega, USA  
Tween 20 - Sigma-Aldrich, USA  
ultrafiltrační mikrokolona Microcon 30 - Thermo Fisher Scientific, USA  
W1 pufr - Geneaid Biotech, Taiwan  
Wash pufr - Geneaid Biotech, Taiwan  
 $\beta$ - merkaptoethanol - Merck, SRN  
 $\lambda$ -DNA - MBI Fermentas - Litva

#### 4.1.3 Seznam použitých enzymů

Herkuláza – Herculase II Fusion DNA Polymerase, Aligent Technologies, USA

T4 ligáza - Thermo Fisher Scientific, USA

*RE	Zásahové místo	Pufř	Reakční teplota	Výrobce
<i>BamHI</i>	G/GATCC	2.1, 3.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>BstXI</i>	CCANNNNN/NTGG	3.1	37 °C	England Biolabs, USA
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	2.1*	37 °C	England Biolabs, USA
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC	3.1	37 °C	England Biolabs, USA
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	2.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	1.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>MfeI</i>	C/AATTG	CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>MluI</i>	A/CGCGT	3.1	37 °C	England Biolabs, USA
<i>NdeI</i>	CA/TATG	2.1, 3.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC	3.1	37 °C	England Biolabs, USA
<i>SacI</i>	GAGCT/C	1.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>SpeI</i>	A/CTAGT	2.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	2.1, 3.1, CS	37 °C	England Biolabs, USA

\*RE = restriční endonukleáza

##### Složení pufřů:

NEB pufř 1.1: 10mM Bis Tris Propan-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100μg/ml BSA, pH 7,9. New England Biolabs, USA.

NEB pufř 2.1: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100μg/ml BSA, pH 7,9. New England Biolabs, USA.

NEB pufř 3.1: 100mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 100μg/ml BSA, pH 7,9. New England Biolabs, USA.

NEB pufř CutSmart (CS): 50mM acetát draselný, 20mM Tris-acetát, 10mM acetát hořečnatý, 100μg/ml BSA, pH 7,9 New England Biolabs, USA.

U všech enzymů byla 100% aktivita v uvedených pufřech.

#### 4.1.4 Seznam použitých protilátek a sér a jejich ředění

Anti-Bsp22 myší sérum (MBÚ, Praha), ředění 1:3000 v TBST (4.1.6) pufřu s 3% BSA a 0,01% azidem.

Anti-BopN myší sérum (MBÚ, Praha), ředění 1:10 000 v TBST (4.1.6) pufřu s 3% BSA a 0,01% azidem.

Anti-BteA myší sérum (MBÚ, Praha), ředěné 1:30 000 v TBST (4.1.6) pufru s 3% BSA a 0,01% azidem.

Anti-myší sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (GE Healthcare, Velká Británie).

#### 4.1.5 Seznam použitých primerů

##### 4.1.5.1 Primery použité při konstrukci plazmidů

Název	Nukleotidová sekvence (5'-3')	Délka (pb)	RE*
106BopN1f	CTCG <b>ACTAGT</b> CGAAAGCCTCGTTGCGCTTGTTG	33	<i>Spe</i> I
193BopN1r	TCTC <b>GAATTC</b> ATTGGGGGCGGCATCGATCGATACGAG	37	<i>Eco</i> RI
194BopN2f	TCAG <b>GAATTC</b> AACGCGATAGCAATGGAGAACGCATG	36	<i>Eco</i> RI
195BopN2r	TCTC <b>GGATCC</b> GCAGCTTTCCGGCCTCGTTGAG	32	<i>Bam</i> HI
39BteAh1f	CTCG <b>GCGGCCG</b> CGGACTTTCTTGCCAAGCGCGTG	34	<i>Not</i> I
40BteAh1r	TCAGAATTC <b>CTCGAG</b> ACTAGTCATATGCGGGTCTCCGTGG	41	<i>Xho</i> I
41BteAh2f	ATGACTAGT <b>CTCGAG</b> GAATTCGACGGCGAGGCGTTTCG	38	<i>Xho</i> I
42BteAh2r	TACAG <b>GGATCC</b> CTGCTGTGCTGGCGCATG	30	<i>Bam</i> HI
43BscNh1f	CTCG <b>ACTAGT</b> CTGGTGCTGTCCATGCTCGAAATCC	35	<i>Spe</i> I
44BscNh1r	TTAGGATCC <b>GAGCTC</b> CTCGAGCATGCCCTATCCGCGCC	39	<i>Sac</i> I
45BscNh2f	ATGCGCGAG <b>GAGCTC</b> GGATCCTAATGGACCTGGAAAGCCTGTTGC	46	<i>Sac</i> I
46BscNh2r	TCAG <b>GAATTC</b> CAGTTCTTCCTTCGCTTTCTCCTGTTCC	38	<i>Eco</i> RI
35TEmf	CTCG <b>AAGCTT</b> ACGCGTGGATCTGGTATGCACCCAGAAACGCTGGTGAAAG	50	<i>Hind</i> III
36TEMr	CTG <b>GGATCC</b> TCACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC	37	<i>Bam</i> HI
37ACf	CTCG <b>AAGCTT</b> ACGCGTGGATCTGGTATGCAGCAATCGCATCAGGC	45	<i>Hind</i> III
38ACr	CTG <b>GGATCC</b> TCACGAACGTCCGCTCGGCAC	31	<i>Bam</i> HI
187BBpBteAf	ACTAAAGGGAACAAAAGCTG <b>GGTACC</b> AGGCGTCTCCTGGGCATG	44	<i>Kpn</i> I
182sigBteAr	TGCATACCAGATCCACGCGT <b>AAGCTT</b> CACGTCAGATTGGCATGGC	46	<i>Hind</i> III
184pBopNf	ACTAAAGGGAACAAAAGCTG <b>GGTACC</b> GAGGGCTCCTTCGAGTTGAAAG	48	<i>Kpn</i> I
185BopNr	TGCATACCAGATCCACGCGT <b>AAGCTT</b> TGCGTTCTCCATTGCTATCGC	47	<i>Hind</i> III
72ACTe5D445h1f	CTCG <b>GCGGCCG</b> CATGCAGCAATCGCATCAGGC	32	<i>Not</i> I
73 ACTe5D445h1r	ATT <b>ACTCGAG</b> ATCCGCCGTCAGTGGAATACC	31	<i>Xho</i> I
74 ACTe5D445h2f	AATT <b>CTCGAG</b> ATCGACATGTTCCGCATCATGC	32	<i>Xho</i> I
75 ACTe5D445h2r	TCAG <b>GGATCC</b> GGACTTCGAACGTCCGCTCG	30	<i>Bam</i> HI

#### 4.1.5.2 Sekvenační primery

Název	Nukleotidová sekvence (5'-3')	Délka (pb)
94vBscNf	GAATTCGCCGTGTCTCCG	20
95vBscNr	GACAAGGTGGTGTCCGGTAG	20
85vBteAf	CGTGCATTGCATCTACCCGT	20
96vBteAr	AGGCCGTCAATCACCACATT	20
106BopN1f	CTCGACTAGTCGAAAGCCTCGTTGCGCTTGTTG	33
195BopN2r	TCTCGGATCCGCAGCTTCCGGCCTCGTTGAG	32
T7fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	23
M13rev	AACAGCTATGACCATG	16
pSS4245for	CGCAGATGATGTACAAACTGCC	22
pSS4245rev	CCATCAAGAAGAGCGACTTCGC	22

#### 4.1.6 Použité roztoky a pufrы

##### Agarózový gel

Agaróza byla povařením rozpuštěna v TBE (4.1.6) pufru (dle požadované koncentrace). Ethidium bromid byl přidán do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml.

##### BFB nanášecí pufr pro agarózový gel

Bromfenolová modř	0,25 % (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)

##### SOL I (pH 8)

Glukóza	50 mM
EDTA	10 mM
Tris-HCl	25 mM



**SOL II**

NaOH	0,2 mM
SDS	1 % (w/v)

**SOL III**

octan draselný	3 M
kyselina octová	11,5 % (v/v)

**Laemli pufr (pH 6,8)**

Tris-HCl	50 mM
DTT	100 mM
Glycerol	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromfenolová modř	0,1 % (w/v)
$\beta$ -merkaptoethanol	10 % (v/v)

### SDS gel

<b>Dělicí gel</b>	<b>10 %</b>	<b>12,5 %</b>
30% akrylamid	1,66 ml	2,07 ml
H <sub>2</sub> O	1,38 ml	0,98 ml
1M Tris (pH 8,8)	1,87 ml	1,87 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
25% APS	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl
<b>Zaostřovací gel</b>		
30% akrylamid	0,266 ml	0,266 ml
H <sub>2</sub> O	1,8 ml	1,8 ml
1M Tris (pH 6,8)	1,87 ml	1,87 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
25% APS	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl

### Transferový (blotovací) pufr

Tris-báze	25 mM
Glycin	20 mM
Metanol	20 % (w/v)

### Blokovací pufr

Sušené mléko	3 % (w/v)
TBST	

### **TBS (pH 7,6)**

Tris-HCl	20 mM
NaCl	137 mM

### **TBST**

Tween® 20	0,1 % (v/v)
TBS (pH 7,6)	

### **TB pufr**

HEPES	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
KCl	25 mM

Roztok byl připraven v ultra čisté vodě a pH bylo upraveno pomocí KOH na 6,7. Těsně před použitím byl přidán MnCl<sub>2</sub> na finální 50mM koncentraci.

### **Činidlo Bradfordové**

Coomassie Brilliant blue R-250	0,01 % (v/v)
Ethanol	4,7 % (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8,7 % (v/v)

### **Tris-glycinový pufr (pH 8,3)**

Tris-báze	25 mM
Glycin	250 mM
SDS	0,1 % (w/v)

### **TBE pufr (pH 8,3)**

Tris-borát	90 mM
EDTA	2 mM

### **Reakční směs pro stanovení adenylát cyklázové aktivity**

Tris-HCl (pH 8,0	60 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,1 mM
Triton X-100	0,1 % (v/v)
BSA	1 mg/ml
CaM	1 μM
cAMP	0,1 mM
[2,8-3H]cAMP	200 CPM/μl
ATP	20 mM
[α-32P]ATP	10 000 – 20 000 CPM/μl

Směs je uchovávána v teplotě -20 °C.

### **PBS**

NaCl	138 mM
KCl	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22 mM

pH bylo upraveno pomocí HCl na 7,4.

## TUS pufr

Tris pH 8,0	50 mM
Močovina	8 M
SDS	2 % (w/v)

### 4.1.7 Použitá kultivační média

#### Luria-Bertani (LB) médium

<i>LB médium (tekuté, pH 7)</i>	
Bakto-trypton	1 % (w/v)
Kvasničný extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	171 mM

5 M NaOH bylo pH média upraveno na 7,0, sterilizováno autoklávováním (0,12 MPa, 20 min) a médium bylo následně uchováváno při 4 °C.

**Tuhé LB médium** – médium vzniklo tím, že se do tekutého LB média před sterilizací přidalo 18 g/l bakteriologického agaru. Následně bylo médium uchováváno při 4 °C.

**Tuhé či tekuté LB médium obohacené o antibiotikum** – médium vzniklo přidáním příslušného antibiotika o koncentraci: ampicilin (Amp) 100 µg/ml, kanamycin (Km) 30 µg/ml, chloramfenikol (Cm) 30 µg/ml.

### **SOB médium (z angl. Super optimal broth)**

Bakto-trypton	2 % (w/v)
Kvasničný extrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

Autoklávováním (0,12 MPa, 20 min) bylo médium sterilizováno a před použitím byly přidány zfiltrované 1 M roztoky MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub>.

### **Tuhé Bordet-Gengou (BG) médium**

BG agar (Difco™)	3 % (w/v)
Glycerol	1 % (v/v)

Autoklávováním (0,12 MPa, 20 min) bylo médium sterilizováno a následně uchováváno při 4 °C.

**Tuhé BG médium obohacené 15 % beraní krví** – nejprve bylo připraveno tuhé BG, které bylo vytemperováno na 50 °C. Následně byla přidána defibrinovaná beraní krev na konečnou koncentraci 15 %. Takto upravené médium bylo rozlito po ~ 20 ml do Petriho misek o průměru 90 mm.

**Tuhé BG médium obohacené 15 % beraní krví antibiotiky nebo solemi** – nejprve bylo připraveno tuhé BG, které bylo vytemperováno na 50 °C. Následně byla přidána defibrinovaná beraní krev na konečnou koncentraci 15 %. Dále byl přidán 50 mM síran hořečnatý (MgSO<sub>4</sub>), 10 mM chlorid hořečnatý (MgCl<sub>2</sub>) nebo antibiotika o koncentraci uvedené níže v tabulce. Takto upravené médium bylo rozlito po ~ 20 ml do Petriho misek o průměru 90 mm.

Ampicilin (Amp)	100 µg/ml
Kanamycin (Km)	125 µg/ml
Streptomycin (Str)	500 µg/ml
Chloramfenikol (Cm)	30 µg/ml; 60 µg/ml
Cefalexin (Cphx)	10 µg/ml

### Stainer-Scholte (SS) médium (pH 7)

<b>Frakce A (koncentrace 10x)</b>	
Tris-HCl	403,6 mM
Tris (báze)	97,4 mM
Glutamát sodný	572,8 mM
Prolin	20,8 mM
NaCl	427,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36,7 mM
KCl	26,8 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	4,9 mM
<b>Frakce B (koncentrace 100x)</b>	
L-cystein hydrochlorid monohydrát	33 mM
Kyselina askorbová	11,3 mM
L-glutathion (redukovaný)	32,5 mM
Kyselina nikotinová	3,3 mM
Hydrolyzát kaseinu	5 % (w/v)
Cyklodextrin	1 % (w/v)

Kompletní SS médium bylo vytvořeno z frakcí A a B po jejich smíchání a rozředění se sterilní tkáňovou vodou. Po smíchání obou frakcí je doba spotřeby ~ 1 týden. Bylo také použito tekuté SS medium s přidavkem antibiotika chloramfenikol v koncentraci 30 µg/ml.

#### 4.1.8 Použité plazmidy

Pro modifikaci bakteriálního chromozomu *B. bronchiseptica* D445 byl použit plazmid pSS4245 (S. Stibitz, USA), který obsahuje unikátní klonovací místo a kóduje geny pro rezistenci na ampicilin (Amp), kanamycin (Km), neomycin (Neo) a streptomycin (Str). Plazmid dále obsahuje gen pro restriční endonukleázu I-SceI a unikátní místo štěpení touto restriční endonukleázou. Promotor genu pro restriční endonukleázu I-SceI je pod promotorem *ptx*, který je kontrolován systémem BvgAS. Tento plazmid patří mezi takzvané sebevražedné plazmidy, protože není schopen samostatné replikace v bakterii *B. bronchiseptica*.

Pro reportérový systém a komplementaci mutovaných kmenů *B. bronchiseptica* byl využit plazmid pBBRI (Antoine a Locht, 1992) Tento plazmid obsahuje gen kódující rezistenci na chloramfenikol.

Jako templát pro amplifikaci enzymu  $\beta$ -laktamáza (TEM) byl použit plazmid SpyTag- $\beta$ -Lactamase-SpyCatcher (Addgene, USA) (Schoene *et al.*, 2014).

#### 4.1.9 Použité bakteriální kmeny

Kmen *E. coli* XL1-blue (Stratagene, USA) byl použit pro konstrukci plazmidů. Tento kmen v sobě obsahuje gen pro rezistenci na tetracyklin.

Kmen *E. coli* SM10  $\lambda$ pir (Biomedal, Španělsko) byl použit ke konjugačnímu přenosu plazmidové DNA do bakterie *B. bronchiseptica* D445. Tento kmen obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin (Km) a chromosomálně kódované *Tra* geny, které jsou v průběhu bakteriální konjugace zodpovědné za přenesení plazmidu do přijímající bakterie.

Klinický izolát *B. bronchiseptica* D445 (Diavatopoulos *et al.*, 2005) byl použit pro konstrukci geneticky modifikovaných kmenů.



#### **4.1.10 Použitý software**

K navržení konstruktů byl použit program ApE (A Plasmid Editor, verze ApE 2.0.49).

Na zpracování dat z hmotnostní spektrometrie byl použit software MaxQuant (verze 1.5.3.8) a Perseus (verze 1.5.2.4)

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce sloužila k amplifikaci fragmentů při konstrukci plazmidů a k ověřování modifikace genomu konstruovaných kmenů. Templátem reakce byl lyzát bakterie *B. bronchiseptica* D445 vytvořený za použití narostlé bakteriální kolonie přímo z agarové plotny. Malé množství biomasy bylo přeneseno do ultračisté vody, následně povařeno (95 °C po dobu 5 minut), 1 µl této směsi byl následně použit pro PCR reakci. PCR reakce o celkovém objemu 25 µl dále obsahovala: 5 µl 5x koncentrovaného Herkuláza pufru, 2,5 µl dNTP mix o koncentraci 10 mmol/l, 2,5 µl 10% DMSO, 5 µl patřičných primerů „forward a reverse“ o koncentraci 5 µM a 0,5 µl enzymu Herkuláza polymerázy. Pro zkonstruování reportérového systému založeného na enzymu β-laktamáza (TEM) byl jako templát použit plazmid kódující gen β-laktamázu SpyTag--β-Lactamase-SpyCatcher (4.1.8).

<b>Cyklus PCR</b>		
Inicializace	98 °C	2 minuty
Denaturace	98 °C	20 s
Nasedání primerů	57 °C až 62 °C	20 s
Syntéza DNA	72 °C	30s – 3 minuty
Finální syntéza DNA	72 °C	3 minuty

Denaturace, nasedání primerů a syntéza DNA se opakovala 30x. Nasedání primerů probíhalo v gradientu teplot dle „melting temperature“ udávané výrobcem primerů. Doba syntézy DNA závisí na velikosti očekávaného fragmentu (1min ≈ 1 kpb).

### 4.2.2 Elektroforéza v agarózovém gelu

Separace DNA fragmentů probíhala pomocí horizontální elektroforézy, na kterou byl použit agarózový gel (4.1.6), jehož hmotnostní koncentrace (0,6 % – 1,5 %) závisela na velikosti fragmentů DNA a který byl obohacen o ethidium bromid v koncentraci

0,5 µg/ml. Rozvařený agarózový gel byl vytemperován na teplotu 50 °C a následně nalit do formy s hřebínkem. Hřebínek byl po ztuhnutí vyjmut a gel s nosnou deskou byl vložen do aparatury pro DNA elektroforézu, kde byl ponořen do TBE pufru (4.1.6). Do jamek v gelu byly poté nanášeny vzorky smíchané s 5x koncentrovaným bromfenolovým nanášecím pufrem (4.1.1) a jako standard k určení velikosti fragmentů byl použit  $\lambda$ -DNA naštěpený pomocí restriční endonukleázy *Pst*I. Rozdělení DNA fragmentů probíhalo při napětí 100 V po dobu 30 minut, v případě izolace linearizovaného plazmidu při napětí 50 V po dobu 1 hodiny. Separovaná DNA byla následně vizualizována pod UV světlem.

#### **4.2.3 Izolace DNA pomocí komerční sady Geneaid**

Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu byla prováděna pomocí komerční sady Geneaid. Fragment DNA byl skalpelem vyříznut z agarózového gelu tak, aby maximální hmotnost byla 0,3 g. K fragmentu bylo následně přidáno 500 µl DF pufru a inverzně promíchaná směs byla inkubována v 50 °C až do rozpuštění agarózy (10-15 minut). Vzorky zchlazené na pokojovou teplotu byly nanášeny na kolonu a odstředěny (13 250 g, 30 s, RT °C). Tento krok byl opakován 2x. Následně bylo na kolonu nanášeno 400 µl W1 pufru a kolona byla odstředěna (13 250 g, 30 s, RT °C). Poté byla kolona promyta 600 µl wash pufru s přidaným ethanolem a odstředěna (13 250 g, 30 s, RT °C). Sběrná mikrozkušavka byla vyměněna za čistou a následovalo odstředění (13 250 g, 5 minut, RT °C) pro úplné odstranění etanolu, který je obsažen v promývacím pufru. Sběrná mikrozkušavka byla opět vyměněna za čistou a na kolonu navázaná DNA byla eluována do 40 µl 10 mM Tris předeštěného na 50 °C. Eluce byla pro vyšší výtěžnost opakována 2x (13 250 g, 2 minuty, RT °C).

#### **4.2.4 Štěpení DNA pomocí restričních endonukleáz**

Restriční ověření plazmidů probíhalo ve 20 µl. K 5 µl plazmidové DNA byly přidány 2 µl 10x koncentrovaného NEB pufru, který byl zvolen specificky pro danou restriční endonukleázu, dále ultračistá voda a 0,5 µl patřičné restriční endonukleázy či jejich kombinace. Restriční štěpení eluovaného PCR produktu probíhalo ve 40 µl. K 32 µl

eluovaného PCR produktu byly přidány 4  $\mu\text{l}$  10x koncentrovaného NEB pufru, který byl zvolen specificky pro danou restriční endonukleázu, dále ultračistá voda a 2  $\mu\text{l}$  patřičné restriční endonukleázy či jejich kombinace. Promíchaná směs byla inkubována ve vodní lázni při 37 °C po dobu 2 hodin.

#### 4.2.5 Ligace DNA fragmentů pomocí T4 ligázy

Ligaci předcházelo rozdělení fragmentů na horizontální elektroforéze (4.2.2). Pokud byly fragmenty stejné intenzity, pak pro ligaci do plazmidu pSS4245 se ligační směs skládala z 6  $\mu\text{l}$  fragmentu 1, 6  $\mu\text{l}$  fragmentu 2, 2  $\mu\text{l}$  linearizovaného plazmidu pSS4245 (4.1.8), 3  $\mu\text{l}$  10x koncentrovaného T4 pufru a 1  $\mu\text{l}$  T4 ligázy doplněného ultračistou vodou do celkového objemu 30  $\mu\text{l}$ . Pokud byl ligován plazmid pBBRI (4.1.8), pak se ligační směs skládala z 6  $\mu\text{l}$  fragmentu, 3  $\mu\text{l}$  linearizovaného plazmidu pBBRI, 2  $\mu\text{l}$  10x koncentrovaného T4 pufru a 1  $\mu\text{l}$  T4 ligázy doplněného ultračistou vodou do celkového objemu 20  $\mu\text{l}$ . Po promíchání se směs ligovala při pokojové teplotě po 2 hodin.

#### 4.2.6 Příprava kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue a *E. coli* SM10 $\lambda$ pir

Nejprve byly bakterie *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9) z konzervy dlouhodobě uchovávané při -80 °C vyočkovány na tuhé LB médium. Jelikož tento kmen nese gen pro rezistenci na tetracyklin, obsahovalo tuhé LB médium (4.1.7) tetracyklinové antibiotikum o koncentraci 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Kultivace probíhala po dobu 16 hodin při 37 °C. Podobně, bakterie *E. coli* SM-10  $\lambda$  pir (4.1.9) byly nejprve z konzervy vyočkovány na tuhé LB médium s kanamycinem o koncentraci 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  na které je bakterie rezistentní a kultivace probíhala po dobu 16 hodin při 37 °C. Narostlé bakterie byly přeočkovány do 50 ml tekutého LB média s přidaným tetracyklinem o koncentraci 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  nebo kanamycinem o koncentraci 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , kde byly kultivovány přes noc (~12 hod, 37 °C). Z tekutého LB média bylo následně přeneseno 10 ml kultury do 500 ml SOB média (4.1.7), ve kterém byly bakterie za intenzivního třepání dále kultivovány po dobu 4 hodin při 30 °C do  $\text{OD}_{600} = 0,6$ . Narostlá kultura byla odstředěna v 50 ml zkumavkách (700 g, 10 minut, 4 °C). Poté byl supernatant odstraněn, k peletům bylo přidáno 20 ml vychlazeného (4 °C) TB pufru (XL-1) (4.1.6) nebo 100 mM  $\text{CaCl}_2$  (SM10  $\lambda$ pir). Bakterie

byly mírným třepáním resuspendovány a 10 minut inkubovány na ledu s následným odstředěním při 700 g po dobu 10 minut za teploty 4 °C. Poté byl supernatant opět odstraněn a k peletům byly přidány 4 ml vychlazeného (4 °C) TB pufru (XL-1) nebo 100 mM CaCl<sub>2</sub> (SM10 λpir), ve kterém byly bakterie za mírného třepání resuspendovány. K resuspendovaným bakteriím bylo po kapkách přidáváno DMSO do výsledné koncentrace 7%. Následovala inkubace suspenzí na ledu, rozdělení do sterilních mikrozkuvek po 200 µl a okamžité zamražení tekutým dusíkem. Takto připravené kompetentní buňky byly dlouhodobě skladovány v -80 °C.

#### **4.2.7 Transformace plazmidu metodou teplotního šoku**

K 15 µl směsi DNA po ligaci bylo přidáno 150 µl kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). K 2 µl plazmidové DNA získané minipreparativní izolací bylo přidáno 130 µl kompetentních buněk *E. coli* SM10 λpir (4.1.9). V obou případech byla směs inkubována 15 minut na ledu, 5 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C a poté opět inkubována 2 minuty na ledu. Následně byl přidán 1 ml předtemperovaného tekutého LB média (4.1.6) a bakterie byly za intenzivního třepání kultivovány po dobu 1 - 2 hodin při teplotě 37 °C. Kultura byla následně odstředěna při 3 000 g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Pelet byl resuspendován v 100 µl supernatantu a nanesen na Petriho misky s tuhým LB médiem obohacené o ampicilin (100 µg/ml), kanamycin (30 µg/ml) či chloramfenikol (15 µg/ml) dle transformovaného plazmidu. Takto vyšetě buňkami byly kultivovány přes noc při teplotě 37 °C.

#### **4.2.8 Minipreprave plazmidové DNA**

Plazmidová DNA byla získána metodou alkalické lyze, 2 ml tekuté kultury *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9) s patřičným antibiotikem byly za intenzivního třepání kultivovány 12-16 hodin při teplotě 37 °C. V mikrozkuvkách byla bakteriální kultura odstředěna (6000 g, 2 min, 25 °C) a byl odstraněn supernatant. Pelet byl jemně resuspendován v 100 µl roztoku SOL I (4.1.6), promíchán a buňky byly lyzovány přídatkem 200 µl roztoku SOL II (4.1.6). Po inverzním promíchání byla směs inkubována na ledu a následně byla 5 minut při pokojové teplotě. Ke zlyzovaným

buňkám bylo přidáno 150  $\mu$ l roztoku SOL III (4.1.6), který neutralizoval směs a jádro nebylo lyzováno. Po promíchání byla směs odstředěna (13 250 g, 15 min, 4 °C). Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkuřavky, k supernatantu byl přidán stejný objem izopropanolu (400  $\mu$ l), promíchán a odstředěn (13 250 g, 15 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn a pelet šetrně vysušen. DNA byla promyta v 1 ml 70 % ethanolu, vše bylo promícháno a odstředěno (13 250 RPM, 5 min, 25 °C). Etanol byl odstraněn a mikrozkuřavka byla sušena po dobu 15-20 minut při teplotě 37 °C. K vysušenému peletu bylo přidáno 40  $\mu$ l TB pufru (4.1.6), obsahující termostabilní pankreatickou RNAzu (20  $\mu$ g/ml). Po důkladném promíchání byla směs inkubována 30 minut při teplotě 70 °C.

#### **4.2.9 Příprava sekvenační reakce a sekvenace DNA**

Všechny vytvořené konstrukty byly poslány na sekvenaci do německé firmy GATC Biotech. Mix pro sekvenaci plazmidové DNA obsahoval 2  $\mu$ l požadované plazmidové DNA získané metodou alkalické lyze (4.2.84.2.8 ) 5  $\mu$ l 5  $\mu$ M příslušného primeru a 3  $\mu$ l ultračisté vody. Mix pro sekvenaci bakteriální DNA obsahoval 5  $\mu$ l PCR produktu eluovaného do 10 mM Tris a 5  $\mu$ l 5  $\mu$ M příslušného primeru (4.1.5.2).

#### **4.2.10 Uchovávání bakteriálních kmenů *B. bronchiseptica***

Bakteriální kmeny uchovávány zamražené při -80 °C v 40 % glycerolu.

#### **4.2.11 Kultivace bakteriálních kmenů *B. bronchiseptica***

Bakterie *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9) byly kultivovány na tuhém BG médiu (4.1.6) obohaceném o 15 % beraní krev a případně o příslušná antibiotika v inkubátoru s 5 % tenzí CO<sub>2</sub> a při teplotě 37 °C. Dalším způsobem byla kultivace bakterií v tekutém médiu SS (4.1.6) a možným přídatkem 2 mM Ca<sup>2+</sup>.

#### **4.2.12 Konjugace plasmidu pBBRI do *B. bronchiseptica***

Bakterie *B. bronchiseptica* (4.1.9) byly kultivovány v tekutém SS médiu (4.1.6) po dobu 12-18 hodin. Bakteriální kultura byla odstředěna (3 000 g, 3 min., 25 °C) a ve 100 µl supernatantu byl pelet resuspendován. Na tuhé BG médium (4.1.6) s 15 % beraní krví bylo přeneseno 50 µl resuspendované kultury, která byla následně smíchána s malým množstvím bakterií *E. coli* SM10 λ pir (4.1.9) obsahující natransformovaný plazmid pBBRI (4.1.8) s námi zaklonovanými fragmenty DNA. Takto smíchané bakterie byly konjugovány 4 hodiny v inkubátoru s 5 % tenzí CO<sub>2</sub> a při teplotě 37 °C. Poté byla směs rozetřena na tuhé BG médium s 15 % beraní krví, Cm 60 µg/ml a Cephx 10 µg/ml. Vyrostlé kolonie byly reizolovány na tuhém BG médiu s přídatkem Cm 30 µg/ml.

#### **4.2.13 Homologní rekombinace v *B. bronchiseptica***

Na tuhé BG médium (4.1.6) obohacené o 15 % beraní krev a 50mM MgSO<sub>4</sub> byly vysety bakterie *B. bronchiseptica* (4.1.9). Po 3 dnech byly narostlé kolonie seškrábnuty pomocí mikrobiologické kličky a přeneseny na tuhé BG médium s 15% beraní krví, 50mM MgSO<sub>4</sub>, a 10mM MgCl<sub>2</sub>, kde byly smíchány v poměru 10:1 s bakteriemi *E. coli* SM10λpir (4.1.9) obsahující natransformovaný plazmid pSS4245 (4.1.8) s námi zaklonovanými fragmenty DNA. Takto smíchané bakterie byly konjugovány 4 hodiny v inkubátoru s 5 % tenzí CO<sub>2</sub> a při teplotě 37 °C. Po konjugaci byla směs rozetřena na tuhé BG médium s 15% beraní krví, 50mM MgSO<sub>4</sub>, Amp 100 µg/ml, Km 125 µg/ml a Str 500 µg/ml, pro selekci 1. crossing-overu homologní rekombinace. Aby bylo dosaženo 2. crossing-overu homologní rekombinace, byly jednotlivé kolonie po 3 dnech reizolovány na tuhé BG médium obsahující pouze 15% beraní krev. Narostlé kolonie byly testovány pomocí PCR.

#### **4.2.14 Precipitace supernatantu bakteriální kultury pomocí kyseliny trichlorooctové kyseliny (TCA)**

Padesát ml bakteriální kultury *B. bronchiseptica* (4.1.9) kultivované do konečného OD<sub>600</sub> ≈ 3 byla odstředěno (14 000 g, 20 min., 4 °C) a supernatant byl

zfiltrován přes 0,22 µm filtr pro odstranění neodstředěných bakterií. K 38 ml supernatantu bylo následně přidáno 12 ml 50 % TCA do výsledné koncentrace 10 % a vzorek byl precipitován přes noc při 4 °C. Precipitovaný supernatant byl poté odstředěn (10 000 g, 30 min., 4 °C), TCA bylo odstraněno a k peletu precipitovaného supernatantu byl přidán 1 ml vychlazeného (-20 °C) acetonu. V acetonu resuspendovaný pelet precipitovaného supernatantu byl znovu odstředěn (10 000 g, 30 min., 4 °C), aceton byl odstraněn a pelet precipitovaného supernatantu byl vysušen po dobu 5 minut v 37 °C. K vysušenému peletu supernatantu bylo následně přidáno 500 µl roztoku 8 M močoviny a 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (A<sub>50</sub>U<sub>8</sub>) ve kterém se za kývavého pohybu rozpouštěl.

#### **4.2.15 Měření proteinové koncentrace metodou dle Bradfordové**

Metoda měření proteinové koncentrace dle Bradfordové je založená na kolorimetrickém stanovení celkového proteinu ve vzorku. Proteiny v kyselém prostředí interagují s činidlem dle Bradfordové (4.1.6), po navázání na protein se mění barva roztoku z červeno-hnědé na modrou a dochází k posunu absorpčního maxima z 465 nm na 610 nm.

Kalibrační křivka byla vytvořena z ředící řady o koncentraci (0, 10, 25, 50, 75, 100 µg/ml) BSA. Supernatant vzorku byl ředěn 20x, pelet byl naředěn 100x, pro odečtení pozadí bylo měřeno samotné činidlo spolu s ředícím roztokem. Do květy pro měření koncentrace bylo smícháno 100 µl vzorku a 900 µl činidla dle Bradfordové a poté byla měřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinů byla odvozena pomocí absorbance z připravené kalibrační křivky (absorbance:koncentrace).

#### **4.2.16 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)**

Polyakrylamidový gel (4.1.6) byl připraven o koncentraci, která zaručovala ideální rozdělení analyzovaných proteinů. Dělicí a zaostřovací směs polyakrylamidového gelu byla nalita mezi dvě skla s hřebínkem pro vytvoření jamek na vzorky. Po ztuhnutí gelu byl odstraněn hřebínek a gel byl vložen do aparatury zalité tris-glycinovým pufrům (4.1.6). Vzorky smíchané s 5x koncentrovaný Laemli pufrům (4.1.6) byly nanášeny v objemu 20 µl, značený proteinový standard byl nanášen



v objemu 5  $\mu$ l do jamek gelu. Proteiny byly elektroforeticky děleny při 30 mA po dobu 70 minut. Separované proteiny byly vizualizovány pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 ve kterém byl gel obarven.

#### 4.2.17 Western blot

Elektroforeticky rozdělené proteiny z SDS-page (4.2.16) byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu pomocí polosuchého systému. Nejprve byl filtrační papír a nitrocelulózová membrána (oboje o velikosti 9×6 cm) namočený do transferového pufru (4.1.6). Samotné skládání polosuchého systému bylo započato vložení filtračního papíru na anodovou desku, následovala vrstva nitrocelulózové membrány, na kterou se navrstvil polyakrylamidový gel. Ten byl převrstven opět filtračním papírem. Z vrstev byly vytlačeny vzduchové bubliny a systém byl uzavřen katodovou deskou. Proces přenosu proteinů na nitrocelulózovou membránu probíhal při 100 mA po dobu 1 hodiny.

Následně byla membrána opláchnuta v ultračisté vodě, TBS (4.1.6) a nakonec blokována 40 minut 3 % roztokem mléka v TBS při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byla zablokovaná membrána promyta v roztoku TBS a poté byla za intenzivního třepání inkubována v 15 ml roztoku primární protilátky (4.1.4) v TBST (4.1.6) s 3% BSA přes noc při teplotě 4 °C. Primární protilátka byla odstraněna a membrána byla za intenzivního třepání a při pokojové teplotě 2x 10 minut promyta v roztoku TBST. V 15 ml roztoku sekundární protilátky (4.1.4) byla membrána za intenzivního třepání inkubována po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Poté byla sekundární protilátka odstraněna a membrána byla za intenzivního třepání a při pokojové teplotě 2x 10 minut promyta v roztoku TBST. Zviditelnění vazby sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou bylo docíleno komerční sadou roztoků SuperSignal® West Femto, které byly smíchány v poměru 1:1 (600  $\mu$ l kombinace roztoků na 1 membránu). Touto směsí byla membrána pokryta a v přístroji G-BOX Chemi XT 16 byl pomocí kamery detekován chemiluminiscenční signál.

#### 4.2.18 Stanovení adenylát cyklázové aktivity

Metoda stanovení adenylát cyklázové aktivity byla provedena dle protokolu D. Ladanta (Ladant et al., 1986). Adenylátcyklázová aktivita byla stanovena na základě reakce, kterou enzym katalyzuje:  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} \leftrightarrow [^{32}\text{P}]\text{cAMP} + \text{PPi} + \text{H}^+$ .

Pro stanovení byl použit radioaktivní substrát  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , který byl katalyticky přeměněn na radioaktivní  $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ . Cyklické AMP bylo ze směsi separováno pomocí adsorpční chromatografie. Protože cAMP neobsahuje (na rozdíl od ATP, ADP a AMP) nabitě náboje, není na koloně adsorbováno, ale z kolony eluováno a jeho přeměněné množství bylo následně stanoveno radioaktivně.

Testované kmeny *B. bronchiseptica* (4.1.9) byly předkultivovány v tekutém SS média (4.1.6) do  $\text{OD}_{600} \approx 1$ . Následně byly kultury inokulovány do 50 ml tekutého SS média na výsledné  $\text{OD}_{600} \approx 0,15$  a kultivovány 12 - 16 hodin do požadovaného  $\text{OD}_{600}$ . Pro stanovení celkové AC aktivity kultury byla do čisté mikrozkušavky odebrána kultura 20x zředěná roztokem obsahujícím 8 M močovinu, 50 mM Tris, pH 8,0 (močovinový extrakt). Pro stanovení extracelulární AC aktivity byl odebrán 1 ml kultury do mikrozkušavky a odstředěn (14 000 g, 3 min., 25 °C). Supernatant byl zfiltrován (0,22  $\mu\text{m}$  filtr) a smíchán s roztokem obsahujícím 8 M močovinou, 50 mM Tris, pH 8,0 v poměru 1:1. Poté bylo z obou směsí odebráno 10  $\mu\text{l}$  do čisté mikrozkušavky. Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi (4.1.6), suspenze byla řádně zamíchána pomocí vortexu a umístěna do vodní lázně při teplotě 30 °C po dobu 15 minut. Reakční směs byla kvzorkům přidávána ve stejných časových intervalech 20 s. Reakce byla zastavena ve stejných 20 s časových intervalech přidáním 200  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl s následnou inkubací na suchém bloku po dobu 5 minut při teplotě 100 °C. Proběhlá kyselá hydrolyza kontaminant potlačí vznik interferencí při následné adsorpční chromatografii. Úpravou vzorků na pH 7,6 bylo docíleno přidáním 0,2 ml 1,5 M neutralizovaného imidazolu. Vzorky byly poté naneseny na kolony naplněné neutrálním  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Ke vzorkům byly přidány 3 ml 10 mM imidazolu (pH 7,6) a eluce do scintilačních lahvíček probíhala 10-15 minut. Po eluci bylo přidáno ke vzorkům 10 ml scintilačního roztoku. Pomocí scintilačního přístroje byla změřena radioaktivita  $^{32}\text{P}$  a  $^3\text{H}$  (v hodnotách DPM). Pro odečtení hodnot na pozadí bylo změřeno množství  $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  v reakční směsi bez přidaného vzorku. Hodnoty radioaktivity byly změřeny i ve vzorcích

32P a 3H o známém množství [32P]ATP a následně byly odečteny spolu s pozadím od naměřených hodnot ve vzorcích.

Pro výpočet adenylát cyklázové aktivity v přísušném vzorku byl použit vzorec:

$$A_{AC} = \frac{n \cdot (A_{PV}/A_{HV} - A_{PB}/A_{HB}) \cdot d \cdot A_{HR}}{A_{PR} \cdot V_{ME} \cdot t}$$

$A_{AC}$ .....adenylátcyklázová aktivita vzorku [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  extraktu = U/ml extraktu]

$A_{PV}$ .....radioaktivita 32P ve vzorku [DPM]

$A_{PB}$  .....radioaktivita 32P v slepém vzorku [DPM]

$A_{PR}$  .....radioaktivita 32P v 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi [DPM]

$A_{HB}$  .....radioaktivita [2,8-3H]cAMP v slepém vzorku [DPM]

$A_{HV}$  .....radioaktivita [2,8-3H]cAMP ve vzorku [DPM]

$A_{HR}$  .....radioaktivita [2,8-3H]cAMP v 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi [DPM]

$n$ .....látkové množství ATP v 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi [ $\mu\text{mol}$ ]

$d$ .....ředění močovinného extraktu

$V_{ME}$  .....objem přidaného ředěného močovinného extraktu k 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi [ml]

$t$  .....reakční čas [min]

## 4.2.19 Hmotnostní spektrometrie

### 4.2.19.1 Příprava vzorku pro hmotnostní spektrometrii

Testované kmeny *B. bronchiseptica* (4.1.9) byly předkultivovány v tekutém SS médiu (4.1.6) do  $OD_{600} \approx 1$ . Následně byly kmeny inokulovány do 50 ml tekutého

SS média na výsledné  $OD_{600} \approx 0,15$  a za intenzivního třepání kultivovány 12 – 16 hodin do konečného  $OD_{600} \approx 3$ . Následně byla kultura odstředěna (14 000 g, 5 min., 25 °C), k peletu byl přidán roztok 8 M močoviny a 50 mM  $NH_4HCO_3$  ( $A_{50}U_8$ ) ve kterém byl za vodorovného kývání pelet rozpuštěn. Suspenze s rozpuštěným peletem byla zmrazena do doby zpracování precipitovaného supernatantu. Supernatant bakteriální kultury byl zpracován, jak bylo popsáno v kapitole (4.2.14).

V resuspendovaném precipitátu supernatantu a peletu byla změřena proteinová koncentrace dle Bradfordové (4.2.15). Padesát  $\mu$ g celkového proteinu z každého vzorku bylo nanášeno na ultrafiltrační mikrokolonu (Microcon-30) a kolony byly odstředěny (14 000 g, 20 min., 25 °C). Kolona byla 2x promyta  $A_{50}U_8$  (14 000 g, 20 min., 25 °C). Následně byla kolona 2x promyta 50 mM  $NH_4HCO_3$  (14 000 g, 20 min., 25 °C). Poté byly vzorky redukovány 50  $\mu$ l 0,1 M 1,4-dithiothreitol ředěného v 50 mM  $NH_4HCO_3$  při 60 °C. Přidáním 5,5  $\mu$ l 0,5M chloracetamidu (CAA) byly vzorky alkylovány. CAA je světlo senzitivní, a proto byly vzorky uloženy do temné komory a po 30 minutách odstředěny (14 000 g, 20 min., 25 °C). Proteiny byly štěpeny přidáním 2  $\mu$ g trypsinu v 70  $\mu$ l 50 mM  $NH_4HCO_3$ , kde trypsin specificky štěpí karboxylovou skupinu lysinu nebo argininu, pokud není další aminokyselinou prolin. Štěpení probíhalo v 37 °C po dobu 16 hodin (přes noc). Po štěpení byl vzorek odstředěn (14 000 g, 20 min., 25 °C) a pro větší výtěžnost 2x eluován do 60  $\mu$ l 50 mM  $NH_4HCO_3$ . Pro odsolování vzorků bylo nejprve nutné připravit mikrokolonu C18 promytím v 50  $\mu$ l 50 % MeOH, dále ve 100  $\mu$ l 90% acetonitrilu ve vodě (ACN:H<sub>2</sub>O) s 0,1 % trifluoroctovou kyselinou (TFA) a v 100  $\mu$ l 2 % (ACN:H<sub>2</sub>O) 0,1 % TFA, po každém promytí následovalo odstředění (8 000 g, 1 min., 25 °C). Na připravenou mikrokolonu bylo nanášeno 200  $\mu$ l vzorku, který byl odstředěn (8 000 g, 1 min., 25 °C) do čisté mikrozkuřavky. Poté bylo přidáno 100  $\mu$ l 2 % (ACN:H<sub>2</sub>O) 0,1 % TFA a odstředěno (8 000 g, 1 min., 25 °C) a následně 80  $\mu$ l 80 % (ACN:H<sub>2</sub>O) 0,1 % TFA a odstředěno (8 000 g, 1 min., 25 °C). Pro hmotnostní analýzu byla peptidová směs vysušena pomocí vakuové odparní centrifugy, resuspendována ve 2 % (ACN:H<sub>2</sub>O) 0,1 % TFA na koncentraci 1  $\mu$ g/ $\mu$ l a 3  $\mu$ l výsledného vzorku byly použity pro hmotnostní analýzu.

#### 4.2.19.2 *Hmotnostní spektrometrie a vyhodnocení dat*

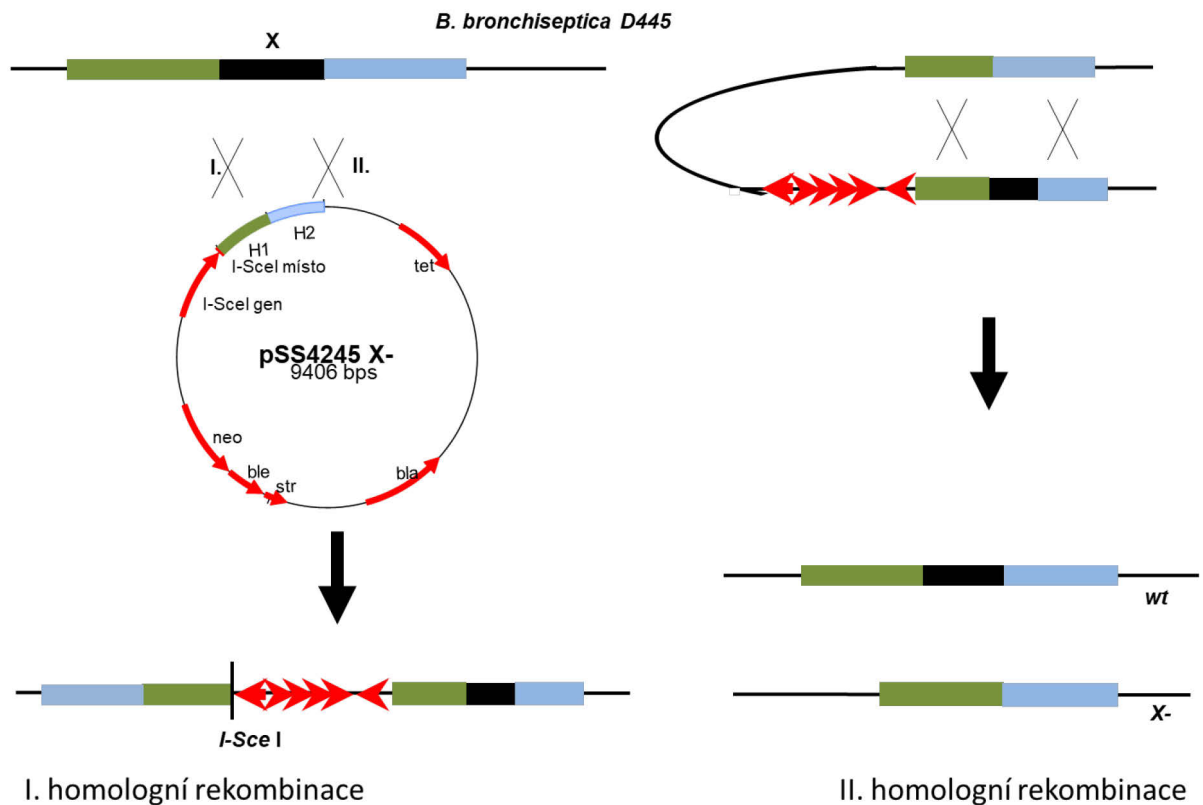
Hmotnostní spektrometrie byla provedena formou služby v laboratoři OMICS Proteomika. Aparatura pro kapalinovou chromatografii propojenou s hmotnostním spektrometrem (LC-MS) se skládala ze separační kolony (EASY-Spray column, 50 cm x 75 µm ID), odsolovací kolony (Acclaim PepMap300, 300 µm x 5 mm, C18) a hmotnostního spektrometru. Peptidy byly do iontového zdroje eluovány postupně zvyšujícím se gradientem ACN v H<sub>2</sub>O a 0,1 % kyselině mravenčí od 4 do 35 % během 1 hodiny při rychlosti 15 µl/min. Peptidové prekurzory byly skenovány v rozmezí 350-1400 m/z (hmotnost/náboj) s rozlišením 120k při 200 m/z. Primární ionty s nábojem 2-6<sup>+</sup> byly během analýzy fragmentovány ve 2 s cyklech s maximální výtěžností 10<sup>4</sup> iontů/cyklus. Identické prekurzory, s přesností na 10 ppm (z angl. parts per million), byly vyloučeny pro opakovanou fragmentace po dobu 45 s. Data vygenerovaná během LC-MS/MS byla zpracována kombinací softwarů MaxQuant a Perseus (4.1.10). Enzymová specifita byla nastavena na štěpení za C-koncem lysinu nebo arginin s maximem 2 specificky nenaštěpených vazeb. Jako fixní modifikace byla nastavena dithiometylace cysteinu a jako variabilní modifikace byla nastavena N-koncová acetylace proteinu a oxidace metioninu. Pro analýzu byly použity biologické duplikáty vzorků. Relativní intenzita jednotlivých proteinů byla kvantifikována na základě počtu získaných spekter jednotlivých peptidů náležících k danému proteinu. Pro detailní analýzu byly vybrány jen proteiny s hladinou spolehlivosti <0,01, u kterých byly detekovány alespoň 2 unikátní peptidy. Jako signifikantní změna množství detekovaného proteinu mezi vzorky byla považována míra změny log<sub>2</sub> exprese proteinů >2 nebo <0.5. Logaritmičké vyjádření míry změny exprese lze vypočítat ze vzorce:  $\log_2 FC = \log_2(B) - \log_2(A)$ , kde FC představuje změnu exprese proteinů. Pro snazší manipulaci s čísly je změna exprese proteinů vyjádřena logaritmičticky:  $FC = 2^{\log_2 FC}$  (Quackenbush, 2002).

## 5 Výsledky

### 5.1 Konstrukce kmenů s delecí v genech *bopN*, *bscN* a *bteA*

Pro stanovení vlivu proteinu BopN na sekreci skrze T3SS byly nejprve zkonstruovány kmeny *B. bronchiseptica* D445 s deletovaným genem *bopN*. Dále byl připraven kmen s delecí genu *bscN*, který kóduje protein BscN sloužící jako ATPáza T3SS. Po delecí tohoto genu nedochází kvýstavbě sekrečního systému a následné sekreci. Pro pozdější stanovení translokace proteinu BopN do cytozolu eukaryotických buněk byl vytvořen kmen s delecí v genu *bteA*. Jak bylo popsáno v kapitole přehledu literatury (3.4.3.3), protein BteA cytotoxicky působí na eukaryotické buňky a způsobuje jejich smrt. Delece byla provedena homologní rekombinací pomocí amplifikovaných úseků v oblastech před a za cíleným genem (obr. č. 12). Byl zachován první a poslední kodon deletovaného genu a delece nezpůsobila změnu čtecího rámce. Protože kmeny rodu *Bordetellae* jsou špatně transformovatelné, byl plazmid přenesen bakteriální konjugací. Bakteriální konjugace (4.2.13) transformovaných buněk *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.9) obsahujících plazmid pSS4245 (4.1.8) s kmenem *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9) probíhala na tuhém BG médiu (4.1.7) s přídavkem 15 % beraní krve. Médium bylo dále obohaceno o MgSO<sub>4</sub>, který je zodpovědný za inaktivaci BvgAS systému a o MgCl<sub>2</sub>, který pomáhá stabilizaci kontaktu obou bakterií v průběhu konjugace. Pro homologní rekombinaci byl použit plazmid pSS4245, který nese geny kódující rezistenci k antibiotikům streptomycin, ampicilin, neomycin a kanamycin. Promotor, ze kterého se přepisují geny pro rezistenci na neomycin, kanamycin a streptomycin není tak silný a streptomycin, jakožto třetí v pořadí není exprimován dostatečně v *E. coli*. Pro bakterie *E. coli* je tedy toto antibiotikum letální a na tuhém médiu vyrostou pouze kolonie druhu *Bordetellae*, které přepisují všechny tři po sobě jdoucí antibiotika. Zároveň v sobě tento plazmid nese sekvenci kódující *I-SceI* endonukleázu, jejíž transkripce závisí na přítomnosti MgSO<sub>4</sub> a její cílové restriční místo. Po konjugaci byly bakterie rozetřeny na tuhé BG médium (15 % beraní krev, MgSO<sub>4</sub>, ampicilin, kanamycin, streptomycin), došlo k selekci prvního crossing-overu homologní rekombinace, a tím k vložení plazmidu pSS4245. Plazmid pSS4245 se není schopen samovolně replikovat v bakteriích *Bordetellae*, a proto musí být vložen do bakteriálního chromozomu k poskytnutí antibiotické rezistence. Vyrostlé kolonie byly reisolovány na tuhé

BG médium pouze s 15 % beraní krví, přičemž nepřítomnost  $MgSO_4$  způsobila aktivaci BvgAS systému a taktěž expresi endonukleázy *I-SceI*, které štěpila DNA. Dvouřetězcový zlom v chromozomu by byl pro bakterii letální, a proto došlo v chromozomu bakterie zcela přirozeně k opravě zlomu rekombinací mezi homologními sekvencemi, druhým crossing-overem. Výsledkem takovéto opravy byly kmeny divokého typu nebo kmeny *B. bronchiseptica* s požadovanou delecí genu.

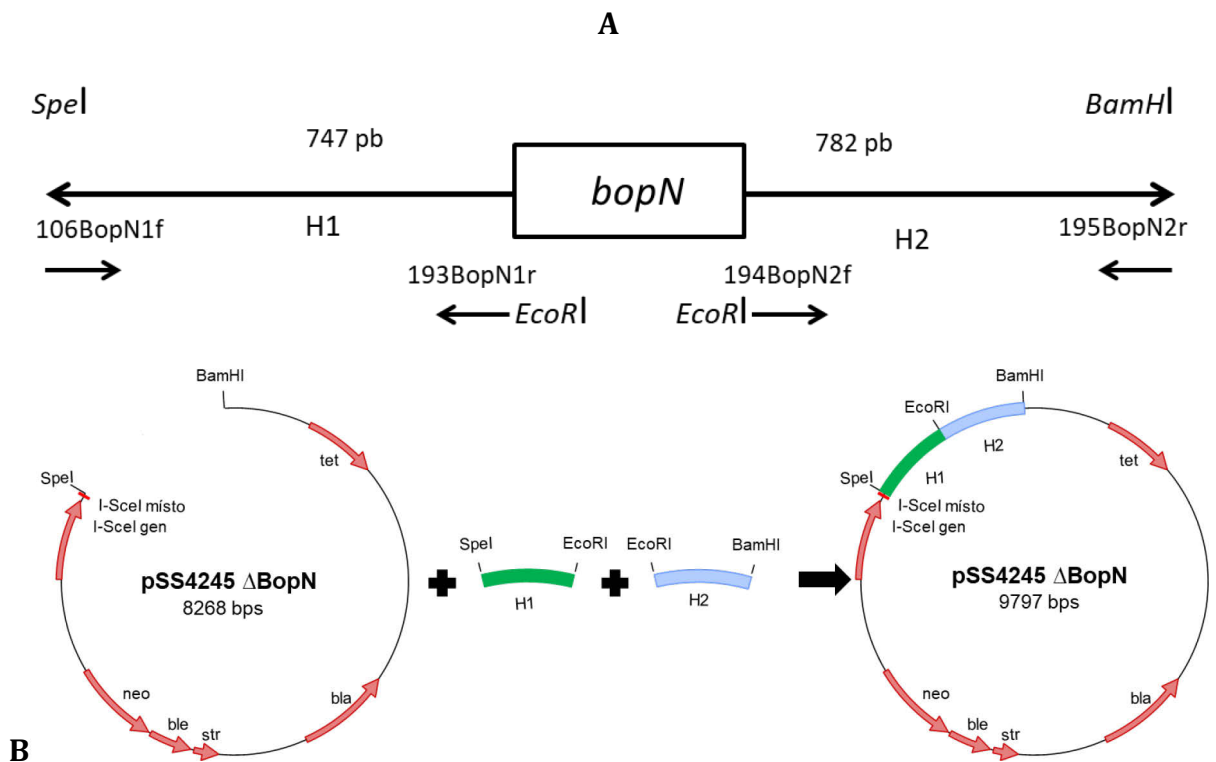


**Obrázek č. 12: Schématické znázornění homologní rekombinace.** Znázornění prvního (vlevo) a druhého (vpravo) crossing overu homologní rekombinace a její možné výsledky.

### 5.1.1 Příprava kmene s delecí genu *bopN*

Kmen s delecí genu *bopN* byl vytvořen stejným způsobem jako bylo popsáno Namagatsu (Nagamatsu *et al.*, 2009), tedy bylo zachováno prvních 9 a posledních 8 aminokyselin proteinu BopN a nedošlo při tom k pozměnění čtecího rámce. Nejprve byly naamplifikovány oblasti před a za genem *bopN* označené jako H1 (3937497..3938237) a H2 (3939282..3940053). Tyto oblasti byly metodou PCR (4.2.1) amplifikovány pomocí primerů 106BopN1f, 193BopN1r, 194BopN2f a 195BopN2r (4.1.5.1), přičemž reverzní primer oblasti H1 a forward primer oblasti

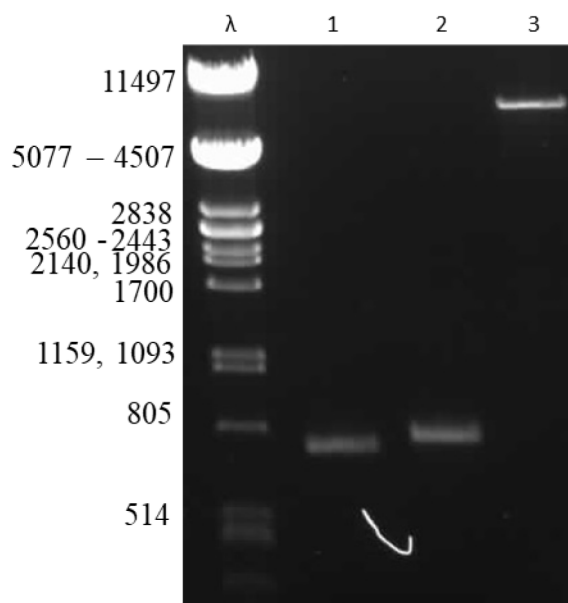
H2 v sobě nesl sekvenci kódující místo pro štěpení restriční endonukleázou *EcoRI* (4.1.3) (obrázek č. 13).



**Obrázek č. 13: Schéma konstrukce plazmidu pSS4245 Δ*bopN* pro přípravu kmene *B. bronchiseptica* D445 s delecí genu *bopN*.** A: Schéma přípravy homologní oblasti H1 (747 bp) amplifikované primery 106BopN1f a 193BopN1r a homologní oblasti H2 (782 bp) amplifikované primery 194BopN2f a 195BopN2r z chromosomu *B. bronchiseptica* D445. Šípky znázorňují orientaci a místo nasedání primerů. B: Schéma ligace fragmentů během konstrukce plazmidu pSS4245 Δ*bopN*.

Amplifikované fragmenty byly izolovány pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) a kolonek komerční sady Geneaid (4.2.3), štěpeny restričními endonukleázami *SpeI*, *EcoRI* a *BamHI* (4.1.3) a následně znovu přečištěny pomocí kolonek Geneaid. Plazmid pSS4245 (4.1.8) byl linearizován restričními endonukleázami *SpeI* a *BamHI* (4.1.3), rovněž přečištěn pomocí horizontální elektroforézy a kolonek komerční sady Geneaid. Získané fragmenty a linearizovaný vektor byly dále analyzovány na agarózovém gelu (obr č. 14).

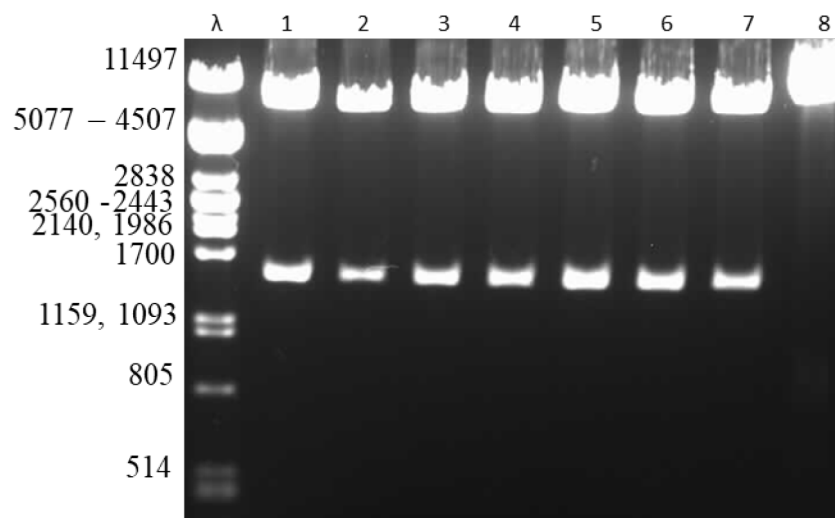




**Obrázek č. 14: Analýza izolovaných PCR fragmentů homologních oblastí H1 a H2 a linearizovaného plazmidu pSS4245.** Ověření bylo provedeno na 1% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1 – oblast H1 o velikosti 747 pb, 2 – oblast H2 o velikosti 782 pb, 3-linearizovaný plazmid pSS4245 o velikosti 8 268 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restrikční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

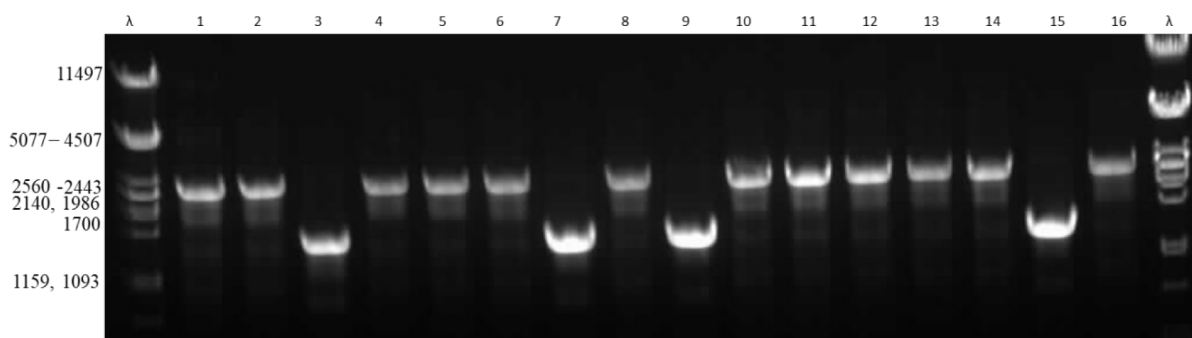
Homologní oblasti byly pomocí kohezních konců zaligovány (4.2.5) do linearizovaného plazmidu, který byl následně transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). Natransformované buňky byly vysety na tuhé LB médium (4.1.7) obsahující ampicilin, jehož gen pro rezistenci nese plazmid pSS4245 (4.1.8). Vyrostlé kolonie byly kultivovány ve 2 ml tekutého LB média s ampicilinem po dobu 16 hodin (4.1.7). Z kultur byla poté izolována plazmidová DNA metodou alkalické lyze (4.2.8) a správnost konstruktů byla ověřena štěpením pomocí restrikčních endonukleáz *Not*I a *Bam*HI (4.1.3) a vizualizovaná na agarózovém gelu (4.2.2) (obr. č. 15).

Klon číslo 1 byl spolu se sekvenačními primery pSS4245for a pSS4245rev (4.1.5.1) odeslán na sekvenaci do německé firmy GATC Biotech.



**Obrázek č. 15: Restrikční ověření minipreparované plazmidové DNA pSS4245  $\Delta$ bopN.** Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restrikčními endonukleázami *SpeI* a *BamHI* a poté analyzováno na 1% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restrikčním štěpení byla 1 529/8 268 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restrikční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Vytvořený konstrukt číslo 1 byl transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.9) a byla provedena konjugace s kmenem *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9). Bakterie byly rozetřeny na tuhé BG médium s  $MgSO_4$  a antibiotiky pro selekci prvního crossing-overu homologní rekombinace. Následně byly vyrostlé kolonie reisolovány na tuhé BG médium (4.1.7) s 15 % beraní krví bez  $MgSO_4$  a antibiotik. Šestnáct kolonií bylo resuspendováno ve 100  $\mu$ l ultračisté vody a následně byly povařeny na 95 °C po dobu 5 minut. Ověření, o jaký kmen se jedná, bylo provedeno pomocí PCR (4.2.1) s následnou vizualizací pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) (obr. č. 16).

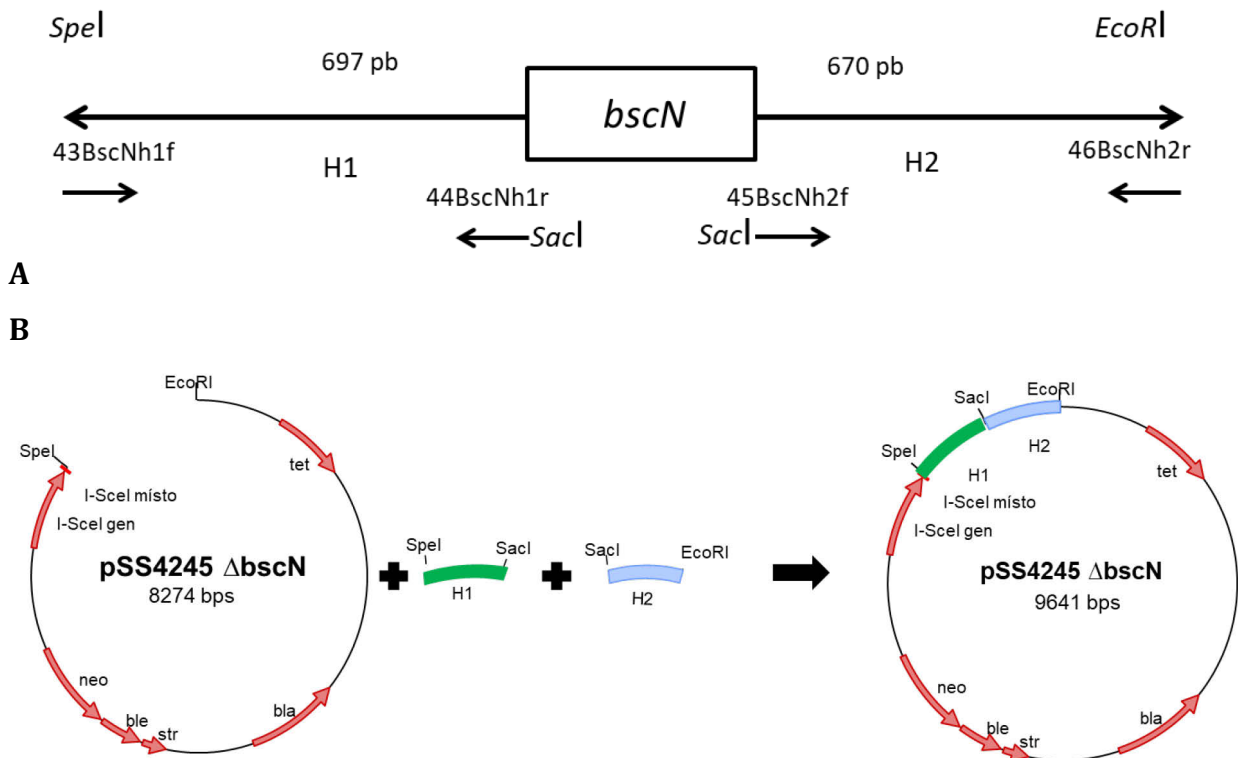


**Obrázek č. 16: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 106BopN1f a 195BopN2r, a PCR reakce byla nanesena na 0,8% agarózový gel. Očekávaná velikost PCR produktu u divokého kmene byla 2 566 pb, zatímco velikost PCR produktu po delecí genu *bopN* byla 1 529 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restrikční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Pro další experimenty byl vybrán klon číslo 3.

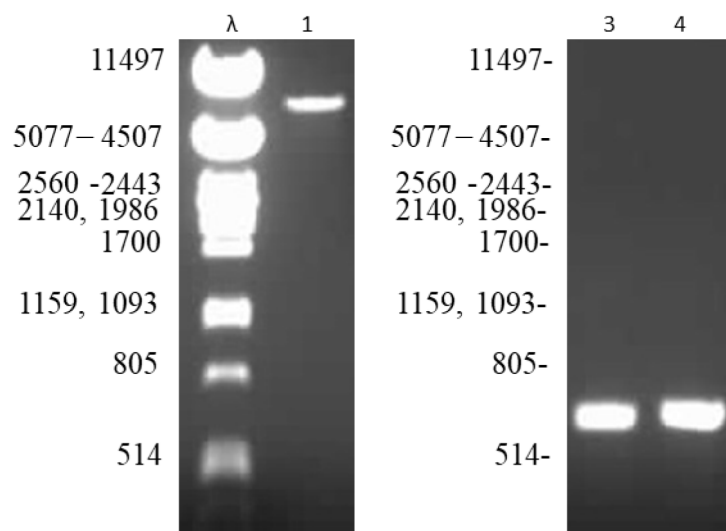
### 5.1.2 Příprava kmene s delecí genu *bscN*

Delece genu *bscN* v kmeni *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9) bylo dosaženo za použití amplifikace oblastí H1 (3928879..3929536) a H2 (3930866..3931546) nacházejících se před a za genem *bscN*. Amplifikace byla provedena pomocí primerů 43BscNh1f, 44BscNh1r, 45BscNh2f a 46BscNh2r (4.1.5.1) metodou PCR (4.2.1) (obr. č. 17).



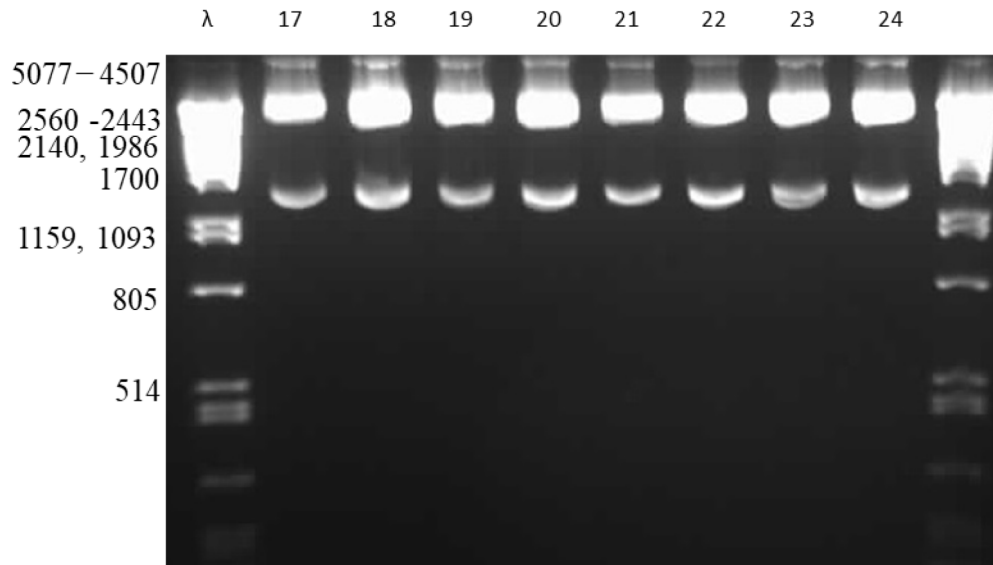
**Obrázek č. 17: Schéma konstrukce plazmidu pSS4245  $\Delta bscN$  pro přípravu kmene *B. bronchiseptica* D445 s delecí genu *bscN*.** A: Schéma přípravy homologní oblasti H1 (697 bp) amplifikované primery 106BopN1f a 193BopN1r a homologní oblasti H2 (670 bp) amplifikované primery 45BscNh2f a 46BscNh2r z chromosomu *B. bronchiseptica* D445. Šipky znázorňují orientaci a místo nasedání primerů. B: Schéma ligace fragmentů během konstrukce plazmidu pSS4245  $\Delta bopN$ .

Jak demonstruje obrázek č. 18, PCR produkt a plazmid pSS4245 (4.1.8) byly po izolaci (4.2.3) štěpeny restrikními endonukleázami *SpeI*, *EcoRI* a *SacI* (4.1.3) a po reizolaci vizualizovány na agarózovém gelu pomocí horizontální elektorforézy (4.2.2).



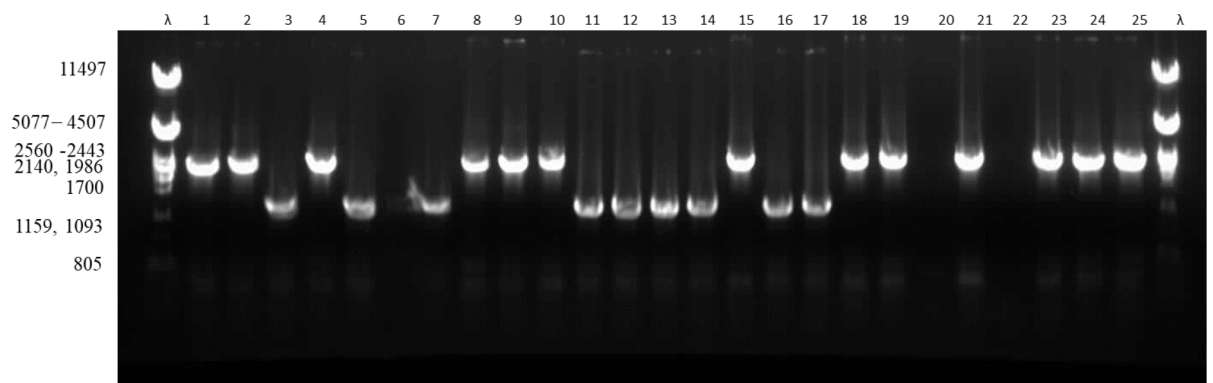
**Obrázek č. 18: Analýza izolovaných PCR fragmentů homologních oblastí H1 a H2 a linearizovaného plazmidu pSS4245.** Ověření bylo provedeno na 1% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1 – linearizovaný plazmid pSS4245 o velikosti 8 274 pb, 3 – oblast H2 o velikosti 670 pb, 4 – oblast H1 o velikosti 697 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Linearizovaný plazmid byl spolu s fragmenty H1 a H2 ligován T4 ligázou (4.2.5) a následně transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). Z vyrostlých kolonií byla metodou alkalické lyze (4.2.8) izolována plazmidová DNA, správnost konstruktů byla ověřena štěpením pomocí restričních endonukleáz (4.1.3) *Spe*I a *Eco*RI-HF a fragmenty byly rozděleny pomocí horizontální elektroforézy na agarózovém gelu (4.2.2) (obr. č. 19). Z analyzovaných mutovaných kmenů byly vybrány konstrukt číslo 19, který byl spolu se sekvenačními primery pSS4245for a pSS4245rev (4.1.5.2) odeslán na sekvenaci (4.2.9) do německé firmy GATC Biotech.



**Obrázek č. 19: Restriční ověření minipreparované plazmidové DNA pSS4245  $\Delta$ bopN.** Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *SpeI* a *EcoRI*-HF a poté analyzováno na 1% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení je 1 367/8 274 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Vytvořený konstrukt byl transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.9) a konjugován (4.2.13) s kmenem *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9). Správnost homologní rekombinace byla ověřena metodou PCR (4.2.1) s následnou vizualizací pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) (obr. č. 20).



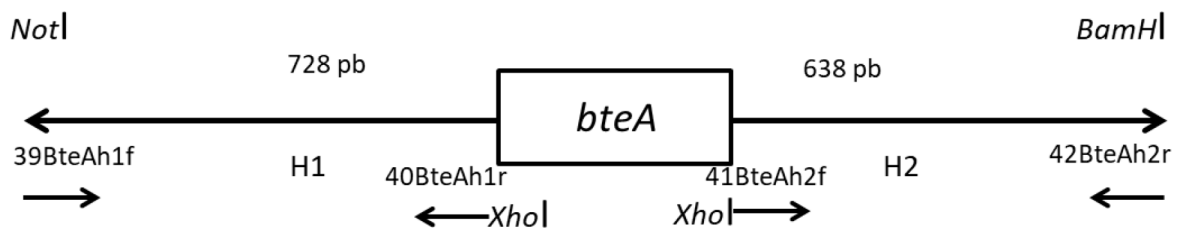
**Obrázek č. 20: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 43BscNh1f a 46BscNh2r, a PCR reakce byla nanášena na 0,8% agarózový gel. Očekávaná velikost PCR produktu u divokého kmene byla 2 700 pb, zatímco velikost PCR produktu po delecii genu *bopN* byla 1 367 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z testovaných kmenů byl vybrán kmen číslo 27.

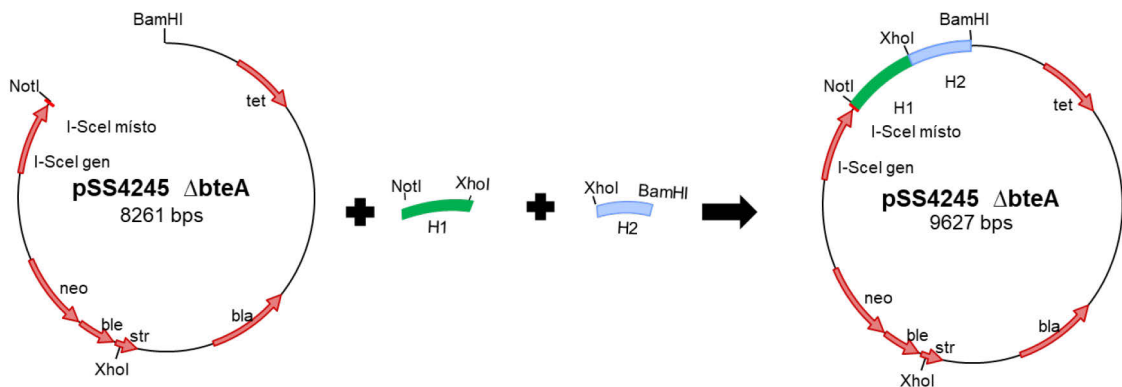
### 5.1.3 Příprava kmene s delecí genu *bteA*

Delece bylo dosaženo stejně jako v předchozích dvou případech za pomoci amplifikace pomocí primerů 41BteAh2f, 42BteAh2r, 41BteAh2f a 42BteAh2r (4.1.5.1) v oblastech před (H1) a za (H2) genem *bteA* metodou PCR (4.2.1) jak je naznačeno na obrázku číslo 21. PCR produkt byl dle molekulové velikosti rozdělen na agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2), homologní oblasti H1 (3179951..3180663) a H2 (3182632..3183253) byly z agarozového gelu vyříznuty a izolovány pomocí komerční sady Geneaid (4.2.3). Následně byly štěpeny restriktivními endonukleázami *NotI*, *XhoI* a *BamHI* (4.1.3). Zároveň byl izolován i linearizovaný plazmid pSS4245 (4.1.8), který byl před izolací naštěpený pomocí restriktivních endonukleáz *NotI* a *BamHI* (4.1.3) (obr. č. 22).

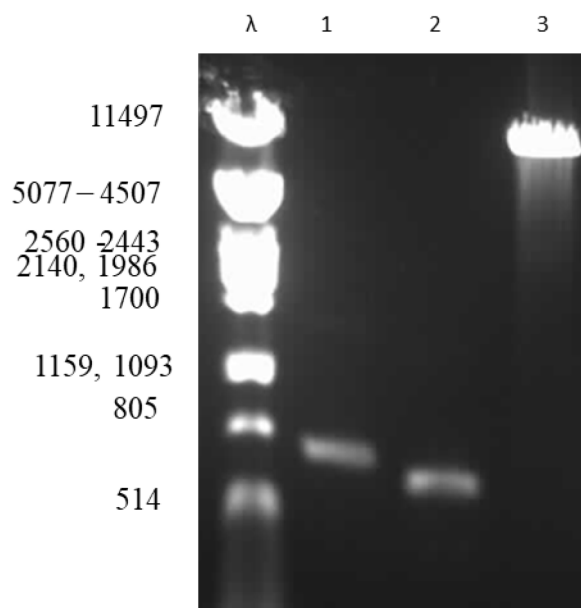
**A**



**B**

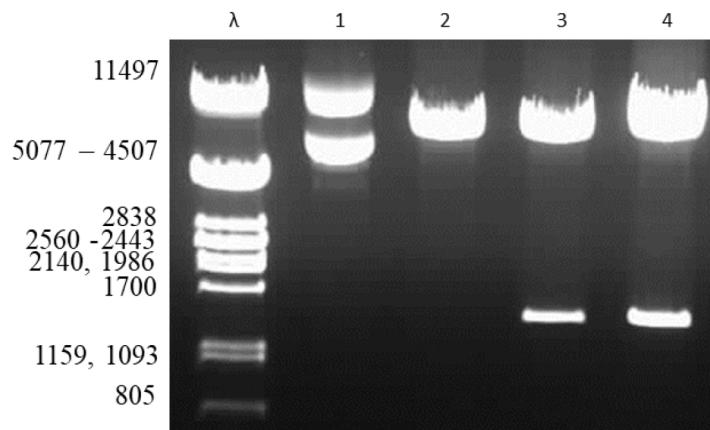
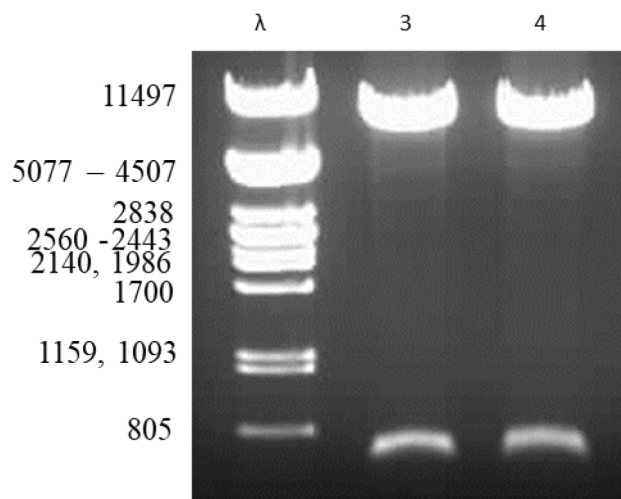


**Obrázek č. 21: Schéma konstrukce plazmidu pSS4245  $\Delta$ bteA pro přípravu kmene *B. bronchiseptica* D445 s delecí v genu *bteA*. **A:** Schéma přípravy homologní oblasti H1 (638 bp) amplifikované primery 41BteAh2f a 42BteAh2r a homologní oblasti H2 (638 bp) amplifikované primery 41BteAh2f a 42BteAh2r z chromosomu *B. bronchiseptica* D445. Šipky znázorňují orientaci a místo nasedání primerů. **B:** Schéma ligace fragmentů během konstrukce plazmidu pSS4245  $\Delta$ bteA.**



**Obrázek č. 22: Analýza izolovaných PCR fragmentů homologních oblastí H1 a H2 a linearizovaného plazmidu pSS4245.** Ověření bylo provedeno na 1% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1 – oblast H1 o velikosti 728 pb, 2 – oblast H2 o velikosti 638 pb, 3 - linearizovaný plazmid pSS4245 o velikosti 8261 pb První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

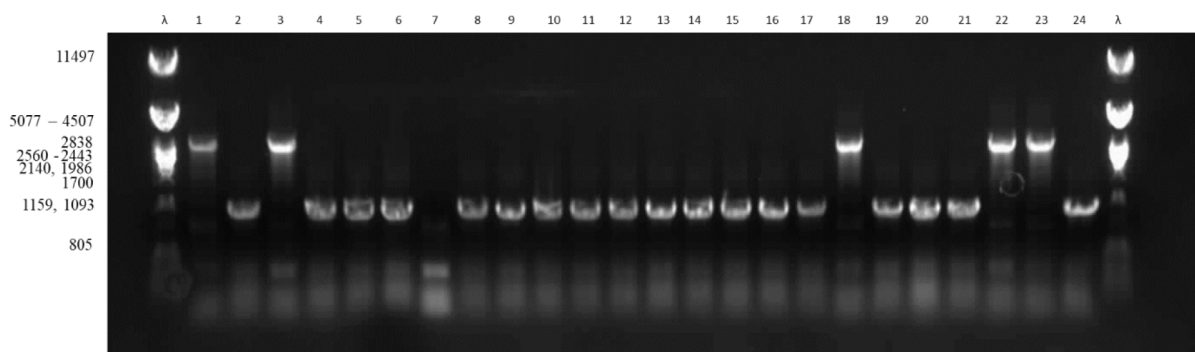
Homologní oblasti byly pomocí kohezních konců zaligovány T4 ligázou (4.2.5) do linearizovaného plazmidu pSS4245 (4.1.8) Dále byla ligační směs transformována do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9) metodou teplotního šoku (4.2.7). Z vyrostlých kolonií byla metodou alkalické lyze (4.2.8) izolována plazmidová DNA a správnost konstruktů byla ověřena sekvenčním štěpením restričními endonukleázami *Not*I a *Bam*HI (4.1.3) (obr. č. 23A). Z analyzovaných mutovaných kmenů byly vybrány konstrukty 3 a 4 a jejich správnost byla znovu ověřena sekvenčním štěpením restričními endonukleázami *Mfe*I a *Eco*RV-HF (4.1.3), které se nacházejí přímo v oblasti H1 a H2 (obr. č. 23 B).

**A****B**

**Obrázek č. 23: Restriční ověření minipreparované plazmidové DNA pSS4245  $\Delta bteA$ .** (A) Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *NotI* a *BamHI* a poté analyzováno na 0,6% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení byla 1 366/8 261 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *PstI*. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb). (B) Sekvenční štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *MfeI* a *EcoRV-HF* a poté analyzováno na 1% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení byla 705/8 916 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst I*. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Vytvořený konstrukt byl transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.9) a konjugován (4.2.13) s kmenem *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9). Správnost homologní rekombinace (4.2.13) jednotlivých kolonií byla ověřena metodou PCR (4.2.1) s následnou vizualizací pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) (obr. č. 24).





**Obrázek č. 24: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 39BteAh1f a 42BteAh2r, a PCR reakce byla nanášena na 0,8% agarózový gel. Očekávaná velikost PCR produktu u divokého kmene byla 3 100pb, zatímco velikost PCR produktu po delecí genu *bteA* byla 1 366 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z testovaných kmenů byl vybrán kmen číslo 8, který byl spolu se sekvenčními primery pSS4245for a pSS4245rev (4.1.5.2) odeslán na sekvenaci (4.2.9) do německé firmy GATC Biotech.

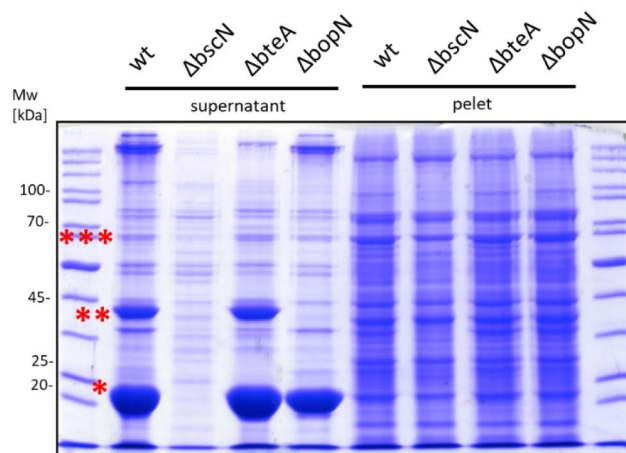
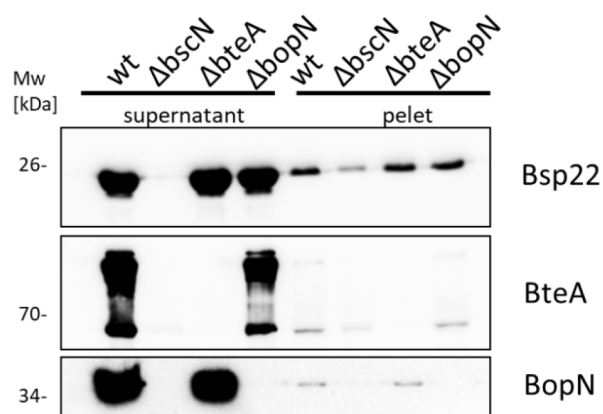
#### 5.1.4 Sekvence vytvořených kmenů

Zkonstruované mutantní kmeny s delecí genu *bteA*, *bscN* a *bopN* byly dále ověřeny pomocí sekvenace (4.2.9). Pro sekvenaci byly použity vnější primery popsané v kapitole 4. Vybrané mutantní kmeny byly ověřeny sekvenací požadovaného úseku DNA, které předcházela amplifikace požadovaného fragmentu pomocí sekvenčních primerů, u kmenu  $\Delta bopN$  byly použity primery 106BopN1f a 195BopN2r (4.1.5.2), u 4.1.5.2 kmenu  $\Delta bscN$  použity primery 94vBscNf a 95vBscNr (4.1.5.2), u kmenu  $\Delta bteA$  použity primery 85vBteAf a 96vBteAr (4.1.5.2) a izolace fragmentů z gelu pomocí komerční sady Geneaid (4.2.3). Sekvence byla provedena u německé firmy GATC Biotech.

#### 5.1.5 Ověření vytvořených kmenů metodami SDS-PAGE a Western Blot

Pro ověření mutantních kmenů byla analyzována přítomnost deletovaných proteinů v peletu a precipitovaném supernatantu. Kmen *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9) divokého typu a zkonstruované kmeny *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$ ;  $\Delta bscN$  a  $\Delta bopN$

byly kultivovány po dobu 16 h v 50 ml SS média (4.1.7). Kultura byla následně odstředěna a její pelet byl resuspendován v  $A_{50}U_8$  a zahříván při 60 °C do úplného rozpuštění. Supernatant byl před nanesením na SDS-PAGE precipitován pomocí TCA a rovněž rozpuštěn v  $A_{50}U_8$ . Po přidání 5x koncentrovaného Laemli pufru (4.1.6) ke vzorkům peletu i supernatantu byla směs promíchána a inkubována při teplotě 60 °C po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly dále naneseny na polyakrylamidové gely SDS-PAGE (4.2.16), kde byly proteiny separovány. Desetiprocentní gel byl použit na obarvení pomocí Coomassie Blue R-250 (obr. č. 25A). Na další 10% gely byly dále nanášeny vzorky sloužící k analýze přítomnosti proteinů BteA a BopN metodou Western Blot (4.2.17). Na 12% gel byly nanášeny vzorky pro analýzu přítomnosti proteinu Bsp22 rovněž metodou Western Blot (obr. č. 25B).

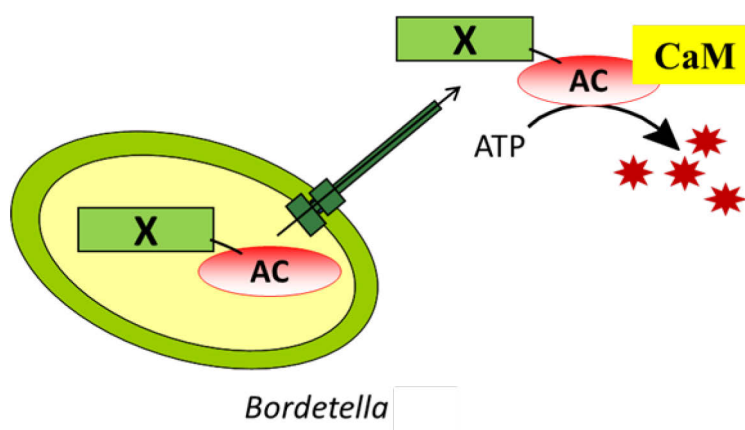
**A****B**

**Obrázek č. 25: Ověření vytvořených kmenů bordetel pomocí metod SDS-PAGE a Western Blot.** Detekce přítomnosti deletovaných proteinů v supernatantu a v peletu u kultur *B. bronchiseptica* D445 divokého typu;  $\Delta bopN$ ;  $\Delta bteA$  a  $\Delta bscN$  v supernatantu a v peletu. (A) Analýza byla provedena pomocí 10% SDS-PAGE a následného obarvení Coomassie Blue R-250. Jedna hvězdička označuje protein Bsp22, dvě hvězdičky označují protein BopN a tři hvězdičky zobrazují polohu proteinu BteA. První dráha obsahuje proteinový marker. Velikost proteinů je uvedena v kiloDaltech (kDa). (B) Analýza byla provedena za použití sér z myši imunizovaných rekombinantními proteiny Bsp22, BteA a BopN a sekundární anti-myší protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Relativní molekulová hmotnost je udávána v kDa.

Poloha proteinů BopN, BteA a Bsp22 na SDS-PAGE byla odhadnuta dle jejich molekulové hmotnosti a jejich přítomnost byla potvrzena pomocí Western Blotu. Jak vyplývá z obrázku, u mutantního kmene *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9)  $\Delta bteA$  nebyl detekován protein BteA, u mutantního kmene *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bopN$  nebyl detekován protein BopN a mutantní kmen *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bscN$  nevykazoval žádné známky sekrece substrátových proteinů. Zkonstruované kmeny jsou tedy správné.

## 5.2 Navržení a konstrukce reportérových kmenů

Jako reportérový systém pro dopravu substrátových proteinů skrze T3SS je možné použít systém, který popsal Sory a Cornelis (Sory a Cornelis, 1994). Ten je založen na kalmodulinem aktivované adenylát cyklázové doméně adenylát cyklázového toxinu, přičemž enzym adenylát cykláza způsobí katalytickou přeměnu ATP na cyklické AMP. Přeměny je dosaženo aktivací adenylát cyklázy kalmodulinem, který je ale produkován poze eukaryotickými buňkami, nikoliv bakteriemi. Pokud je substrátový protein fúzován s adenylát cyklázovou (AC) doménou, nedochází k tvorbě cyklického AMP v bakterii, ale až po jeho dopravě do cytozolu eukaryotické buňky. Množství přeměněného cAMP tedy reflektuje množství substrátového proteinu, který byl dopraven do cytozolu eukaryotické buňky (obr. č. 26).



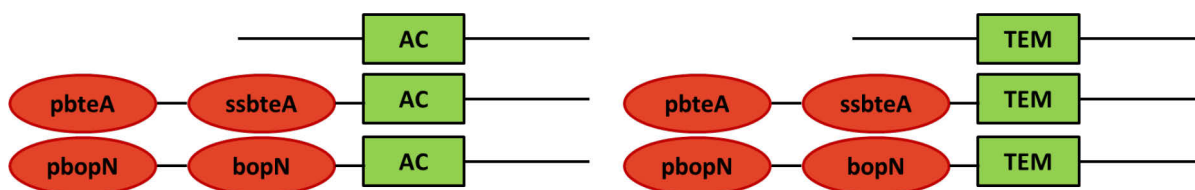
**Obrázek č. 26: Schématické zobrazení funkce reportérového systému založeného na kalmodulinu závislé adenylát cyklázové doméně.** Enzym adenylát cykláza způsobí katalytickou přeměnu ATP na cyklické AMP. Přeměny je dosaženo aktivací adenylát cyklázy kalmodulinem, který je ale produkován eukaryotickými buňkami, nikoliv bakteriemi. Substrátový protein fúzovaný s AC doménou zapříčiní tvorbu cyklického AMP až po jeho dopravě do cytozolu eukaryotické buňky. Množství přeměněného cAMP tedy reflektuje množství substrátového proteinu translokovaného do cytozolu.

Dalším z možných reportérových systémů je systém založený na enzymu  $\beta$ -laktamáza. Substrátové proteiny fúzované s TEM-1  $\beta$ -laktamázou jsou translokovány do cytoplazmy eukaryotické buňky, a následně je přidán fluorescenční substrát CCF2/4-AM. Enzym  $\beta$ -laktamáza je schopen štěpit FRETový fluorescenční substrát, který obsahuje 2 fluorofory: kumarin a fluorescein produkující rozdílná emisní spektra. V nepřítomnosti  $\beta$ -laktamázy slouží emise kumarinu (447 nm) jako excitace

fluoresceinu, který poté emituje zelený signál při 530 nm. Pokud však dochází ke štěpení, FRETový fluorescenční substrát je rozdělen na dva, takže excitovaný kumarin při 409 nm poté produkuje modrý fluorescenční signál při 447 nm. Tento modrý signál lze snadno pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu.

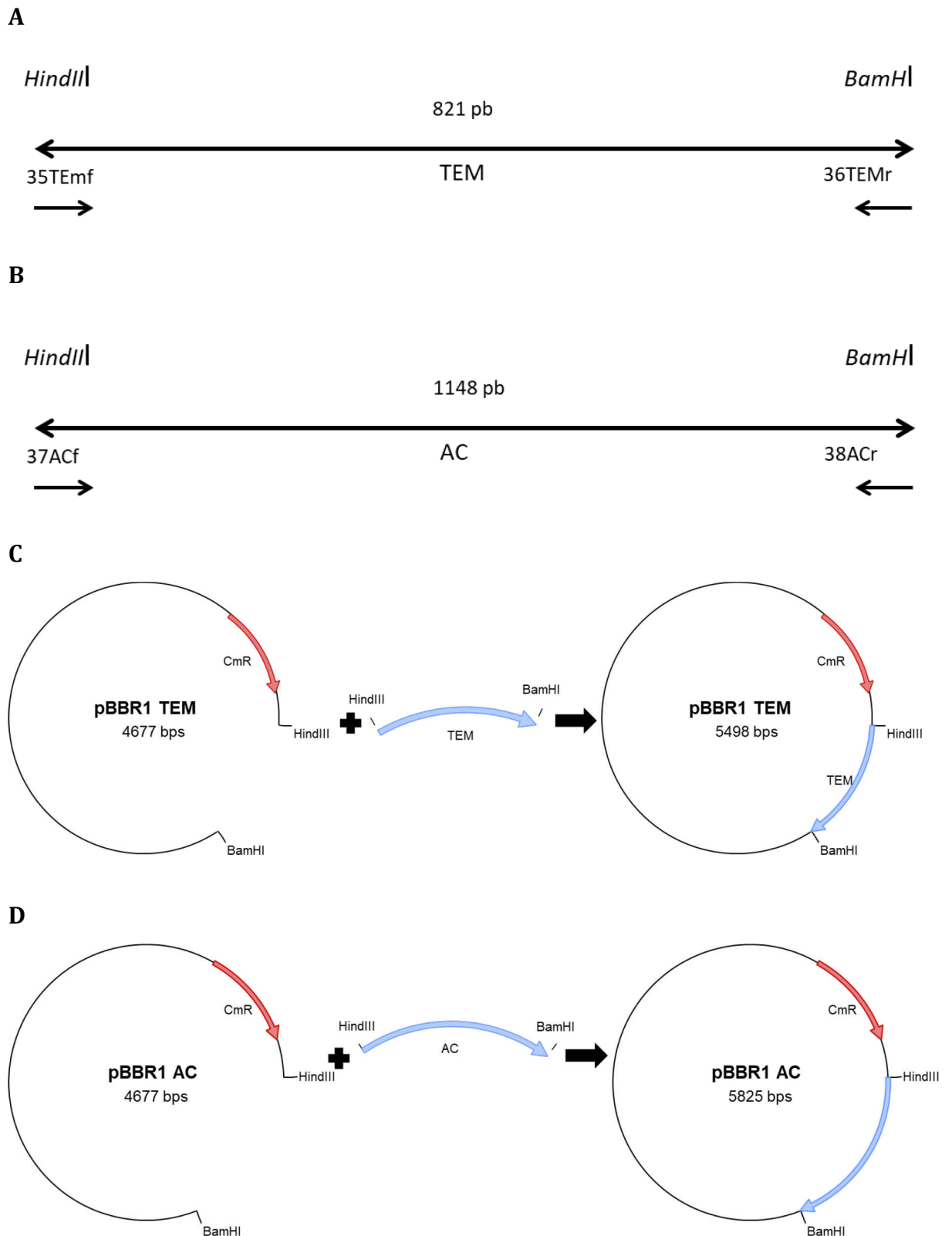
### 5.2.1 Konstrukce plazmidů pBBRI obsahující reportérové geny

Pro účely projektu navazujícího na tuto diplomovou práci byly konstruovány oba dva výše zmíněné typy reportérových systémů, ačkoli je v této práci využíván pouze systém založený na adenylát cyklázové doméně. Během konstrukce byly nejprve do pBBRI plazmidu (4.1.8) zaklonovány geny kódující adenylát cyklázovou doménu (AC) a  $\beta$ -laktamázový enzym (TEM), a tyto plazmidy byly následně použity pro konstrukci fúze s proteiny BopN a ssBteA (obr. č. 27). Během konstrukce reportéru fúzovaného s proteinem BteA bylo použito pouze prvních 130 N-koncových AA kódující sekreční signál (ssBteA) neboť intaktní BteA protein způsobuje buněčnou smrt.



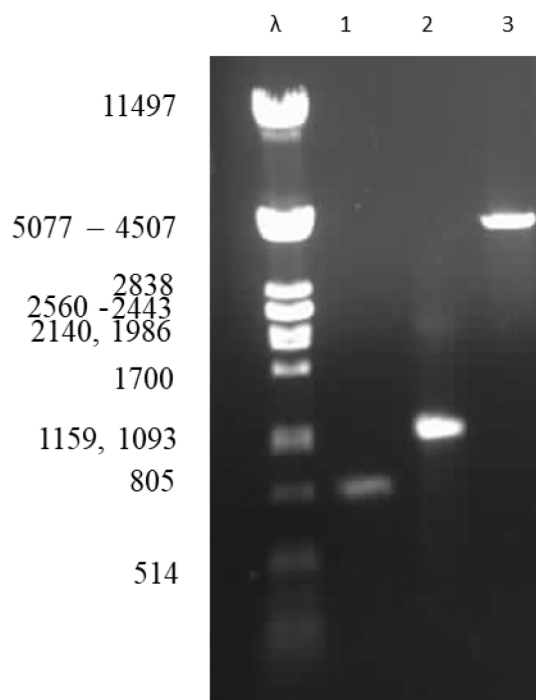
**Obrázek č. 27: Schéma konstrukce dvou typů reportérových systémů.** AC označuje adenylát cyklázovou doménu, TEM označuje  $\beta$ -laktamázový enzym, *pbteA* označuje promotor genu *bteA*, *ssbteA* je označeno prvních 130 aminokyselin genu *bteA*, *pbopN* označuje promotor genu *bopN*.

Oblast genu kódující adenylát cyklázovou doménu (AC) a  $\beta$ -laktamázový enzym (TEM) byla amplifikována použitím reverse a forward primerů (4.1.5.1) 35TEMf, 36TEMr, 37ACf a 38ACr metodou PCR (4.2.1). Postup klonování znázorňuje obrázek číslo 28.



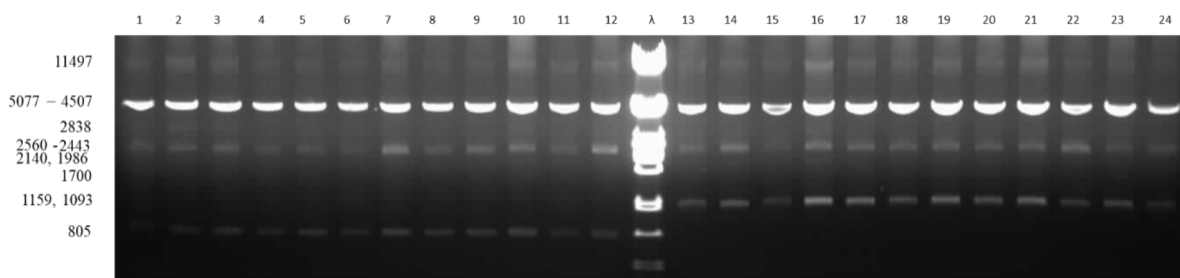
**Obrázek č. 28: Konstrukce plazmidů pBBRI obsahující reportérový gen. A:** Amplifikace  $\beta$ -laktamázového enzymu (TEM) pomocí primerů 35TEmf, 36TEMr (821 bp). **B:** Amplifikace adenylát cyklázové domény (AC) pomocí primerů 37ACf a 38ACr (643 bp). **C:** Schéma konstrukce plazmidu pBBRI TEM. **D:** Schéma konstrukce plazmidu pBBRI AC.

Po PCR byly fragmenty AC a TEM štěpeny restričními endonukleázami (4.1.3) *Hind*III a *Bam*HI a rozděleny na agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2). Plazmid pBBRI (4.1.8) byl taktéž štěpen restričními endonukleázami (4.1.3) *Hind*III a *Bam*HI a takto linearizovaný byl spolu s fragmenty AC a TEM izolován pomocí komerční sady Geneaid (4.2.3) (obr. č. 29).



**Obrázek č. 29: Analýza izolovaných PCR fragmentů AC a TEM a linearizovaného plazmidu pBBRI.** Ověření bylo provedeno na 1% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1 - fragment TEM o velikosti 821 pb, 2 - fragment AC o velikosti 1 148 pb 3-linearizovaný plazmid pBBRI o velikosti 4 677 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst*I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Izolované fragmenty byly jednotlivě ligovány (4.2.5) do linearizovaného plazmidu pBBRI (4.1.8) pomocí T4 ligázy po dobu 2 h a poté byla ligační směs transformována (4.2.7) do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). Metodou alkalické lyze (4.2.8) byla z vyrostlých kolonií izolována plazmidová DNA a správnost plazmidu nesoucího AC doménu a TEM byla ověřena štěpením pomocí restričních endonukleáz *Hind*III a *Bam*HI (4.1.3) a vizualizací na agarózovém gelu (4.2.2) (obr. č. 30).

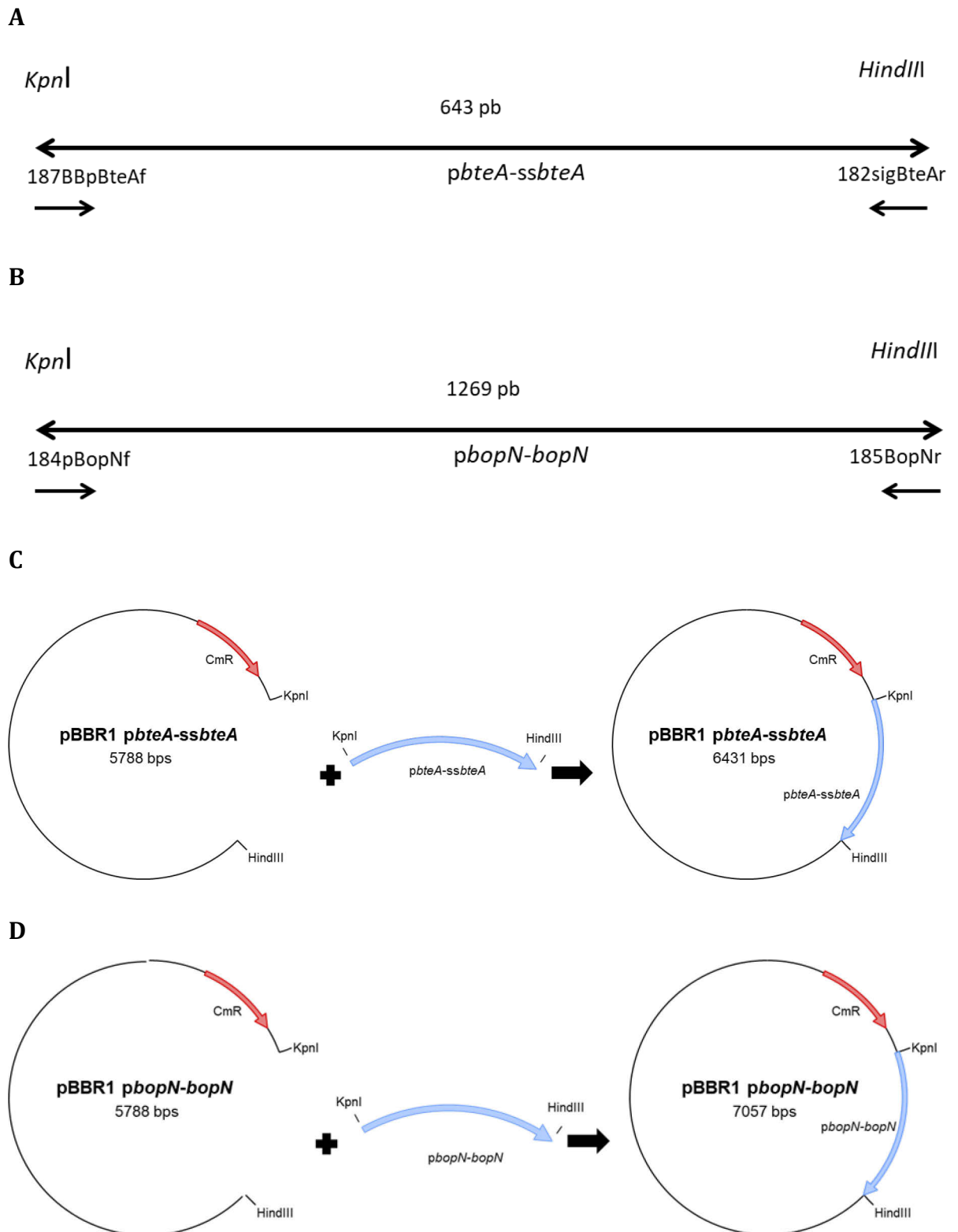


**Obrázek č. 30: Restrikční ověření minipreparované plazmidové DNA konstruktů pBBRI TEM a pBBRI AC.** Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restrikčními endonukleázami *Hind*III a *Bam*HI a poté analyzováno na 1% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentu TEM u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restrikčním štěpení byla 2 913bp/2 000bp/821 bp. Požadovaná velikost fragmentu AC u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restrikčním štěpení byla 4 500bp/1 148 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restrikční endonukleázou *Pst* I. Dráhy 1-12 obsahují konstrukty s TEM a dráhy 13-24 obsahují konstrukty s AC. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z analyzovaných plazmidů byl pro další konstrukci reportérového systému založeného na AC doméně vybrán klon 14 a pro systém založený na  $\beta$ -laktamázovém enzymu TEM byl vybrán klon číslo 4. Klony byly odeslány na sekvenaci do německé firmy GATC Biotech (4.2.9), kde byly sekvenovány pomocí primerů T7fwd, M13rev (4.1.5.2) byly tyto kolny ověřeny a

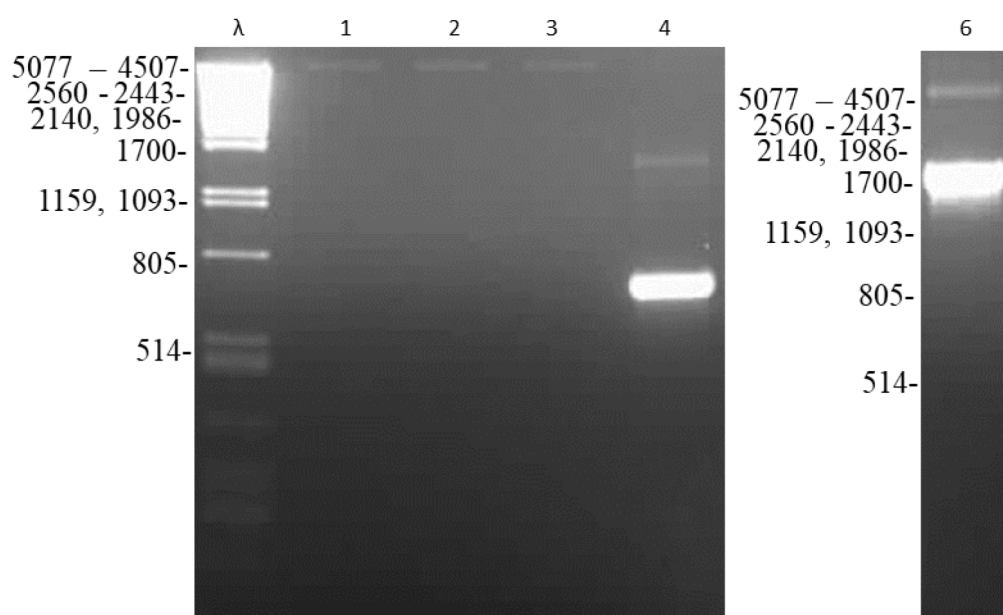
Následná fúze genů *ssbteA* a *bopN* byla provedena pouze s plazmidem pBBRI AC. Nejprve byla pomocí primerů 187BBpBteAf a 182sigBteAr (4.1.5.1) amplifikována oblast kódující promotor genu *bteA* spolu s jeho prvními 130 AA (*pbteA-ssbteA*), kódující sekreční signál. Také byly pomocí primerů (4.1.5.1) 184pBopNf a 185BopNr amplifikovány oblasti DNA nesoucí nukleotidovou sekvenci kódující protein BopN i s jeho promotorem (*pbopN-bopN*). Schéma konstrukce plazmidů znázorňuje obrázek 31.





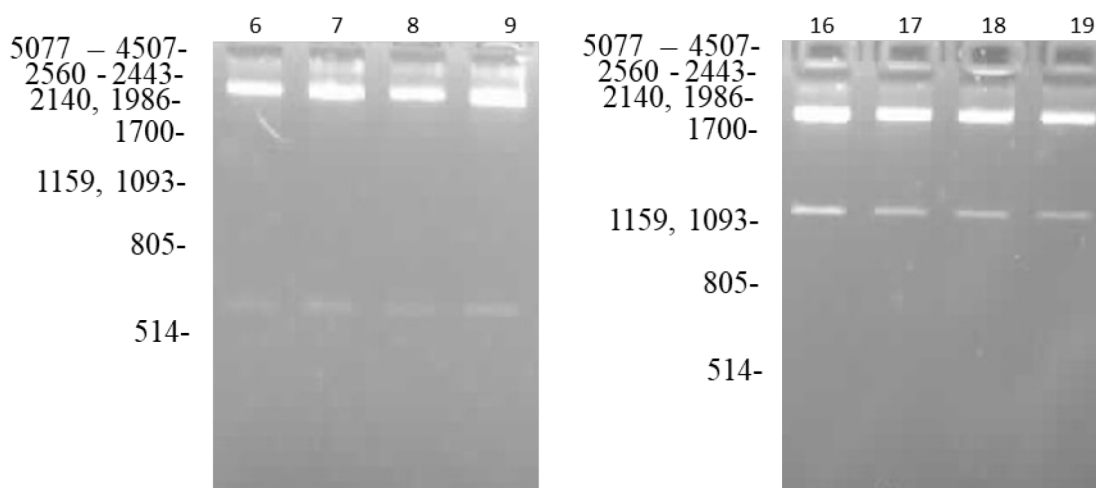
**Obrázek č. 31: Konstrukce plazmidů pBBR1 obsahující reportérový gen AC fúzaný s *ssbteA* proteinem BopN.**  
**A:** Schéma postupu amplifikace prvních 130 aminokyselin genu *bteA* spolu s jeho promotorem pomocí primerů 187BBpBteAf a 182sigBteAr (643 bp). **B:** Schéma postupu amplifikace genu *bopN* spolu s jeho promotorem pomocí primerů 184pBopNf a 185BopNr (1 269 bp). **C:** Schéma konstrukce plazmidu pBBR1 *pbteA-ssbteA*. **D:** Schéma konstrukce plazmidu pBBR1 *pbopN-bopN*.

Amplifikace bylo dosaženo metodou PCR (4.2.1), kde PCR produkt byl dle molekulové velikosti rozdělen na agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2), fragment byl z agarózového gelu vyříznut a izolován pomocí komerční sady Geneaid (4.2.3). Následně byly fragmenty štěpeny restrikními endonukleázami *KpnI* a *HindIII* (4.1.3). Zároveň byl izolován i linearizovaný plazmid pBBRI (4.1.8), který byl před izolací naštěpen pomocí restrikních endonukleáz *KpnI* a *HindIII* (4.1.3) (obr. č. 32).



**Obrázek č. 32: Analýza izolovaných PCR fragmentů *pbteA-ssbteA*, *pbopN-bopN* a linearizovaného plazmidu pBBRI AC.** Ověření bylo provedeno na 2% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1-3 – linearizovaný plazmid pBBRI o velikosti 5788 pb, 4-fragment *pbteA-ssbteA* o velikosti 643 pb, 6 – fragment *pbopN-bopN* o velikosti 1 268pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restrikní endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Každý z izolovaných fragmentů byl jednotlivě ligován (4.2.5) do linearizovaného plazmidu pBBRI (4.1.8) T4 ligací a po uplynutí doby potřebné pro ligaci (2 hodiny) byla ligační směs transformována (4.2.7) do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). Plazmidová DNA byla z vyrostlých kolonií izolována metodou alkalické lyze (4.2.8) a správnost konstruktů byla ověřena sekvenčním štěpením pomocí restrikních endonukleáz *MluI* a *BamHI* (4.1.3) s následnou vizualizací fragmentů na agarózovém gelu (4.2.2) (obr.č. 33).

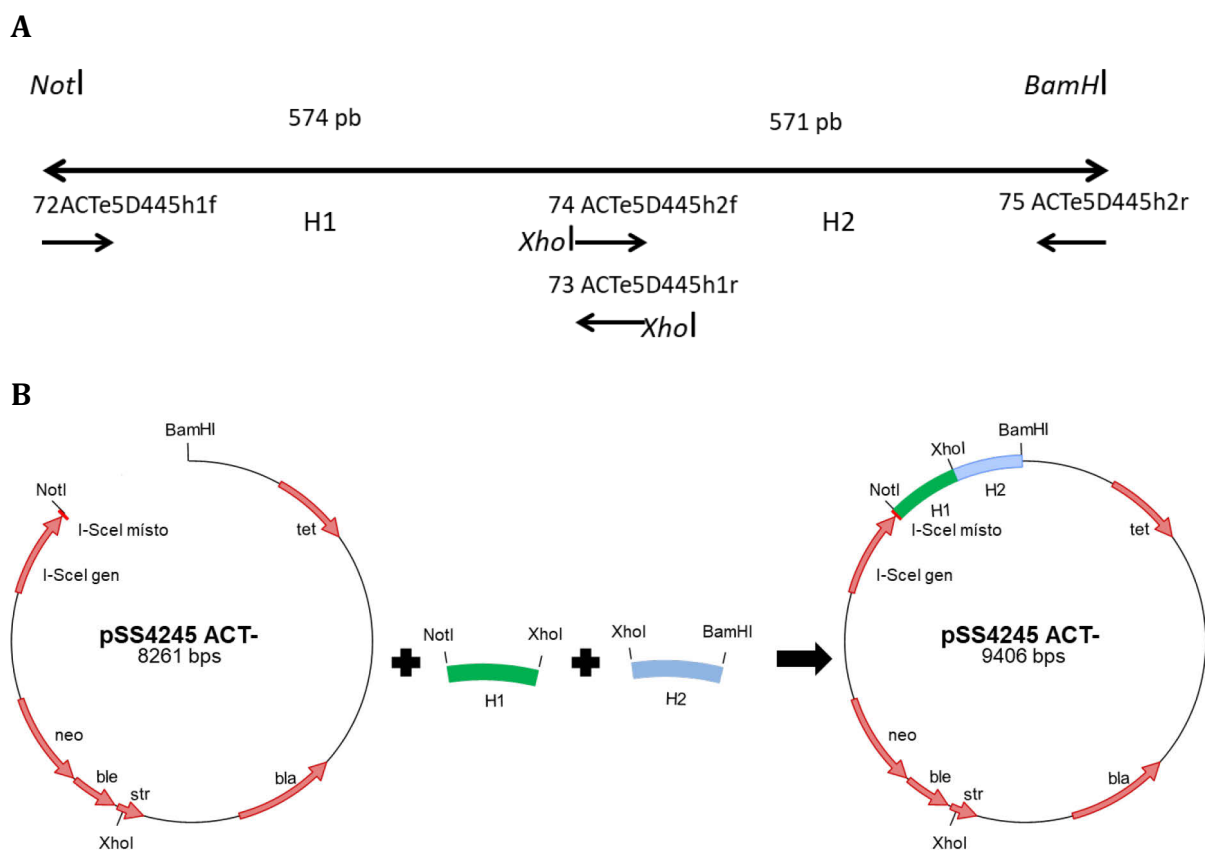


**Obrázek č. 33: Restriční ověření minipreparované plazmidové DNA pBBRI *pbteA-ssbteA* AC a pBBRI, *pbopN-bopN* AC.** Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *MluI* a *BamHI* a poté analyzováno na 1,5% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentu *pbteA-ssbteA* AC u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení je 643bp/5 788 bp. Požadovaná velikost fragmentu *pbopN-bopN* u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení je 1 268 bp/5 788 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *PstI*. Dráhy 6-9 obsahují analyzované kmeny *pbopN-bopN* a dráhy 16-19 obsahují kmeny *pbopN-bopN* konstrukty s AC. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Sekvenací pomocí primerů T7fwd, M13rev (4.1.5.2) byly ověřeny kolny číslo 6 a 16. Klony byly odeslány na sekvenaci do německé firmy GATC Biotech (4.2.9).

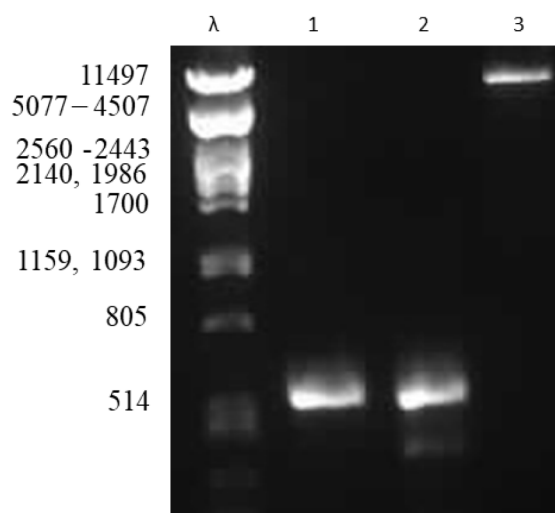
## 5.2.2 Detoxifikace kmenů nesoucích delece genů *bteA* a *bscN*

Aby mohl být v použit reportérový systém založený na AC doméně, musel být nejprve detoxifikován adenylát cyklázový toxin, kódovaný chromozomální DNA *B. bronchiseptica* D445. Detoxifikace ACT bylo dosaženo vložením dipeptidu (gly-ser) do oblasti mezi 188. a 189. aminokyseliniu (Osičková 1999). Oblast předcházející (H1: 681658..682221) a následující (H2: 682222..682782) aminokyselinami 188 a 189 byla amplifikována pomocí primerů 72ACTe5D445h1f, 73ACTe5D445h1r a 74ACTe5D445h2f a 75ACTe5D445h2r (4.1.5.1) metodou PCR (4.2.1), přičemž H1 reverse a H2 forward oligonukleotidy v sobě obsahovaly hexanukleotid kódující výše zmíněný dipeptid, který navíc kódoval místo pro štěpení restriční endonukleázou *XhoI* (4.1.3) (obr. č. 34).



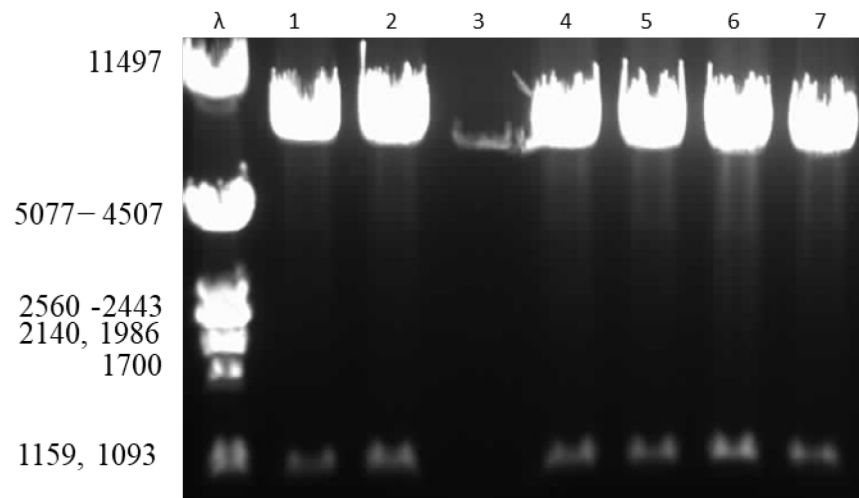
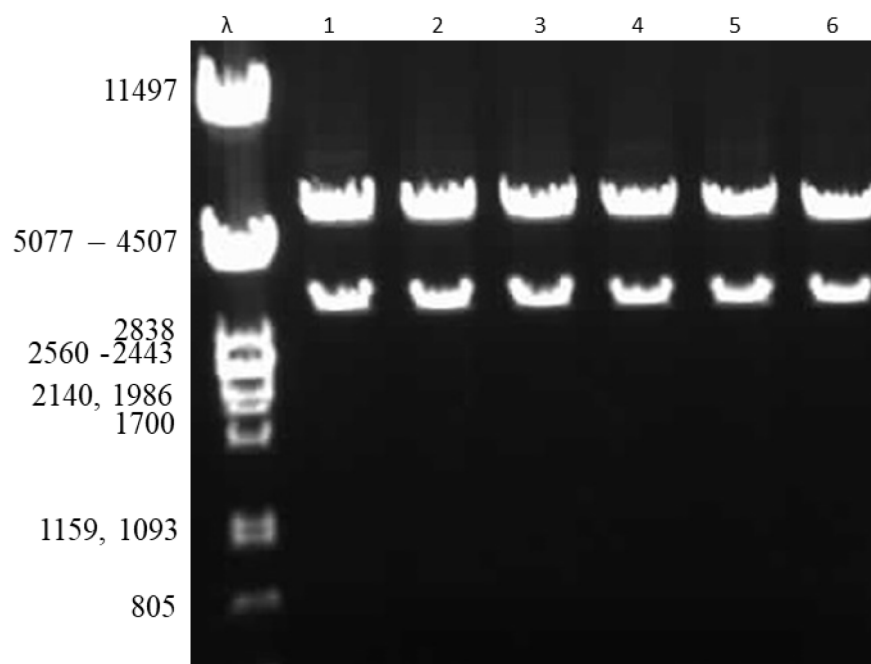
**Obrázek č. 34: Detoxifikace adenylát cyklázového toxinu. A:** Schéma postupu detoxifikace genu *cyoA* pomocí homologní oblasti H1 (574 bp) amplifikované primery 72ACTe5D445h1f a 73ACTe5D445h1r a homologní oblasti H2 (571 bp) amplifikované primery 74ACTe5D445h2f a 75ACTe5D445h2r. Šipky znázorňují orientaci a místo nasedání primerů. **B:** Schéma ligace fragmentů během konstrukce plazmidu pSS4245 ACT-.

PCR produkt a plazmid pSS4245 byly štěpeny restričními endonukleázami *NotI*, *XhoI* a *BamHI* (4.1.3), molekulová velikost fragmentů a linearizovaného plazmidu byla ověřena rozdělením na agarózovém gelu pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) a následně byly fragmenty a plazmid izolovány komerční sadou Geneaid (4.2.3) (Obr.č.35).



**Obrázek č. 35: Analýza izolovaných PCR fragmentů homologních oblastí H1 a H2 a linearizovaného plazmidu pSS4245.** Ověření bylo provedeno na 1% agarózovém gelu, který byl obarvený ethidium bromidem a vizualizovaný pod UV světlem. Gel analyzuje následující vzorky: 1 – oblast H1 o velikosti 574 pb, 2 – oblast H2 o velikosti 571 pb, 3-linearizovaný plazmid pSS4245 o velikosti 8 261 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Fragmenty H1 a H2 byly pomocí kohezních konců zaligovány (4.2.5) do linearizovaného plazmidu pSS4245 (4.1.8) a metodou teplotního šoku transformovány (4.2.7) do buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.1.9). Metodou alkalické lyze (4.2.8) byla z vyrostlých kolonií izolována DNA a správnost konstruktů byla ověřena štěpením pomocí restričních endonukleáz *Not*I a *Bam*HI (4.1.3). Fragmenty byly vizualizovány na agarózovém gelu (4.2.2). Z analyzovaných mutovaných kmenů bylo vybráno 6 konstruktů, přičemž jejich správnost byla ověřena sekvenčním štěpením restričními endonukleázami *Bst*XI a *Nde*I (4.1.3) (obr. č. 36).

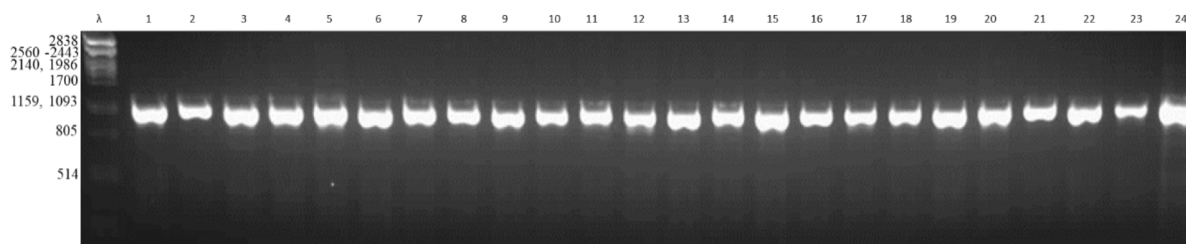
**A****B**

**Obrázek č. 36: Restriční ověření minipreparované plazmidové DNA pSS4245 ACT.** (A) Štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *NotI* a *BamHI* a poté analyzováno na 0,6% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení byla 1 145/8 261 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb). (B) Sekvenční štěpení plazmidové DNA bylo provedeno restričními endonukleázami *BstXI* a *NdeI* a poté analyzováno na 0,8% agarózovém gelu. Požadovaná velikost fragmentů u správně zkonstruovaných plazmidů při tomto restričním štěpení byla 3 429/5 970 bp. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

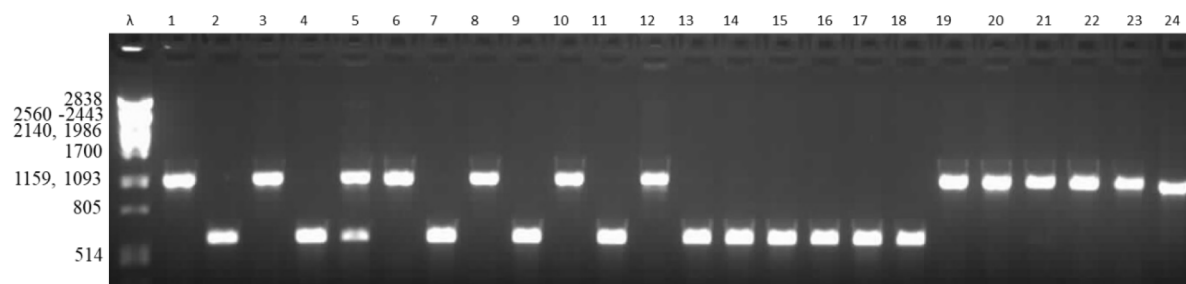
Pro další zpracování byl vybrán konstrukt číslo 13, který byl následně sekvenován (4.2.9) pomocí sekvenačních primerů pSS4245for, pSS4245rev (4.1.5.1) a transformován (4.2.7) do buněk *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.9).

Detoxifikace v genomu *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  bylo dosaženo za pomoci homologní rekombinace. Po konjugaci byly bakterie vysety na BG médium s přídatkem 15 % beraní krve a směsi antibiotik (ampicilin, kanamycin, streptomycin). Následně byly klony reisolovány na tuhé BG médium (4.1.7) pouze s 15 % beraní krví. Ověření, o jaký kmen se po proběhlém 2. crossing-overu jedná, bylo provedeno pomocí PCR (4.2.1), štěpením restriční endonukleázou (4.1.3) *Xho*I a následnou vizualizací na agarózovém gelu (4.2.2) jak ukazuje obrázek číslo 37.

**A**



**B**



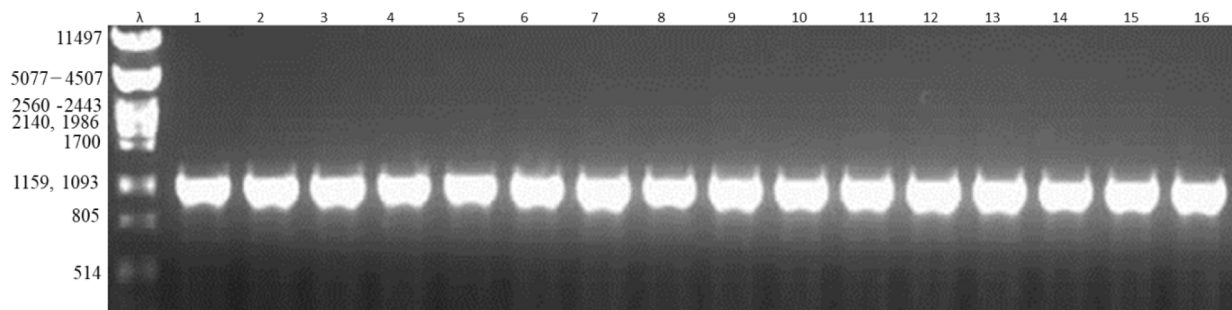
**Obrázek č. 37: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 72ACTe5D445h1f a 75ACTe5D445h2. PCR reakce byla následně nanasana na 1% agarózový gel (**A**), anebo štěpena restriční endonukleázou *Xho*I a rovněž nanasana na 1% agarózový gel (**B**). Předpokládané velikosti neštěpených PCR produktů jsou 1 145 pb u  $\Delta bteA$  a 1 151 pb u detoxifikovaného  $\Delta bscN$  kmene, zatímco po štěpení restriční endonukleázou *Xho*I je očekávaná velikost 1145 pb u  $\Delta bteA$  kmene, a 574 pb a 577 pb u detoxifikovaného  $\Delta bscN$  kmene. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z testovaných kmenů byl pro další zpracování vybrán kmen číslo 7.

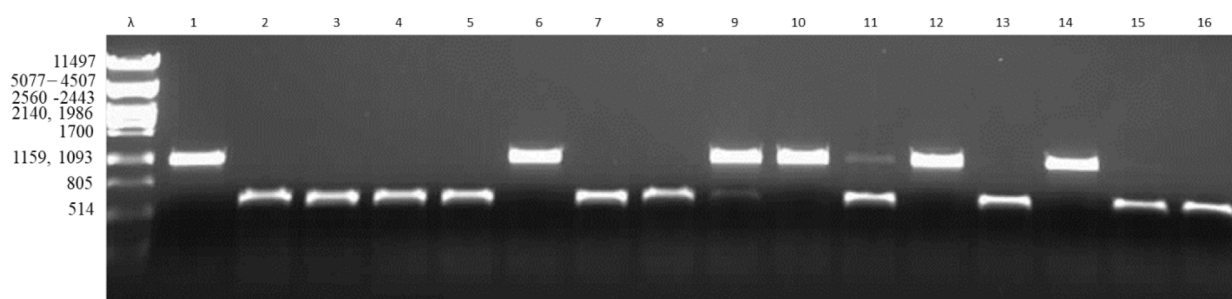
Detoxifikace v genomu *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bscN$  bylo dosaženo stejným způsobem jako u kmene *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$ . Detoxifikace získaných kmenů po druhém crossing-overu byla ověřena metodou PCR (4.2.1), štěpením restriční

endonukleázou (4.1.3) *Xho*I a vizualizací pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) (obr. č. 38).

**A**



**B**



**Obrázek č. 38: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 72ACTe5D445h1f a 75ACTe5D445h2r. PCR reakce byla následně nanasena na 1% agarózový gel (A), anebo štěpena restriční endonukleázou *Xho*I a rovněž nanasena na 1% agarózový gel (B). Předpokládané velikosti neštěpených PCR produktů jsou 1 145 pb u  $\Delta bscN$  a 1 151 pb u detoxifikovaného  $\Delta bscN$  kmene, zatímco po štěpení restriční endonukleázou *Xho*I je očekávaná velikost 1 145 pb u  $\Delta bteA$  kmene, a 574 pb a 577 pb u detoxifikovaného  $\Delta bteA$  kmene. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriční endonukleázou *Pst* I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z testovaných kmenů byl dále kmen číslo 7

Další ověření správnosti vytvořených kmenů bylo dosaženo stanovením celkové adenylát cyklázové aktivity bakteriální kultury. Byly analyzovány kmeny *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  a  $\Delta bscN$  s detoxifikovaným ACT ( $\Delta bteA/AC^-$  klon 7;  $\Delta bscN/AC^-$  klon 7), kmen *B. bronchiseptica* divokého typu a odpovídající  $\Delta bteA$  a  $\Delta bscN$  kmeny použité pro přípravu detoxifikovaných kmenů. Všechny kmeny byly kultivovány v 3 ml tekutého SS média (4.1.7) do konečného  $OD_{600} \approx 1,5$  a následně u nich byla stanovena celková adenylát cyklázová aktivita (4.2.18) (tab. č. 1).



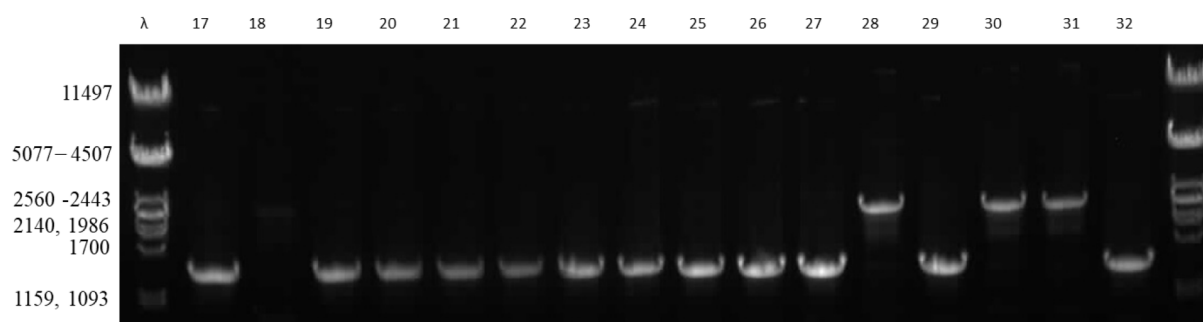
Celková AC aktivita	mU/ml
<i>B.b.</i> D445 wt	13.6
$\Delta bteA$	22.8
$\Delta bscN$	10.9
$\Delta bteA$ AC- klon #7	0
$\Delta bscN$ AC- klon #7	0

**Tabulka č. 1: Hodnoty adenylát cyklázové aktivity analyzovaných kultur.** Celková AC aktivita byla stanovena z kultur *B. bronchiseptica* D445 divokého typu,  $\Delta bteA$ ,  $\Delta bscN$ ,  $\Delta bteA$  AC- a  $\Delta bscN$  AC- po přidání kalmolidinu (4.2.18) a je vyjádřena v mU adenylát cyklázového enzymu/ml.

Jak ukazuje tabulka, u detoxifikovaných konstruktů nedocházelo k přeměně ATP na cAMP, tudíž tyto kmeny nevykazovaly žádnou AC aktivitu. Zkonstruované kmeny byly tedy vytvořeny správně.

### 5.2.3 Delece genu *bopN* v detoxifikovaném kmeni $\Delta bteA$

Delece genu *bopN* v kmeni  $\Delta bteA$  *B. bronchiseptica* D445 bylo dosaženo stejně jako při konstrukce kmenu  $\Delta bopN$  (5.1.1). Ověření kolonií po druhém crossing-overu bylo provedeno metodou PCR (4.2.1) pomocí primerů 106BopN1f a 195BopN2r (4.1.5.1) a následnou vizualizací pomocí horizontální elektroforézy (4.2.2) (obr. č. 39).



**Obrázek č. 39: Analýza individuálních kolonií *B. bronchiseptica* D445 po druhém crossing-overu.** Chromozomální DNA z analyzovaných kolonií byla amplifikována PCR primery 106BopN1f a 195BopN2r, a PCR reakce byla nanášena na 0,8% agarózový gel. Očekávaná velikost PCR produktu u divokého kmene je 2 566 pb, zatímco velikost PCR produktu po deleci genu *bopN* je 1 529 pb. První dráha obsahuje velikostní standard  $\lambda$  DNA štěpený restriktční endonukleázou Pst I. Velikosti jsou uvedeny v párech bází (pb).

Z testovaných kmenů byl pro další zpracování vybrán kmen číslo 22.

#### 5.2.4 Vnesení reportérových plazmidů pBBRI do detoxifikovaných kmenů

Detoxifikované mutantní kmeny *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup>;  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup>;  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> byly následně komplementovány plazmidem pBBRI obsahující AC doménu fúzovanou se sekrečním signálem *ssbteA* (5.2.1).

Toho bylo dosaženo bakteriální konjugací (**Error! Reference source not found.**) uvedených kmenů a *E. coli* SM10  $\lambda$  pir (4.1.8), která obsahovala plazmid pBBRI (4.1.8) kódující *ssbteA*-AC (5.2.1). Po konjugaci byly bakterie vysety na BG médium (4.1.7) s přídatkem 15 % beraní krve a antibiotiky chloramfenikol a cefalexin. Plazmid pBBRI nese gen kódující rezistenci na chloramfenikol. Na tuhém médiu s touto kombinací antibiotik vyrostou pouze bakterie *B. bronchiseptica*, protože jsou přirozeně rezistentní na cefalexin, zatímco pro bakterie *E. coli* je toto antibiotikum letální.

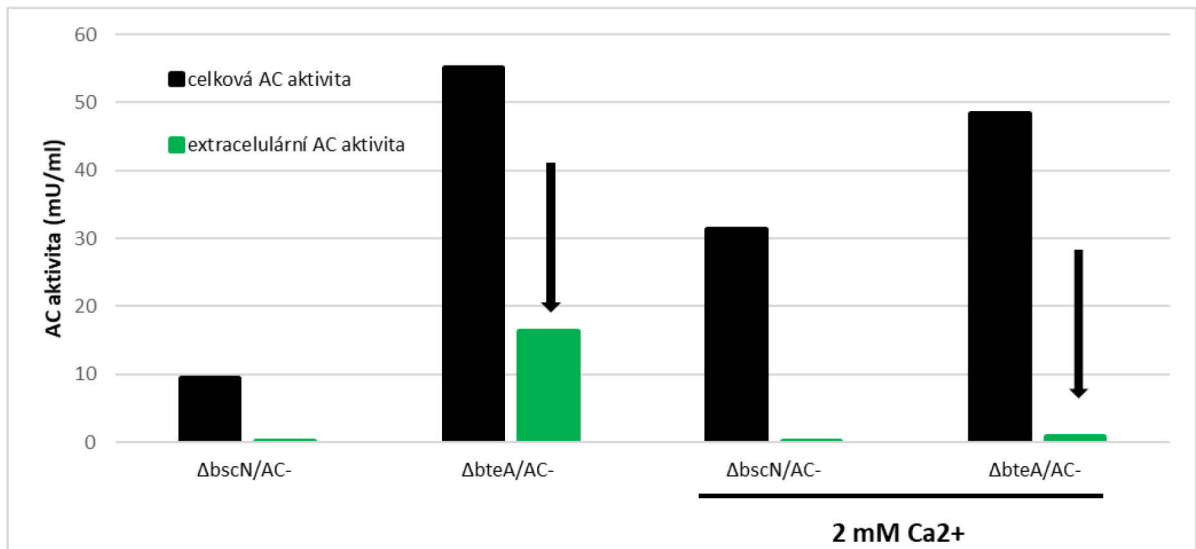
### 5.3 Regulace aktivity sekrečního systému typu 3 v médiu v závislosti na vápenatých iontech a role proteinu BopN v této regulaci

Vzhledem k tomu, že proteiny homologní k proteinu BopN regulují sekreci substrátových proteinů sekrečního systému typu 3 a tato regulace je závislá na přítomnosti vápenatých iontů, byl vliv vápníku na aktivitu T3SS analyzován i u bakterie *B. bronchiseptica* D445.

#### 5.3.1 Stanovení s využitím reportérových kmenů

U zkonstruovaného kmenu  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> s pBBRI plazmidem (4.1.8) kódujícím *ssbteA*-AC byla stanovena závislost sekrece tohoto reportéru do média na vápenatých iontech. Jako kontrola specifity translokace přes T3SS byl použit kmen  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup> neschný sekrece přes T3SS se stejným plazmidem. Oba kmeny  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> / pBBRI *ssbteA*-AC a  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup> / pBBRI *ssbteA*-AC byly předkultivovány ve 2 ml tekutého SS média (4.1.7) a následně kultivovány v 50 ml SS média bez vápníku anebo s 2 mM vápníkem po dobu 16h. Poté byla stanovena adenylátcyklázová aktivita (4.2.18) v bakteriální kultuře a rovněž její hodnota v supernatantu. Jak ukazuje obrázek 40, nebyla detekována žádná AC aktivita v supernatantu kultury

$\Delta bscN$  AC- /pBBRI *ssbteA*-AC, což potvrzuje specifickou translokaci tohoto reportéru přes T3SS. Obrázek 40 dále ukazuje, že přítomnost vápníku v kultuře  $\Delta bteA$  AC- / pBBRI *ssbteA*-AC vedla ke snížení množství detekované AC aktivity v supernatantu.

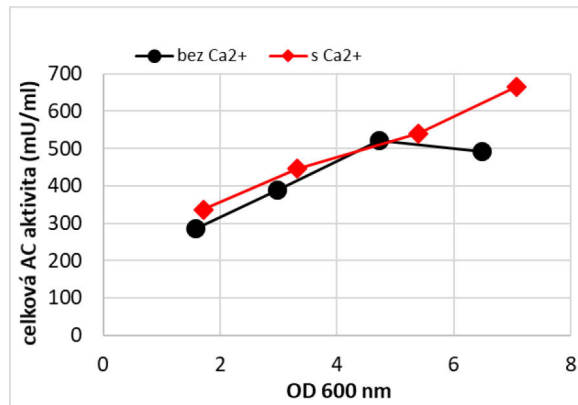


**Obrázek č. 40: Stanovení vlivu vápenatých iontů na sekreci reportérového proteinu *ssbteA*-AC.** Reportérové kmeny *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  AC- / *ssbteA*-AC a  $\Delta bscN$  AC- / *ssbteA*-AC byly využity pro stanovení vlivu vápenatých iontů na sekreci T3SS. Celková a extracelulární AC aktivita bakterií kultivovaných po dobu 18 h v médiu bez vápníku nebo v médiu obohaceném o 2mM Ca<sup>2+</sup> byla stanovena, jak uvedeno v 4.2.18. AC aktivita byla stanovena po přidání kalmodulinu a je vyjádřena v mU adenylát cyklázového enzymu / ml.

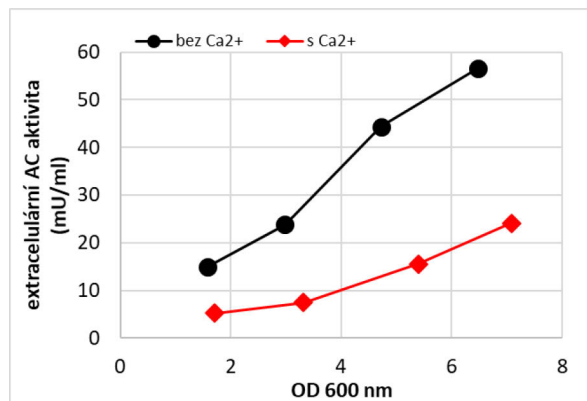
Tato data naznačují, že by vápník mohl hrát podobnou roli v sekreci skrze T3SS *Bordetellae*, jak již bylo popsáno pro jiné rody bakterií, např. u *Yersiniae*. Pro lepší charakterizaci vlivu vápníku na sekreci skrze T3SS byla změřená časová kinetika sekrece reportéru (obr. č. 41). Bakterie byly opět předkultivovány ve 2 ml tekutého SS média (4.1.7) a následně kultivovány v 50 ml SS média bez vápníku anebo s 2 mM vápníkem. V jednotlivých časových bodech, a to v časech 9, 12, 15 a 18h od inokulace do 50 ml SS byly odebrány vzorky kultur pro stanovení celkové AC aktivity a rovněž byla stanovena hodnota AC aktivity v supernatantu. Výsledky byly následně zpracovány do tří grafů. Jak demonstruje obrázek 41A, celková AC aktivita kultury  $\Delta bteA$  AC- / pBBRI *ssbteA*-AC narůstala v čase společně s růstem optické denzity a její množství v bakteriální kultuře ani rychlost růstu bakteriální kultury nebyly přidavkem 2 mM Ca<sup>2+</sup> výrazně ovlivněny. Jak dále ukazuje obrázek 41B, také množství extracelulární AC aktivity (aktivity AC v supernatantu) narůstalo v čase a bylo funkcí optické denzity u obou kultur. Avšak množství extracelulární AC aktivity bylo u kultury  $\Delta bteA$  AC- / pBBRI *ssbteA*-AC po přidání vápenatých iontů výrazně nižší, a to ve všech

analyzovaných časových bodech. Pokud vyjádříme extracelulární AC aktivitu jako % celkové AC daného kmene (obr. č. 41C), můžeme ukázat, že největší procentuální rozdíl je mezi kmenem kultivovaným v médiu bez vápníku ( $OD_{600}=6,48$ ) a kmenem kultivovaným v médiu obohaceném o vápenaté ionty ( $OD_{600}=7$ ) v čase 18h od inokulace. V grafu není zahrnuta negativní kontrola, kterou představovala kultivace T3SS-deficientního kmene *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bscN$  AC-/ *ssbteA*-AC, u kterého byla AC aktivita v supernatantu rovna nule. Pokus byl ukončen v čase 18 h od inokulace vzhledem k tomu, že v tomto čase se již jedná o pozdní exponenciální až časnou stacionární fázi bakteriální kultury, při které dochází ke zpomalení růstu bakterií. V této fázi také můžeme očekávat lyzi bakteriálních buněk, a nespecifickou detekci uvolnění použitého reportéru. Z výše uvedených důvodů byl vybrána 18 h kultivace pro následné experimenty.

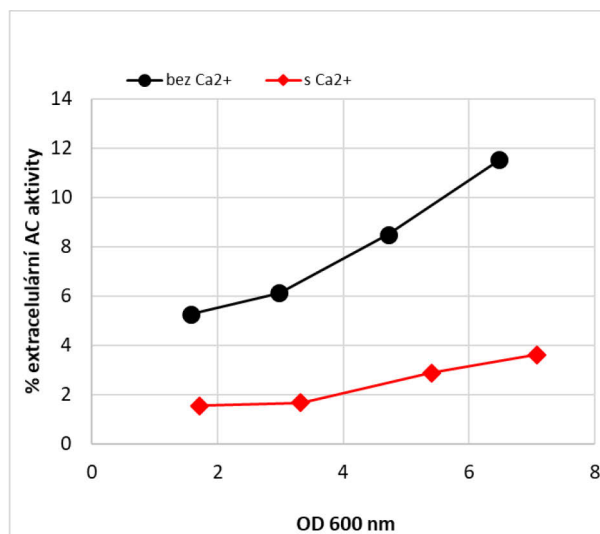
A



B

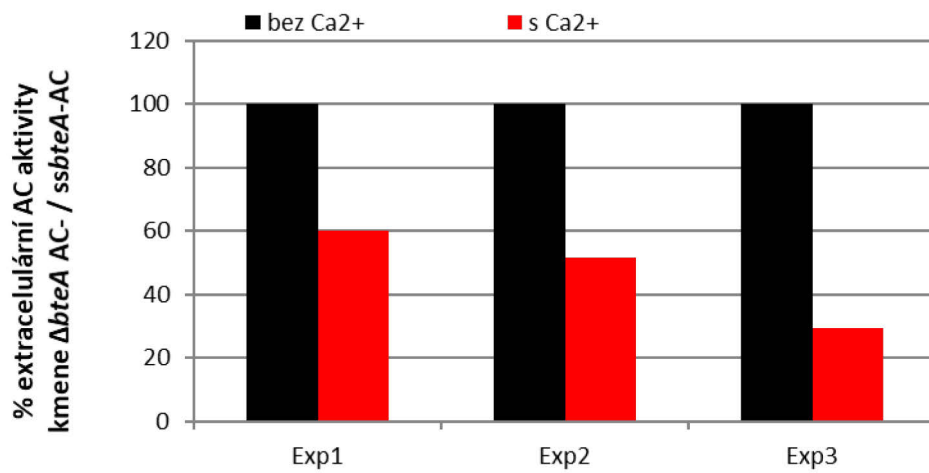
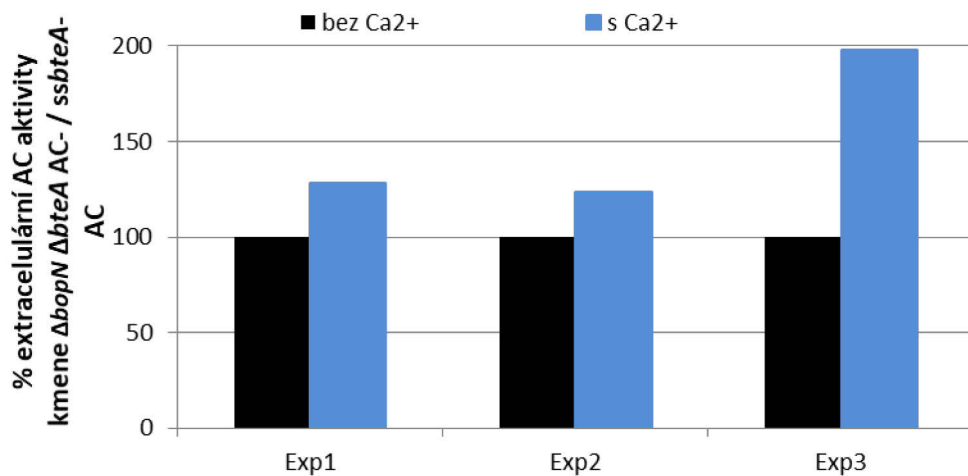


C



**Obrázek č. 41: Stanovení závislosti vlivu vápenatých iontů na sekreci v průběhu kultivace.** AC aktivita byla stanovena u kultury *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  AC- / *ssbteA*-AC kultivované v médiu bez vápníku nebo v médiu obohacené o 2mM vápenaté ionty. Body osy x vyznačené v obrázcích představují časové body 9,12,15,18 h, ve kterých byly odebírány vzorky kultury pro stanovení AC aktivity a zároveň byla stanovena její optická densita. **A:** Celková AC aktivita v mU adenylát cyklázového enzymu / ml. **B:** Extracelulární AC aktivita kultury v mU adenylát cyklázového enzymu / ml. **C:** Extracelulární AC aktivita kultury jako procento celkové AC aktivity.

V další sérii experimentů byl analyzován vliv vápenatých iontů na sekreci *ssbteA*-AC reportéru i u kmene nesoucí delecí genu *bopN* ( $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup>). Kontrolní kmen  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> a zároveň i testovaný kmen  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> byly stejně, jak bylo popsáno výše, předkultivovány ve 2 ml tekutého SS média (4.1.7) a následně kultivovány v 50 ml SS média bez vápníku anebo s 2 mM vápníkem. Čas kultivace byl 18h a obrázek číslo 42 ukazuje výsledky všech 3 experimentů. Extracelulární AC aktivita kultur je v těchto grafech vyjádřena po normalizaci na celkovou AC aktivitu kultury a vynesena jako % extracelulární AC aktivity u odpovídající kultury, která rostla v médiu bez vápníku. Jak je ukázáno na obrázku 42A, v případě kontrolního kmene  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> byla opět pozorována inhibice translokace reportéru skrze T3SS vlivem vápenatých iontů, avšak u testovaného kmene  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> k této inhibici nedocházelo.

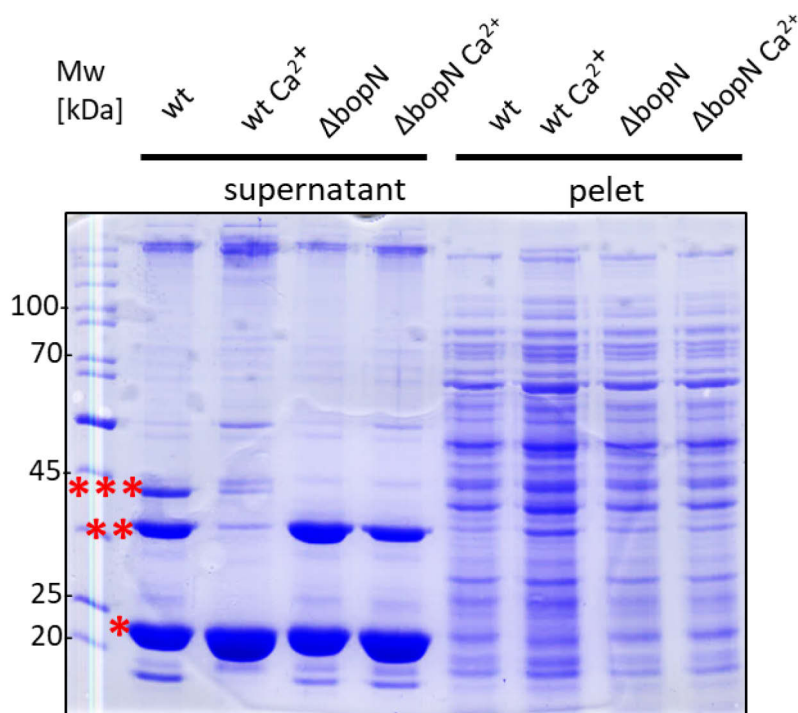
**A****BopN<sup>+</sup>****B****BopN<sup>-</sup>**

**Obrázek č. 42: Vliv delece genu *bopN* na vápníkem-zprostředkovanou regulaci sekrece T3SS.** Reportér *ssbteA*-AC byl využit pro stanovení vlivu delece genu *bopN* na aktivitu T3SS v médiu. Extracelulární AC aktivita kultury po normalizaci na celkovou AC aktivitu kultury je vyjádřena jako procento % extracelulární AC aktivity kultury, která rostla v médiu bez vápníku: **(A)**  $\Delta bteA$  AC- a **(B)**  $\Delta bopN \Delta bteA$  AC-.

### 5.3.2 Stanovení za pomoci hmotnostní spektrometrie

Aby bylo možné detekovat vliv vápenatých iontů na všechny proteiny účastnící se na výstavby sekrece T3SS, a rovněž všechny substrátové proteiny T3SS byla provedena analýza za použití hmotnostní spektrometrie u kmenů *B. bronchiseptica* D445 (4.1.9) divokého typu a mutantních kmenů *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bscN$  a  $\Delta bopN$ .

Pro prvotní získání představy o vápníkem-zprostředkované regulaci produkce a sekrece proteinů T3SS byly kmeny *B. bronchiseptica* D445 divokého typu a zkonstruované mutantní kmeny  $\Delta bopN$  kultivované v médiu bez a po přidání 2mM  $Ca^{2+}$  analyzované pomocí SDS-PAGE stejným způsobem, jak bylo popsáno v kapitole (5.1.5) (obr. č. 43).



**Obrázek č. 43: Vliv vápenatých iontů na produkci a regulaci proteinů T3SS.** Detekce proteinů u kmenu *B. bronchiseptica* D445 divokého typu a u vytvořeného mutantního kmenu s delecí genu *bopN* pomocí metod SDS-PAGE. Analýza byla provedena u kultur pěstovaných v tekutém médiu bez vápníku nebo v médiu obohaceném o 2 mM  $Ca^{2+}$  pomocí 10% SDS-PAGE a následného obarvení Coomassie Blue R-250. Jedna hvězdička označuje protein Bsp22, dvě hvězdičky označují protein BopD a tři hvězdičky zobrazují polohu proteinu BopN. První dráha obsahuje nebarvený proteinový marker. Velikost proteinů je uvedena v kiloDaltonech (kDa).



Poloha proteinů BopN, BopD a Bsp22 na SDS-PAGE byla odhadnuta dle jejich molekulové hmotnosti. Jak vyplývá z obrázku 43, přítomnost vápenatých iontů v kultuře divokého kmene *B. bronchiseptica* D445 způsobila snížení sekrece proteinů BopN a BopD. BopD je translokátor T3SS zodpovědný za vznik póru v membráně hostitelské buňky, kterým jsou translokovány efektorové proteiny do buněčného cytozolu. U kultury *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bopN$  se přidavek 2 mM vápníku na sekreci proteinu BopD nijak neprojevil.

Pro ověření prvotní představy získané po analýzou SDS-PAGE gelu byla u kmenů *B. bronchiseptica* D445 divokého typu,  $\Delta bscN$  a  $\Delta bopN$  provedena analýza pomocí hmotnostní spektrometrie (4.2.19), přičemž kmen  $\Delta bscN$  sloužil jako kontrola specifity sekrece skrze T3SS. Kmeny byly jako v předchozím případě kultivovány v tekutém SS médiu (4.1.7) po dobu 18 hodin, supernatant kultur byl precipitován pomocí TCA (4.2.14) a následně byly vzorky supernatantu i peletu kultur připraveny pro analýzu hmotnostní spektrometrií spojenou s nano kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS). Hmotnostní spektrometrie byla provedena formou služby v laboratoři OMICS Proteomika. Obdržená data byla zpracovaná pomocí softwarů MaxQuant a Perseus (4.1.10) Presentované výsledky obsahovaly pouze proteiny, u kterých byly detekovány alespoň 2 unikátní peptidy a hladina spolehlivosti byla menší než 0,01. Jako signifikantní změna množství detekovaného proteinu mezi analyzovanými vzorky byla považována míra změny exprese proteinů menší než 0,5 nebo větší než 2 (tab. č. 2).

Protein			míra změny exprese proteinů			
Identifikace proteinu	Anotace proteinu v <i>B. bronchiseptica</i> D445	homolog proteinu v <i>B. pertussis</i> Tohama I	pel wt / wt Ca2+	pel $\Delta bopN/\Delta bopN$ Ca2+	sup wt / wt Ca2+ sup	sup $\Delta bopN/\Delta bopN$ Ca2+ sup
KAK65880	type III secreted protein BspR OS	BtrA/BspR	1,36	1,02	0,33	0,86
KAK65890	type III secretion apparatus protein, HrpE/YscL family OS	BscL	0,83	1,56		
KAK65893	type III secreted protein BopD OS	BopD	3,31	1,46	0,25	0,68
KAK65901	type III secretion regulator YopN/LcrE/InvE/MxiC OS	BopN	1,55		0,16	
KAK65903	type III secretion low calcium response chaperone LcrH/SycD OS	BcrH2	0,72	1,29	0,12	0,28
KAK65921	type III secretion chaperone SycN OS		0,56	1,31	0,69	1,08
KAK65921	type III secretion chaperone, CesT family OS	BscW	1,21	0,91		
KAK65923	type III secretion apparatus protein, YscI/HrpB, C-terminal protein OS	BscI			1,25	1,35
KAK65929	type III secreted protein BopB OS	BopB	3,21	0,71	1,97	0,91
KAK65934	type III secretion apparatus protein, YscQ/HrcQ family OS	BscQ	1,52	0,88		
KAK65935	type III secretion outer membrane pore, YscC/HrcC family OS	BscC		1,40		
KAK65942	type III secretion apparatus H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase OS	BscN	2,39	2,63		
KAK65952	type III secretion low calcium response chaperone LcrH/SycD OS	BcrH1	0,69	0,70		
KAK75296	type III secretion chaperone, CesT family OS	BtcA	0,69	0,91		
KAK65953	alanine racemase OS	alr	0,96	1,10		
KAK65896	histidine kinase-like ATPase domain protein OS	BtrW	1,85	1,62		
KAK65907	STAS domain protein OS	BtrV	1,20	1,24		
KAK65928	oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein OS	BtrN	0,94	0,95	1,83	
KAK65891	putative RNA polymerase sigma factor HrpL OS	BtrS	0,91	1,80		0,43
KAK65939	putative Yop protein translocation protein U OS	BscU	0,95	1,71		
KAK65924	putative N-acetyltransferase YedL OS	BscP	1,33	0,96		
KAK65918	putative N-acetyltransferase YedL OS	Bcr4	2,22	0,88		
KAK65931	putative N-acetyltransferase YedL OS		0,41	0,98	0,57	0,98
KAK65945	T3SS tip complex protein Bsp22 OS	Bsp22	0,47	1,20	1,52	1,05
KAK65919	putative N-acetyltransferase YedL OS				0,95	1,75
KAK65913	putative N-acetyltransferase YedL OS	BscE	0,55	1,74		
KAK75306	T3SS cytotoxic effector BteA OS	BteA	3,80	0,94	1,19	0,99

**Tabulka č. 2: Stanovení vlivu vápenatých iontů na produkci a sekreci proteinů sekrečního systému typu 3.** Množství proteinů v supernatantu a v peletu u kultur *B. bronchiseptica* D445 divokého typu a zkonstruovaného mutantního kmenu  $\Delta bopN$  kultivovaných v médiu bez vápníku nebo v médiu obohaceném o 2 mM Ca<sup>2+</sup> bylo stanoveno pomocí hmotnostní spektrometrie. Jako signifikantní byla považována změna množství proteinů >2 nebo <0,5. Zeleně jsou vyznačeny proteiny, u kterých byla zvýšena exprese či jejich sekrece po přidávku vápenatých iontů, červeně jsou vyznačeny proteiny, jejichž exprese či sekrece byla vápníkem snížena. První tři sloupce zahrnují analýzu změny exprese proteinů v peletu, zatímco další tři sloupce zahrnují analýzu množství v supernatantu kultury.

Tabulka demonstruje vliv vápenatých iontů na produkci a sekreci proteinů sekrečního systému typu 3. V souladu s analýzou pomocí SDS-PAGE ukázala hmotnostní spektrometrie že, u divokého kmenu *B. bronchiseptica* D445 způsobil přidavek vápenatých iontů snížení množství translokátorových proteinu BopD a proteinu BopN v supernatantu. Data zároveň ukazují, že vlivem vápníku došlo v peletu ke zvýšení množství translokátorových proteinů BopD, a i proteinu BopN i když v menší míře. Nedochozí tedy ke snížení exprese translokátorového proteinu BopD, pouze není sekretován do média pomocí T3SS. V supernatantu byla také detekována vlivem vápníku snížená sekrece proteinů Bspr (BtrA) a BcrH2. Zdá se však, že vlivem vápníku dochází ke zvýšení exprese proteinů ATPázy BscN, efektoru BteA a proteinu Bcr4 s dosud nedefinovanou funkcí. U kmenu *B. bronchiseptica* D445 s deletovaným genem *bopN* byla pozorována snížená sekrece v supernatantu pouze u chaperonu BcrH2 a u anti-sigma faktoru, proteinu BtrS. Můžeme tedy říci, že po delecí proteinu BopN u *Bordetellae* nedochází vlivem vápníku k výraznému ovlivnění sekrece a produkce proteinů sekrečního systému typu 3. Avšak opět bylo pozorované vápníkem-zprostředkované zvýšení exprese ATPázy BscN v peletu kultury.

## 6 Diskuze

Sekreční systém typu 3 (T3SS) je řazen mezi faktory virulence u bakterií rodu *Bordetellae*. Jedním ze substrátových proteinů T3SS je i protein BopN, jehož role je dle literatury velmi nejednoznačná. Protein BopN byl popsán jako efektor, který je translokován do eukaryotické buňky. V hostitelské buňce pak dle skupiny vědců z Japonska moduluje prozánětlivou odpověď tím, že blokuje translokaci jaderného faktoru NF-kB65 a současně podporuje translokaci jaderného faktoru NF-kB50. Zvýšení translokace NF-kB50 následně pozitivně ovlivňuje produkci protizánětlivého cytokinu interleukinu 10 (Nagamatsu *et al.*, 2009). Důkaz takového tvrzení však postrádá kontrolu translokace proteinu BopN do eukaryotické buňky. Jiná studie, která prokázala pomocný efekt proteinu BopN na cytotoxicitu způsobenou prokázaným efektorovým proteinem BteA naopak na základě homologií s ostatními proteiny předpokládá, že by protein BopN mohl působit jako regulační protein. Regulace by mohla probíhat buď zprostředkovaně, anebo by samotný protein BopN mohl vstupovat do eukaryotické buňky, kde by aktivoval efektor *Bordetellae*, BteA (Abe *et al.*, 2017). Vzhledem k nejasnosti funkce proteinu BopN byl v sérii pokusů tento problém řešen. Nutno podotknout, že studie z roku 2017 byla publikována až po zahájení práce na tomto projektu.

Hlavním cílem projektu, jehož částí je i tato diplomová práce je prokázat, zda je protein BopN dopravován do eukaryotických buněk v rámci bakteriální infekce. Dříve publikovaná studie Nagamatsu a kol. (2009) totiž k důkazu efektu proteinu BopN na NF-kB signální dráhu využila pouze arteficiální expresi proteinu BopN přímo v eukaryotické buňce (Nagamatsu *et al.*, 2009). Taktéž je důležité analyzovat, do jaké míry protein BopN ovlivňuje dopravu efektorového proteinu BteA do hostitelské buňky. Pro tyto studie byly navrženy a zkonstruovány dva typy reportérových systémů. První, založený na adenylát cyklázové doméně (AC) adenylát cyklázového toxinu a druhý, založený na enzymu  $\beta$ -laktamáza (TEM). Principem použití reportérového systému založeného na AC je katalytická přeměna ATP na cyklické AMP pomocí enzymu adenylát cyklázy a této přeměny může být dosaženo po aktivaci kalmodulinem, který však není produkován bakteriální buňkou. Pokud je T3SS substrátový protein fúzován s adenylát cyklázovou doménou, nedochází k tvorbě cyklického AMP v bakterii, ale až po jeho

doprově do cytozolu eukaryotické buňky. Množství přeměněného cAMP tedy reflektuje množství T3SS substrátového proteinu, který byl dopraven do cytozolu eukaryotické buňky. Reportérový systém založený na enzymu  $\beta$ -laktamáza využívá schopnosti tohoto enzymu štěpit fluorescenční substrát CCF2. Po infekci je fluorescenční substrát CCF2 vpraven do infikovaných buněk a pokud došlo rovněž k dopravě enzymu  $\beta$ -laktamázy skrze T3SS do cytozolu, výsledkem je rozdílné emisní spektrum substrátu v porovnání s neštěpeným fluorescenčním substrátem. Toto může být vizualizováno fluorescenční mikroskopií anebo kvantifikováno pomocí průtokové cytometrie. Ačkoli byl reportérový systém založený na AC používán pro *in vitro* studie, jeho použití pro analýzu translokace proteinu BopN do eukaryotické buňky bylo nad rámec této diplomové práce.

Tato diplomová práce se především zabývala regulační rolí proteinu BopN při kontrole sekrece skrze T3SS do média a rolí vápenatých iontů v této regulaci. Jak již bylo zmíněno v úvodu této diplomové práce, protein BopN je proteinovou chimérou, která je tvořena úsekem homologiím k proteinu YopN rodu *Yersiniae* a úsekem homologním k YopN chaperonu TyeA. Aminokyselinová podobnost proteinu BopN s proteinem YopN a jeho chaperonem TyeA vázajícím se na C-koncovou oblast YopN je až 60 % (Abe *et al.*, 2017). Bylo popsáno, že u rodu *Yersiniae* vápník inhibuje sekreci efektorových proteinů T3SS do média. To je dáno vlivem vápníku na proteiny komplexu tvořeného i proteinem YopN, které regulují sekreci a které jsou citlivé na přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$ . Nicméně, po delecí jakéhokoli proteinu z tohoto komplexu již k inhibici sekrece vápenatými ionty nedochází (Dewoody *et al.*, 2013). Biologická role této vápníkem zprostředkované regulace je pravděpodobně to, aby nedocházelo k předčasné sekreci efektorů T3SS v hostiteli, pokud ještě nedošlo ke kontaktu bakterie s cytoplazmatickou membránou cílové buňky. Z těchto důvodů byl studován vliv delecce proteinu BopN na sekreci T3SS do média a role přídatku 2 mM vápenatých iontů v tomto procesu.

K tomuto účelu byly použity 2 nezávislé metody: hmotnostní spektrometrie a reportérový systém založený na adenylát cyklázové doméně (AC) adenylát cyklázového toxinu, která byla fúzována se sekrečním signálem proteinu BteA (aminokyseliny 1-130), takzvaný *ssbteA-AC* reportér.

Stanovení adenylát cyklázové (AC) aktivity v supernatantu a v celé bakteriální suspenzi u kmenů  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> a  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup> s tímto reportérem *ssbteA-AC* ukázalo,

že sekrece reportéru do média se děje specificky skrze T3SS. U mutantního kmene bez ATPázy T3SS a tudíž neschopného sekrece skrze T3SS,  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup>, byla naměřena nulová AC aktivita v supernatantu, zatímco u kmene  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> AC aktivita dosahovala řádu desítek mU enzymu/ml. Zajímavé však bylo zjištění, že u kmene  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup> došlo po přidavku vápníku ke snížení procenta extracelulární AC aktivity, což koreluje se sníženou sekrecí reportéru do média. Získaná data jsou podobná jako v případě jiných rodů gram-negativních bakterií, kdy vápník inhiboval aktivitu jejich T3SS (Dewoody *et al.*, 2013). Pro zjištění role proteinu BopN na sekreci pomocí T3SS byla AC aktivita stanovena i v supernatantu kultury kmene  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> / *ssbteA*-AC. Pokud by BopN hrál roli v regulaci sekrece T3SS a jeho závislosti na vápenatých iontech, pak by se AC aktivita v supernatantu kultur  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> / *ssbteA*-AC pěstovaných v médiu bez a po přidavku 2 mM Ca<sup>2+</sup> neměla výrazně lišit. Výsledky obdržené ze tří pokusů naznačují, že po delecí genu *bopN* se vlivem vápenatých iontů sekrece do média nijak nesnížila, naopak, po přidavku vápníku docházelo ke zvýšení AC aktivity.

Použití reportérového systému pro monitorování sekrece T3SS umožnilo rychlou a snadnou kvantifikaci. Avšak reportér *ssbteA*-AC nepředstavuje přirozený biologický substrát T3SS a mohl být sekretován arteficiálně. Pozorovali jsme, že v supernatantu bakteriální kultury se nachází zhruba jen 10 % z celkového množství produkovaného reportéru. Abychom se vyhnuli ovlivnění plynoucího z použití reportéru *ssbteA*-AC a zároveň dostali komplexní vhled do regulace sekrece skrze T3SS a jeho ovlivnění vápníkem, byla rovněž použita hmotnostní spektrometrie.

Analýza hmotnostní spektrometrie odhalila, že vlivem vápenatých iontů došlo ke snížení množství proteinů BtrA/BspR, BopD a BopN v supernatantu kultury *B. bronchiseptica* divokého typu. Naopak v peletu této kultury byly detekovány zvýšené hodnoty translokátorového proteinu BopD, a částečně i proteinu BtrA/BspR, BopN. Korelace mezi supernatantem a peletem tedy vypovídá o tom, že nedošlo ke změně exprese BopD proteinu vlivem vápenatých iontů, pouze nebyl sekretován do média pomocí T3SS. Vliv vápenatých iontů na expresi proteinů BtrA/BspR a BopN je v této chvíli nejednoznačný. Bylo by nutné stanovit hladiny patřičných mRNA v peletu bakteriální kultury bez vápníku a po přidavku 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Je také možné, že v kultuře s přidavkem vápníku jsou proteiny efektivněji degradovány. Hmotnostní spektrometrie však neukázala vliv vápníku na množství efektoru BteA v supernatantu kultury divokého

typu, i když jeho množství v peletu bylo zvýšené. Při analýze kmene *B. bronchiseptica* s delecí genu *bopN* vyšlo najevo, že ke snížení množství translokátorového proteinu BopD a anti-sigma faktoru BtrA/BspR v supernatantu kultury nedochází.

Data získaná pomocí obou metod nejsou, co se týče vlivu vápníku na sekreci BteA efektoru do média zcela konsistentní. Důvodem může být to, že pro reportérový systém nebyl použit celý protein BteA vzhledem k jeho cytotoxické aktivitě, ale pouze jeho prvních 130 aminokyselin. Na druhou stranu i metoda hmotnostní spektrometrie má svá úskalí a velmi často je nazývána metodou semi-kvantitativní a nikoliv kvantitativní.

V každém případě však tato práce prokázala inhibiční účinek vápenatých iontů na aktivitu T3SS, především mobilizaci a sekreci translokázy BopD. Velmi zajímavé je také snížení množství proteinu BopN po přidavku vápenatých iontů do média. V práci byl rovněž pozorován vliv vápníku na některé další menší proteiny T3SS, takzvané na vápníku závislé chaperony T3SS, u kterých můžeme předpokládat interakci s proteinem BopN.

Pokud byl deletován gen kódující BopN, k inhibici in vitro sekrece T3SS vlivem vápenatých iontů nedocházelo. Naše výsledky tedy naznačují regulační roli proteinu BopN v sekreci T3SS.

## 7 Souhrn

- 1) Byly vytvořeny kmeny *B. bronchiseptica* D445 s delecemi genů *bopN*, *bscN* a *bteA*.
- 2) Byl navržen reportérový systém založený na kalmodulinu závislé adenylát cyklázové domény adenylát cyklázového toxinu (pBBRI AC) a reportérový systém založený na enzymu  $\beta$ -laktamáza (pBBRI TEM).
- 3) Na kalmodulinu závislá adenylátcyklázová doména (AC) adenylát cyklázového toxinu byla fúzována jako reportérový gen s prvními 130 aminokyselinami proteinu BteA a jeho promotorem za vytvoření plazmidu pBBRI *ssbteA*-AC a rovněž s proteinem BopN a jeho promotorem za vytvoření plazmidu pBBRI *bopN*-AC. Pro použití reportérového systému založeného na AC doméně byl detoxifikován adenylát cyklázový toxin bakterie *B. bronchiseptica* D445 AC<sup>-</sup>.
- 4) Regulace aktivity sekrečního systému typu 3 v médiu v závislosti na přídávku 2 mM Ca<sup>2+</sup> byla stanovena pomocí reportéru *ssbteA*-AC u kmene *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup>. Přítomnost vápníku vedla ke snížení množství detekované AC aktivity v supernatantu kultury  $\Delta bteA$  AC<sup>-</sup>, ale neovlivnila množství celkové AC aktivity v kultuře. Je důležité podotknout, že žádná AC aktivita nebyla detekována v supernatantu kultury  $\Delta bscN$  AC<sup>-</sup> / pBBRI *ssbteA*-AC, tedy kmene neschopného sekrece skrze T3SS vzhledem k delecí ATPázy T3SS. Vápenaté ionty tedy inhibují sekreci reportéru T3SS u *B. bronchiseptica*.
- 5) Dále byl zkoumán vliv vápenatých iontů na *in vitro* sekreci reportéru *ssbteA*-AC i u kmene nesoucího delecí genu *bopN* ( $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup>). Bylo zjištěno, že u kmene *B. bronchiseptica* D445  $\Delta bteA \Delta bopN$  AC<sup>-</sup> nedocházelo k inhibici sekrece reportéru po přídávku 2 mM Ca<sup>2+</sup>.
- 6) Role proteinu BopN v regulaci aktivity T3SS byla stanovena i metodou hmotnostní spektrometrie. U kmenu *B. bronchiseptica* D445 divokého typu vápenaté ionty neovlivňovaly sekreci BteA T3SS efektoru do média, avšak snižovaly množství sekretovaného translokátoru proteinu BopD, který se podílí na vytvoření translokátorového póru a rovněž proteinu BopN. U kmenu *B. bronchiseptica* D445 s delecí v genu *bopN* nebylo pozorováno snížení sekrece proteinu BopD.



7) V budoucnu bude analyzována translokace reportéru *ssbteA-AC* do eukaryotické buňky v kmeni s delecí v genu *bopN* ( $\Delta bteA \Delta bopN$  AC-) a bude srovnána s translokací tohoto reportéru z kmene ( $\Delta bteA$  AC-). Také bude detekována translokace proteinu BopN do eukaryotické buňky za použití reportérového systému založeného na AC doméně a rovněž na enzymu  $\beta$ -laktamáza (TEM).

## 8 Seznam použité literatury

- ABE, A., NISHIMURA, R. & KUWAE, A. 2017. Bordetella effector BopN is translocated into host cells via its N-terminal residues. *Microbiology and Immunology*, 61, 206-214.
- 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.
- AHUJA, U., SHOKEEN, B., CHENG, N., CHO, Y., BLUM, C., COPPOLA, G. & MILLER, J. F. 2016. Differential regulation of type III secretion and virulence genes in Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica by a secreted anti-sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 2341-8.
- AKEDA, Y. & GALAN, J. E. 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature*, 437, 911-5.
- ALMAGRO-MOLTO, M., EDER, W. & SCHUBERT, S. 2015. Bordetella trematum in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. *Infection*, 43, 489-94.
- AMIRTHALINGAM, G. 2013. Strategies to control pertussis in infants. *Arch Dis Child*, 98, 552-5.
- ANTOINE, R. & LOCHT, C. 1992. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from Bordetella bronchiseptica with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol*, 6, 1785-99.
- ARCHULETA, T. L., DU, Y., ENGLISH, C. A., LORY, S., LESSER, C., OHI, M. D., OHI, R. & SPILLER, B. W. 2011. The Chlamydia effector chlamydial outer protein N (CopN) sequesters tubulin and prevents microtubule assembly. *J Biol Chem*, 286, 33992-8.
- ARICO, B. & RAPPUOLI, R. 1987. Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol*, 169, 2847-53.
- BAMYACI, S., EKESTUBBE, S., NORDFELTH, R., ERTTMANN, S. F., EDGREN, T. & FORSBERG, A. 2018. YopN Is Required for Efficient Effector Translocation and Virulence in Yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun*, 86.
- BEMIS, D. A. & KENNEDY, J. R. 1981. An improved system for studying the effect of Bordetella bronchiseptica on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cells. *J Infect Dis*, 144, 349-57.
- BIEDERMAN, L., ROSEN, M. R., BOBIK, B. S. & ROBERTS, A. L. 2015. Bordetella petrii recovered from chronic pansinusitis in an adult with cystic fibrosis. *IDCases*, 2, 97-8.

- BOLAND, A., SORY, M. P., IRIARTE, M., KERBOURCH, M., WATTIAU, P. & CORNELIS, G. R. 1996. Status of YopM and YopN in the Yersinia Yop virulon: YopM of Yenterocolitica is internalized inside the cytosol of PU5-1.8 macrophages by the YopB, D, N delivery apparatus. *The EMBO Journal*, 15, 5191-5201.
- BOOT, R. & WALVOORT, H. C. 1986. Otitis media in guinea pigs: pathology and bacteriology. *Lab Anim*, 20, 242-8.
- BOTTEAUX, A., SORY, M. P., BISKRI, L., PARSOT, C. & ALLAOUI, A. 2009. MxiC is secreted by and controls the substrate specificity of the Shigella flexneri type III secretion apparatus. *Mol Microbiol*, 71, 449-60.
- BRADFORD, W. L. & SLAVIN, B. 1937. An Organism Resembling Hemophilus Pertussis: With Special Reference to Color Changes Produced by Its Growth Upon Certain Media. *Am J Public Health Nations Health*, 27, 1277-1282.
- BROCKMEIER, S. L. 2002. Role of the Dermonecrotic Toxin of Bordetella bronchiseptica in the Pathogenesis of Respiratory Disease in Swine. *Infection and Immunity*, 70, 481-490.
- BURNS, D. L., MEADE, B. D. & MESSIONNIER, N. E. 2014. Pertussis resurgence: perspectives from the Working Group Meeting on pertussis on the causes, possible paths forward, and gaps in our knowledge. *J Infect Dis*, 209 Suppl 1, S32-5.
- BUTTNER, D. & HE, S. Y. 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol*, 150, 1656-64.
- CAROFF, M., AUSSEL, L., ZARROUK, H., MARTIN, A., RICHARDS, J. C., THERISOD, H., PERRY, M. B. & KARIBIAN, D. 2001. Structural variability and originality of the Bordetella endotoxins. *J Endotoxin Res*, 7, 63-8.
- COBURN, B., SEKIROV, I. & FINLAY, B. B. 2007. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, 20, 535-49.
- COOKSON, B. T., TYLER, A. N. & GOLDMAN, W. E. 1989. Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of Bordetella pertussis. *Biochemistry*, 28, 1744-9.
- \*COTTER, P. A. & JONES, A. M. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in Bordetella. *Trends in Microbiology*, 11, 367-373.
- COWELL, J. L., HEWLETT, E. L. & MANCLARK, C. R. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis. *Infect Immun*, 25, 896-901.
- CREPIN, V. F., SHAW, R., ABE, C. M., KNUTTON, S. & FRANKEL, G. 2005. Polarity of enteropathogenic Escherichia coli EspA filament assembly and protein secretion. *J Bacteriol*, 187, 2881-9.

- DAXBOECK, F., GOERZER, E., APFALTER, P., NEHR, M. & KRAUSE, R. 2004. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet Med*, 21, 1247-8.
- \*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, 1665-76.
- 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, 669-83.
- \*DEWOODY, R. S., MERRITT, P. M. & MARKETON, M. M. 2013. Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front Cell Infect Microbiol*, 3, 4.
- DIAVATOPOULOS, D. A., CUMMINGS, C. A., SCHOULS, L. M., BRINIG, M. M., RELMAN, D. A. & MOOI, F. R. 2005. *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, evolved from a distinct, human-associated lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog*, 1, e45.
- 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, 1928-40.
- 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.
- ELDERING, G. & KENDRICK, P. 1938. BACILLUS PARA-PERTUSSIS: A SPECIES RESEMBLING BOTH BACILLUS PERTUSSIS AND BACILLUS BRONCHISEPTICUS BUT IDENTICAL WITH NEITHER. *J Bacteriol*, 6, 561-572.
- EMSLEY, P., MCDERMOTT, G., CHARLES, I. G., FAIRWEATHER, N. F. & ISAACS, N. W. 1994. Crystallographic characterization of pertactin, a membrane-associated protein from *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol*, 235, 772-3.
- ERSKINE, P. T., KNIGHT, M. J., RUAUX, A., MIKOLAJEK, H., WONG FAT SANG, N., WITHERS, J., GILL, R., WOOD, S. P., WOOD, M., FOX, G. C. & COOPER, J. B. 2006. High resolution structure of BipD: an invasion protein associated with the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *J Mol Biol*, 363, 125-36.
- FABIANOVA, K., ZAVADILOVA, J., SEBESTOVA, H., GASPAREK, M. & KRIZ, M. 2017. Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2016 – epidemiologická situace. *CEM SZÚ*, 3, 109-114.
- \*FEDELE, G., SCHIAVONI, I., ADKINS, I., KLIMOVA, N. & SEBO, P. 2017. Invasion of Dendritic Cells, Macrophages and Neutrophils by the *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin: A Subversive Move to Fool Host Immunity. *Toxins (Basel)*, 9.

- 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, 1257-66.
- FIELDS, K. A. & HACKSTADT, T. 2000. Evidence for the secretion of Chlamydia trachomatis CopN by a type III secretion mechanism. *Mol Microbiol*, 38, 1048-60.
- 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, 1735-49.
- FRY, N. K., DUNCAN, J., MALNICK, H., WARNER, M., SMITH, A. J., JACKSON, M. S. & AYOUB, A. 2005. Bordetella petrii clinical isolate. *Emerg Infect Dis*, 11, 1131-3.
- 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, 3677-82.
- GAL, AACUTE & N, J. E. 1999. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science*, 284, 1322-1328.
- 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, 415-38.
- GLASER, P., ELMAOGLU-LAZARIDOU, A., KRIN, E., LADANT, D., BARZU, O. & DANCHIN, A. 1989. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in Bordetella pertussis adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J*, 8, 967-72.
- GLASER, P., LADANT, D., SEZER, O., PICHOT, F., ULLMANN, A. & DANCHIN, A. 1988. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of Bordetella pertussis: cloning and expression in Escherichia coli. *Mol Microbiol*, 2, 19-30.
- 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, 782-94.
- GOODNOW, R. A. 1980. Biology of Bordetella bronchiseptica. *Microbiol Rev*, 44, 722-38.
- 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.
- GRAF, R., MATTERA, R., CODINA, J., ESTES, M. K. & BIRNBAUMER, L. 1992. A truncated recombinant alpha subunit of Gi3 with a reduced affinity for beta gamma dimers and altered guanosine 5'-3-O-(thio)triphosphate binding. *J Biol Chem*, 267, 24307-14.

- GUERMONPREZ, P., KHELEF, N., BLOUIN, E., RIEU, P., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., GUIISO, 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, 1035-44.
- \*GUIISO, N. 2014. *Bordetella pertussis*: why is it still circulating? *J Infect*, 68 Suppl 1, S119-24.
- 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.
- 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. & GUIISO, 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.
- HEININGER, U., STEHR, K., SCHMITT-GROHE, S., LORENZ, C., ROST, R., CHRISTENSON, P. D., UBERALL, M. & CHERRY, J. D. 1994. Clinical characteristics of illness caused by *Bordetella parapertussis* compared with illness caused by *Bordetella pertussis*. *Pediatr Infect Dis J*, 13, 306-9.
- 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*, 8, 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, 17351-5.
- HERROU, J., DEBRIE, A. S., WILLERY, E., RENAULD-MONGENIE, G., LOCHT, C., MOOI, F., JACOB-DUBUISSON, F. & ANTOINE, R. 2009. Molecular evolution of the two-component system BvgAS involved in virulence regulation in *Bordetella*. *PLoS One*, 4, e6996.
- HSIA, R. C., PANNEKOEK, Y., INGEROWSKI, E. & BAVOIL, P. M. 1997. Type III secretion genes identify a putative virulence locus of *Chlamydia*. *Mol Microbiol*, 25, 351-9.
- HU, B., LARA-TEJERO, M., KONG, Q., GALAN, J. E. & LIU, J. 2017. In Situ Molecular Architecture of the *Salmonella* Type III Secretion Machine. *Cell*, 168, 1065-1074 e10.

- CHENG, L. W., KAY, O. & SCHNEEWIND, O. 2001. Regulated Secretion of YopN by the Type III Machinery of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Bacteriology*, 183, 5293-5301.
- INATSUKA, C. S., JULIO, S. M. & COTTER, P. A. 2005. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18578-83.
- IVANOV, Y. V., LINZ, B., REGISTER, K. B., NEWMAN, J. D., TAYLOR, D. L., BOSCHERT, K. R., LE GUYON, S., WILSON, E. F., BRINKAC, L. M., SANKA, R., GRECO, S. C., KLENDER, P. M., LOSADA, L. & HARVILL, E. T. 2016. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66, 5452-5459.
- 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, 1015-24.
- JOURNET, L., AGRAIN, C., BROZ, P. & CORNELIS, G. R. 2003. The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science*, 302, 1757-60.
- 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, 3727-32.
- KATADA, T., TAMURA, M. & UI, M. 1983. The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Arch Biochem Biophys*, 224, 290-298.
- KATZENSTEIN, D. A., CIOFALO, L. & JORDAN, M. C. 1984. *Bordetella bronchiseptica* bacteremia. *West J Med*, 140, 96-98.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-84.
- KERSTERS, K., HINZ, K. H., HERTLE, A., SEGERS, P., LIEVENS, A., SIEGMANN, O. & DE LEY, J. 1984. *Bordetella avium* sp. nov., Isolated from the Respiratory Tracts of Turkeys and Other Birds. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 56-70.
- KHELEF, N., BACHELET, C. M., VARGAFTIG, B. B. & GUISO, N. 1994. Characterization of murine lung inflammation after infection with parental *Bordetella pertussis* and mutants deficient in adhesins or toxins. *Infect Immun*, 62, 2893-900.
- KO, K. S., PECK, K. R., OH, W. S., LEE, N. Y., LEE, J. H. & SONG, J. H. 2005. New species of *Bordetella*, *Bordetella ansorpii* sp. nov., isolated from the purulent exudate of an epidermal cyst. *J Clin Microbiol*, 43, 2516-9.

- KOTOB, S. I., HAUSMAN, S. Z. & BURNS, L. D. 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.
- KOZAK, N. A., MATTOO, S., FOREMAN-WYKERT, A. K., WHITELEGGE, J. P. & MILLER, J. F. 2005. Interactions between partner switcher orthologs BtrW and BtrV regulate type III secretion in *Bordetella*. *J Bacteriol*, 187, 5665-76.
- 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, 6589-600.
- KUWAE, A., OHISHI, M., WATANABE, M., NAGAI, M. & ABE, A. 2003. BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. *Cellular Microbiology*, 5, 973-983.
- LADANT, D., BREZIN, C., ALONSO, J. M., CRENON, I. & GUIISO, N. 1986. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Purification, characterization, and radioimmunoassay. *J Biol Chem*, 261, 16264-9.
- LARA-TEJERO, M., KATO, J., WAGNER, S., LIU, X. & GALAN, J. E. 2011. A sorting platform determines the order of protein secretion in bacterial type III systems. *Science*, 331, 1188-91.
- LEFEBRE, 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, 817-22.
- 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, 489-97.
- \*LOCHT, C. & MIELCAREK, N. 2012. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol Med Microbiol*, 66, 121-33.
- M'GOWAN, J. P. 1911. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats, in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper". *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 15, 372-426.
- MAGYAR, T., CHANTER, N., LAX, A. J., RUTTER, J. M. & HALL, G. A. 1988. The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Microbiol*, 18, 135-46.
- MAJEWSKI, L. L., NOGI, M., BANKOWSKI, M. J. & CHUNG, H. H. 2016. *Bordetella trematum* sepsis with shock in a diabetic patient with rapidly developing soft tissue infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 86, 112-4.



- MARLOVITS, T. C., KUBORI, T., LARA-TEJERO, M., THOMAS, D., UNGER, V. M. & GALAN, J. E. 2006. Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome. *Nature*, 441, 637-40.
- 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, 1040-2.
- MARTINEZ-ARGUDO, I. & BLOCKER, A. J. 2010. The Shigella T3SS needle transmits a signal for MxiC release, which controls secretion of effectors. *Mol Microbiol*, 78, 1365-78.
- MASIN, J., RODEROVA, J., OSICKOVA, A., NOVAK, P., BUMBA, L., FISER, R., SEBO, P. & OSICKA, R. 2017. The conserved tyrosine residue 940 plays a key structural role in membrane interaction of Bordetella adenylate cyclase toxin. *Sci Rep*, 7, 9330.
- MASTRANTONIO, P., STEFANELLI, P., GIULIANO, M., HERRERA ROJAS, Y., CIOFI DEGLI ATTI, M., ANEMONA, A. & TOZZI, A. E. 1998. Bordetella parapertussis infection in children: epidemiology, clinical symptoms, and molecular characteristics of isolates. *J Clin Microbiol*, 36, 999-1002.
- MATSUZAWA, T., FUKUI, A., KASHIMOTO, T., NAGAO, K., OKA, K., MIYAKE, M. & HORIGUCHI, Y. 2004. Bordetella dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem*, 279, 2866-72.
- \*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, 326-82.
- MAZAR, J. & COTTER, P. A. 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol*, 62, 641-54.
- 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.
- MELTON, A. R. & WEISS, A. A. 1993. Characterization of environmental regulators of Bordetella pertussis. *Infect Immun*, 61, 807-15.
- \*MELVIN, J. A., SCHELLER, E. V., MILLER, J. F. & COTTER, P. A. 2014. Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nat Rev Microbiol*, 12, 274-88.
- MERKEL, T. J. & STIBITZ, S. 1995. Identification of a locus required for the regulation of bvg-repressed genes in Bordetella pertussis. *J Bacteriol*, 177, 2727-36.

- MULLER, S. A., POZIDIS, C., STONE, R., MEESTERS, C., CHAMI, M., ENGEL, A., ECONOMOU, A. & STAHLBERG, H. 2006. Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol*, 61, 119-25.
- 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, 3073-88.
- NAGATA, J. M., CHARVILLE, G. W., KLOTZ, J. M., WICKREMASINGHE, W. R., KANN, D. C., SCHWENK, H. T. & LONGHURST, C. A. 2015. Bordetella petrii sinusitis in an immunocompromised adolescent. *Pediatr Infect Dis J*, 34, 458.
- 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.
- NICHOLSON, T. L., BROCKMEIER, S. L., LOVING, C. L., REGISTER, K. B., KEHRLI, M. E., JR. & SHORE, S. M. 2014. The Bordetella bronchiseptica type III secretion system is required for persistence and disease severity but not transmission in swine. *Infect Immun*, 82, 1092-103.
- 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, 3806-13.
- 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, 267-79.
- PAPASIAN, C. J., DOWNS, N. J., TALLEY, R. L., ROMBERGER, D. J. & HODGES, G. R. 1987. Bordetella bronchiseptica bronchitis. *J Clin Microbiol*, 25, 575-577.
- PARKHILL, J., SEBAIHIA, M., PRESTON, A., MURPHY, L. D., THOMSON, N., HARRIS, D. E., HOLDEN, M. T., CHURCHER, C. M., BENTLEY, S. D., MUNGALL, K. L. *et al.* 2003. Comparative analysis of the genome sequences of Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella bronchiseptica. *Nat Genet*, 35, 32-40.
- \*PLANO, G. V. & SCHESSER, K. 2013. The Yersinia pestis type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol Res*, 57, 237-45.
- PORTER, J. F., CONNOR, K. & DONACHIE, W. 1994. Isolation and characterization of Bordetella parapertussis-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology*, 140 ( Pt 2), 255-61.
- PROOM, H. 1955. The minimal nutritional requirements of organisms of the genus Bordetella Lopez. *J Gen Microbiol*, 12, 63-75.

- QUACKENBUSH, J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet*, 32 Suppl, 496-501.
- RADICS, J., KONIGSMAIER, L. & MARLOVITS, T. C. 2014. Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nat Struct Mol Biol*, 21, 82-7.
- REGISTER, K. B. & KUNKLE, R. A. 2009. Strain-specific virulence of *Bordetella hinzii* in poultry. *Avian Dis*, 53, 50-4.
- ROSQVIST, R., MAGNUSSON, K. E. & WOLF-WATZ, H. 1994. Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia YopE* cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J*, 13, 964-972.
- SEYDLOVA, G., BERANOVA, J., BIBOVA, I., DIENSTBIER, A., DRZMISEK, J., MASIN, J., FISER, R., KONOPASEK, I. & VECEREK, B. 2017. The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J Biol Chem*, 292, 8048-8058.
- SHEPARD, C. W., DANESHVAR, M. I., KAISER, R. M., ASHFORD, D. A., LONSWAY, D., PATEL, J. B., MOREY, R. E., JORDAN, J. G., WEYANT, R. S. & FISCHER, M. 2004. *Bordetella holmesii* bacteremia: a newly recognized clinical entity among asplenic patients. *Clin Infect Dis*, 38, 799-804.
- SCHELLER, E. V., MELVIN, J. A., SHEETS, A. J. & COTTER, P. A. 2015. Cooperative roles for fimbria and filamentous hemagglutinin in *Bordetella* adherence and immune modulation. *MBio*, 6, e00500-15.
- 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.
- SCHOENE, C., FIERER, J. O., BENNETT, S. P. & HOWARTH, M. 2014. SpyTag/SpyCatcher cyclization confers resilience to boiling on a mesophilic enzyme. *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 6101-4.
- 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, 4647-52.
- 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. *The Journal of Immunology*, 173, 1934-1940.
- SORY, M. P. & CORNELIS, G. R. 1994. Translocation of a Hybrid Yope-Adenylate Cyclase from *Yersinia-Enterocolitica* into Hela-Cells. *Molecular Microbiology*, 14, 583-594.

- STIBITZ, S. & YANG, M. S. 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*, 173, 4288-96.
- STOLL, D. B., MURPHEY, S. A. & BALLAS, S. K. 1981. *Bordetella bronchiseptica* infection in stage IV Hodgkin's disease. *Postgrad Med J*, 57, 723-4.
- SUKHAN, A., KUBORI, T., WILSON, J. & GALAN, J. E. 2001. Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex. *J Bacteriol*, 183, 1159-67.
- 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, 5516-22.
- TAZATO, N., HANDA, Y., NISHIJIMA, M., KIGAWA, R., SANO, C. & SUGIYAMA, J. 2015. Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: *Bordetella muralis* sp. nov., *Bordetella tumulicola* sp. nov. and *Bordetella tumbae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65, 4830-8.
- 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, 1163-7.
- VANDAMME, P., HEYNDRIKX, M., VANCANNEYT, M., HOSTE, B., DE VOS, P., FALSEN, E., KERSTERS, K. & HINZ, K. H. 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol*, 46, 849-58.
- VANDAMME, P., HOMMEZ, J., VANCANNEYT, M., MONSIEURS, M., HOSTE, B., COOKSON, B., WIRSING VON KONIG, C. H., KERSTERS, K. & BLACKALL, P. J. 1995. *Bordetella hinzii* sp. nov., isolated from poultry and humans. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 37-45.
- VANDAMME, P. A., PEETERS, C., CNOCKAERT, M., INGANAS, E., FALSEN, E., MOORE, E. R., NUNES, O. C., MANAIA, C. M., SPILKER, T. & LIPUMA, J. J. 2015. *Bordetella bronchialis* sp. nov., *Bordetella flabilis* sp. nov. and *Bordetella sputigena* sp. nov., isolated from human respiratory specimens, and reclassification of *Achromobacter sediminum* Zhang et al. 2014 as *Verticia sediminum* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65, 3674-82.
- 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, 2761-7.

- VIPREY, V., DEL GRECO, A., GOLINOWSKI, W., BROUGHTON, W. J. & PERRET, X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol Microbiol*, 28, 1381-9.
- VON WINTZINGERODE, F., SCHATTKE, A., SIDDIQUI, R. A., ROSICK, U., GOBEL, U. B. & GROSS, R. 2001. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1257-65.
- WANG, F., GRUNDMANN, S., SCHMID, M., DORFLER, U., ROHERER, S., CHARLES MUNCH, J., HARTMANN, A., JIANG, X. & SCHROLL, R. 2007. Isolation and characterization of 1,2,4-trichlorobenzene mineralizing *Bordetella* sp. and its bioremediation potential in soil. *Chemosphere*, 67, 896-902.
- WARFEL, J. M., ZIMMERMAN, L. I. & MERKEL, T. J. 2014. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 787-92.
- 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.
- WEYANT, R. S., HOLLIS, D. G., WEAVER, R. E., AMIN, M. F., STEIGERWALT, A. G., O'CONNOR, S. P., WHITNEY, A. M., DANESHVAR, M. I., MOSS, C. W. & BRENNER, D. J. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol*, 33, 1-7.
- WILLEMS, R., PAUL, A., VAN DER HEIDE, H. G., TER AVEST, A. R. & MOOI, F. R. 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J*, 9, 2803-9.
- WILLEMS, R. J., VAN DER HEIDE, H. G. & MOOI, F. R. 1992. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Mol Microbiol*, 6, 2661-2671.
- WOOLFREY, B. F. & MOODY, J. A. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clin Microbiol Rev*, 4, 243-55.
- YEUNG, K. H. T., DUCLOS, P., NELSON, E. A. S. & HUTUBESSY, R. C. W. 2017. An update of the global burden of pertussis in children younger than 5 years: a modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17, 974-980.
- \*YONEKURA, K., MAKI-YONEKURA, S. & NAMBA, K. 2002. Growth mechanism of the bacterial flagellar filament. *Res Microbiol*, 153, 191-7.
- 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, 945-59.

**Symbolem \* jsou značena review**