

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismu

Studijní obor: Speciální chemicko-biologické obory



Kateřina Fejková

Životní strategie fakultativně vnitrobuněčných patogenních bakterií

Life strategy of facultatively intracellular pathogenic bacteria

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Petra Lišková, Ph.D.

Praha, 2019

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, 10. 5. 2019

.....

Fejková Kateřina

Poděkování

Děkuji své školitelce RNDr. Petře Liškové, Ph.D. za ochotu, rady, trpělivost, se kterou mi odpovídala na všemožné otázky a hlavně za čas, který mi věnovala.

Abstrakt

Fakultativní vnitrobuněčné patogeny si vyvinuly schopnost růst a přežít mimo i uvnitř buňky, což jim dává selektivní výhodu, lepší přístup k živinám, ochranu před extracelulárními složkami imunitního systému a nestálými podmínkami mimo buňku. Bakterie *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes* se umí ubránit prvotním obranným reakcím imunitního systému, vstoupit dovnitř makrofágů i neprofesionálních fagocytů jako jsou například hepatocyty či endotel, předejít baktericidním procesům ve fagosomu, rozmnožit se v cytosolu a poté vzdorovat procesům buněčné smrti dokud samy nejsou připraveny infikovanou buňku opustit a napadnout další buňky. Toto přemístění mezi buňkami používá *Listeria monocytogenes* G-aktin hostitelské buňky, zatímco u bakterie *Francisella tularensis* není mechanismus zcela jasný. Popis mechanismu těchto procesů u patogenů *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes* je předmětem této bakalářské práce.

Klíčová slova: bakteriální patogen, fakultativní, vnitrobuněčný, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*

Abstract

Facultative intracellular pathogens have the ability to grow and survive inside and also outside of cell. This is giving them a selective advantage and also better access to nutrients, protection from extracellular components of immune system and variable conditions outside of the cell. Bacteria *Francisella tularensis* and *Listeria monocytogenes* are able to resist the defence mechanisms of immune system, enter the macrophages and non-professional phagocytes for example hepatocytes or endothelium, prevent bactericidal processes in phagosome, replicate in cytosol and resist cell death processes until they are ready to leave the infected cell and spread to another cell. For this displacement between cells is *Listeria monocytogenes* using actin, whereas in *Francisella tularensis* the mechanism is not entirely clear. The description of the mechanism of these processes in pathogens *Francisella tularensis* and *Listeria monocytogenes* is the subject of this bachelor thesis.

Key words: bacterial pathogen, facultative, intracellular, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*

Obsah

Abstrakt	V
Obsah.....	VI
Seznam použitých zkratk.....	VIII
I. Úvod	- 1 -
II. Patogenita a virulence.....	- 3 -
III. Regulace virulenčních faktorů.....	- 5 -
IV. <i>Francisella tularensis</i>	- 6 -
1. Tularémie	- 7 -
2. Rozpoznání prostředí.....	- 8 -
3. Rozpoznání <i>F. tularensis</i> imunitním systémem.....	- 8 -
4. Životní cyklus.....	- 9 -
A. Vněbuněčná fáze životního cyklu a rezervoár v hostiteli.....	- 9 -
B. Vnitrobuněčná fáze životního cyklu	- 9 -
4.1. Vstup do fagocytující buňky	- 10 -
4.1.1. Komplement	- 10 -
4.2. Vnitrobuněčné prostředí.....	- 11 -
4.2.1. Blokace NADPH oxidázy.....	- 12 -
4.3. Replikace v cytosolu	- 12 -
4.4. Buněčná smrt	- 13 -
4.4.1. Autofagie	- 13 -
V. <i>Listeria monocytogenes</i>	- 14 -
1. Listerióza.....	- 14 -
2. Rozpoznání prostředí.....	- 15 -
3. Rozpoznání <i>L. monocytogenes</i> imunitním systémem	- 16 -
4. Životní cyklus.....	- 16 -
A. Vněbuněčná fáze	- 16 -

B.	Vnitrobuněčná fáze	- 16 -
4.1.	Vstup do buňky	- 17 -
4.2.	Vnitrobuněčné prostředí.....	- 18 -
4.3.	Replikace v cytosolu	- 18 -
4.4.	Buněčná smrt	- 18 -
4.4.1.	Autofagie	- 19 -
4.5.	Mezibuněčné šíření	- 20 -
VI.	Závěr.....	- 21 -
VII.	Seznam použité literatury	- 23 -

Seznam použitých zkratk

Řazeno dle výskytu v textu

ID₅₀ ... infective dose, infekční dávka mikroorganismu, které vyvolá onemocnění u 50 %
vystavených jedinců

IL-1 ... interleukin

TNF ... „tumor necrosis factor“

ATP ... adenosintrifosfát

BvgAS ... dvoukomponentový systém bakterie *Bordetella pertussis*

BvgS ... senzorová kináza dvoukomponentového systému bakterie *Bordetella pertussis*

BvgA ... regulátor dvoukomponentového systému bakterie *Bordetella pertussis*

RpoH (σ^{32}) ... sigma faktor bakterie *Vibrio cholerae*

agr ... místo genu kódujícího AIP

AIP ... „autoinducing peptide“, přítomnost peptidu zvyšuje jeho další expresi

TSST ... „toxic shock syndrome toxin“, toxin vyvolávající syndrom toxického šoku

CHAB ... „cysteine heart“ agar pro kultivaci *Francisella tularensis*

TGBA ... „thioglycollate – glucose blood agar“ pro kultivaci *Francisella tularensis*

BCYE ... „buffered charcoal yeast extract“ pro kultivaci *Francisella tularensis*

cELISA ... „the capture enzyme-linked immunosorbent assay“, imunologická metoda na detekci
antigenů

mAb ... antigen specifický pro lipopolysacharid bakterie *Francisella tularensis*

PCR ... polymerázová řetězová reakce, molekulární metoda detekce specifické sekvence

16S RNA ... složka malé podjednotky ribozomu

LPS ... lipopolysacharid

LVS ... „live vaccine strain“, živý vakcinační kmen

FPI ... „*Francisella* pathogenity islands“, ostrov patogenity bakterie *Francisella tularensis*

KpdD ... senzorová kináza dvoukomponentového systému bakterie *Francisella tularensis*

PmrA ... regulátor dvoukomponentového systému bakterie *Francisella tularensis*

NF- κ B ... „nuclear factor kappa B“

I κ B ... „inhibitor kappa B“

TLR ... „Toll-like receptor“, receptor podobný genu Toll

NLR ... „NOD-like receptor“, cytosolický receptor

PAMPs ... „pathogen-associated molecular patterns“

IgIC ... protein sekretován sekretorickou dráhou VI typu

VgrG ... protein sekretován sekretorickou dráhou VI typu

CD35 ... receptor komplementu, pro vstup do buňky opsonizovaných patogenů

Fc γ ... receptor opsonizovaných patogenů pro vstup do buňky

FCP ... „*Francisella*-containing phagosome“, organela obsahující bakterii *Francisella tularensis*

ROS ... „reactive oxygen species“, reaktivní formy kyslíku

gp91^{phox}, gp22^{phox} ... membránové proteiny NADPH oxidázy

p47^{phox}, p40^{phox} ... cytosolické podjednotky NADPH oxidázy

fevR ... „*Francisella* effector of virulence regulation“, regulátor virulence

PI3K / Akt ... fosfatidilinositolová kináza 3.třídy / protein kináza B, tvorba fagoforu

ATG12, ATG5 a ATG8 ... faktory nutné pro autofagosom

LLO ... listeriolysin O, porotvorný cytolisin, virulenční faktor

ActA ... „actin based intercellular motility“, virulenční faktor

ATB ... antibiotika

LisRK ... dvoukomponentovým systémem bakterie *Listeria monocytogenes*

CheA ... senzorovým protein LisRK pro chemotaxi

CheY... regulátorem LisRK pro chemotaxi

PrfA ... transkripční regulátor virulenčních faktorů

INF ... interferon,

CD8, CD4 ... povrchové bílkoviny na T-lymfocytech

HMC ... „Major histoncompatibility complex“, glykoproteiny na povrchu buněk rozpoznávající cizí struktury

InlA, InlB ... internaliny, virulenční faktor pro vstup do buněk

Met ... tyrosin kináza

HGF ... „hepatocyte growth factor“

LRR ... „leucine-rich repeats“, repetice bohaté na leucin

Src ... tyrosin protein kináza

Arp2/3 komplex ... komplex proteinů regulujících polymeraci aktinu

Clb ... ubikvitin-ligáza

InlK ... intrnalin, virulenční faktor

MVP ... „Major vault protein“, cytoplazmatická částí ribonukleoproteinu

RIPK3 ... „Receptor interacting serine/threonine- protein kinase 3“, enzym a komponent TNF a vyvolává apoptózu a nekrózu

IRF3 ... „Interferon regulating factor“

I. Úvod

Organismy jsou ovlivněny podmínkami, které jsou v prostředí, ve kterém se vyskytují a zároveň jsou ovlivněny i vzájemnými vztahy s ostatními organismy sdílejícími toto prostředí. Tyto vztahy označujeme jako symbiotické a můžeme je rozlišit na mutualistické, komenzální a patogenní. (Dimijian, 2000) Zatímco u komensalismu se jedná o neutrální vztah mezi dvěma živými organismy, kdy jeden organismus má ze vztahu prospěch, ale druhý není nijak nebo je jen málo ovlivněn, tak v případě mutualismu je vztah užitečný oběma symbiontům. Mutualistické vztahy hrály velkou roli v evoluci, kdy před cca 1,5 miliardou let došlo k endocytóze jedné buňky druhou a tím i vzniku prvních organel. Mutualistickým spojením sil bakterií a eukaryot umožnilo bakteriím využívat více zdrojů pro získání látek potřebných k životu a hostitelský organismus tímto vztahem benefituje možností, jak získat metabolity, které jinak neumí vyrábět (například výroba vitamínu K bakteriální mikroflórou ve střevěch, (Rowland et al., 2018)). Příkladem mutualismu rostlin a bakterií může být vztah mezi luštěninami a gramnegativní bakterií *Rhizobium*, která fixuje dusík (Black et al., 2012), a příkladem z živočišné říše může být vztah mezi přežvýkavci a rodem gramnegativní bakterií *Bacterioides*, která jim dala možnost zpracovat celulózu jakožto zdroje živin. (Wexler, 2007)

O parazitickém vztahu mluvíme ve chvíli, kdy jeden partner má prospěch na úkor druhého partnera. Patogenní bakterie, jak jsou paraziticky žijící bakterie nazývány, mohou využívaný organismus poškodit nebo i zabít. Z ekologického pohledu je i patogenita důležitou evoluční událostí, kdy se oba organismy přizpůsobují selekčnímu tlaku, kterým na sebe působí.

Ve své práci se budu zabývat fakultativně intracelulárními bakteriemi, které spolu s obligátně intracelulárními bakteriemi patří mezi primární patogeny, které jsou schopné vyvolat onemocnění i u zdravých jedinců. Fakultativně intracelulární bakterie, jsou flexibilnější na prostředí, ve kterém se mohou rozmnožovat a umí dokončit životní cyklus vně i uvnitř buňky. (Moulder, 1985) Oproti tomu obligátní intracelulární parazité se mohou množit pouze uvnitř buněk, například gramnegativní bakterie *Rickettsia prowazekii* způsobující skvrnitý tyfus. (Badiaga and Brouqui, 2012) Druhou skupinou jsou oportunní patogeny, které vyvolávají onemocnění u jedinců s oslabenou imunitou. Většinou se jedná o bakterie přirozeně se nacházející v našem organismu. Oportunním patogenem je například grampozitivní *Staphylococcus aureus*, který se přirozeně vyskytuje na kůži a sliznicích, ale zároveň patří mezi nejčastější původce pooperačních infekcí. (Chambers, 2001)

Cílem práce je shrnout a porovnat životní a infekční cyklus u fakultativně vnitrobuněčných patogenů *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes*, jakožto původců lidských onemocnění.

II. Patogenita a virulence

Patogenita je schopnost patogenů vyvolat onemocnění u hostitele a mezi její faktory patří přenosnost, invazivita a toxicita. Virulence je míra patogenity a mezi její faktory patří adheziny, invaziny, impendiny, moduliny. (Casadevall and Pirofski, 1999)

Patogeny musí kolonizovat hostitele, dostat se do prostředí, kde jsou schopni se rozmnožit a poté se šířit dál. Pro fakultativně intracelulární bakterie je výhodnější se dostat dovnitř hostitelské buňky, kde jsou chráněny před složkami imunitního systému a mají lepší přístup k živinám.

Přenosnost bakterie je dána potřebnou infekční dávkou, při které je bakterie schopná vyvolat onemocnění. Značí se ID_{50} („infective dose“), udává množství buněk mikroba na zvíře, kdy je alespoň 50 % nemocných.

Invazivita je schopnost patogenu vstoupit do organismu a dělí se na několik částí. Nejdříve se bakterie musí přichytit na hostitelskou buňku. Tento proces zvaný adheze je zprostředkován povrchovými strukturami bakterií a dělíme ji na specifickou a nespecifickou. Nejdříve nastane vratná nespecifická adheze, která probíhá na základě elektrostatických či hydrofobních interakcí. Poté nastane nevratná specifická adheze probíhající pomocí fimbrií, proteinových struktur na povrchu bakterie, které mají na svých koncových částech specifické adhezivní molekuly (Wilson, 2002), které určují vazebnou specifitu. Příkladem mohou sloužit pili IV typu, které zprostředkovávají nejen adhezi, ale i určitý způsob pohybu směrem k buňce a tím i zlepšení kontaktu s hostitelskou buňkou. (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006) Mezi adheziny patří také pouzdro bakterií, například u *Streptococcus pneumoniae*. (Oswald a Avery a Dubos 1931) Dalším krokem vnitrobuněčných patogenů je průnik do hostitelské buňky. Invaze může probíhat jedním ze způsobů endocytózy („trigger mechanismus“ *Salmonella enterica* (Cossart and Helenius, 2014)), přímo pomocí povrchových receptorů (*Yersinia spp.* (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006)) nebo translokací proteinů do hostitelského cytosolu, kde vyvolají změnu plazmatické membrány a bakterie jsou pohlceny (*Shigella spp.* (Pizarro-Cerdá a Cossart 2006)). Některé bakterie přežívají uvnitř fagocytujících buněk imunitního systému, kdy si je například makrofág sám pohltí (*Mycobacterium tuberculosis* (Cossart and Helenius, 2014)).

Bakterie, které se dokázaly pomnožit uvnitř buňky, a to buď v cytosolu (*Rickettsia rickettsii* (Wilson, 2002)), vakuole nebo fagolysosomu (*Coxiella burnetti* (Wilson, 2002)) se poté musí šířit k další buňkám a na to mají několik cest. Bakterie mohou buňky lyzovat (*Chlamidia trachomatis* (Wilson, 2002)), takže velké množství bakterií je vypuštěno do extracelulárního

prostoru, kde napadají další buňky, nebo pomocí invaginace, kdy membrána napadené buňky fúzuje s membránou zdravé buňky a tvoří se váčky plné bakterií (*Brucella spp* (Wilson 2002)). Další způsob si vytvořily bakterie žijící v makrofázích (*Salmonella thyphimurium* (Wilson, 2002)), kteří jsou využiti k transportu v krevním řečišti nebo lymfě.

Posledním faktorem patogenity jsou toxiny, látky poškozující hostitele. Toxiny dělíme na exotoxiny a endotoxiny. Exotoxiny vypouštějí bakterie do svého okolí v průběhu svého růstu a mohou mít různé účinky na buňku, od rozrušování hostitelské membrány, přes změnu fyziologie buněk až po jejich lýzi. (Pollack et al., 1977) Endotoxin je součástí buněčné stěny gramnegativních bakterií. Nejznámějším endotoxinem je lipopolysacharid LPS, který indukuje tvorbu cytokinů IL-1 a TNF, což vede ke zvýšení horečky. Vysoké dávky tohoto toxinu vyvolávají endotoxický šok, který může vést až ke smrti hostitele. (Lüderitz et al. 1978) (Galanos and Freudenberg, 1993)

III. Regulace virulenčních faktorů

Patogen používá různé regulační mechanismy, aby se přizpůsobil měnícím se podmínkám nejen v napadeném hostiteli (změny teploty, pH...).

Nejjednodušším systémem přenosu informace o prostředí v jakém se bakterie nachází, je dvoukomponentový systém. Obecně se dvoukomponentové systémy skládají ze senzoru-senzorové kinázy a regulačního proteinu. Senzor rozpozná signál, aktivuje tak kinázu, ta autofosforyluje histidinový zbytek na fosfotransferázové doméně, takže přenesou fosfátovou skupinu z ATP na histidinový zbytek a poté je fosfátová skupinu znovu přenesena, tentokrát na aspartát regulačního proteinu. Regulační protein je často transkripčním aktivátorem, takže dochází ke změně transkripce a úpravě produktu dle signálu. (Uhl and Miller, 1996) Kupříkladu u *Bordetella pertussis* je dvoukomponentový systém nazýván BvgAS a je ovlivňován environmentálními změnami, například nízkou teplotou. Kódován je lokusem *bvg* (Arico et al., 1989), senzorová kináza se nazývá BvgS a regulátor BvgA. (Uhl and Miller, 1994)

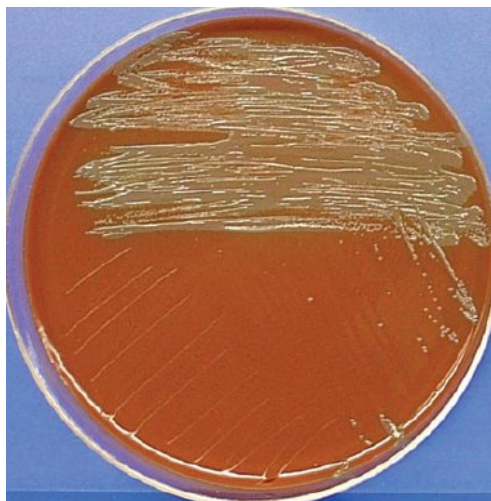
Dalším způsobem regulace je pomocí sigma faktorů. Sigma faktory jsou proteiny přítomné na promotorech a regulujících iniciaci transkripce jsou u prokaryot důležitým mechanismem regulace genové exprese. Různé promotory, včetně těch pro virulenční faktory, jsou obsazeny různými sigma faktory. Například gramnegativní bakterie *Vibrio cholerae* má svůj virulenční faktor RpoH (σ^{32}) regulovaný změnou teploty. (Parsot and Mekalanos, 1990)

Speciální způsob rozpoznání signálů z prostředí je „quorum sensing“ (QS) systém, což je typ buněčné komunikace, kterou patogeny koordinují expresi virulenčních faktorů či tvorbu biofilmu. (Castillo-Juárez et al., 2015) N-acyl homoserin laktony jsou signálem a proteiny R jsou senzory a zároveň transkripční aktivátory. (Paldrychová 2017) Například u *Staphylococcus aureus* *agr* lokus kóduje AIP („autoinducing peptide“). Přítomnost tohoto proteinu podporuje jeho další produkci a zároveň produkci virulenčních faktorů, jako jsou například hemolysin α nebo TSST („toxic shock syndrome toxin“). (Novick and Geisinger, 2008)

IV. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis je opouzdřený, gramnegativní, nepohyblivý, nesporulující kokobacil a aerobní fakultativně vnitrobuněčný patogen (Clemens et al., 2004) způsobující onemocnění zvané tularémie. (McCoy 1911) Pouhých 10 buněk *F. tularensis* v organismu je schopných vyvolat onemocnění. (Saslaw, 1961) Od roku 1950 je na seznamu potenciálně biologických zbraní. (Dennis et al., 2001) Existuje pět poddruhů, které se liší výskytem, virulencí a vektory, které je přenášejí. *F. tularensis tularensis* neboli typ A se vyskytuje v USA a je nejvíce virulentní. Přenáší se skrze klíšťata nebo vdechnutím aerosolu obsahujícím bakterie. (Jones et al., 2005) *F. tularensis holarctica* neboli typ B se vyskytuje v Eurasii a Severní Americe a řadí se mezi vodou šířící se nemoci. (Olsufjev, 1986) *F. tularensis mediasistica* byla objevena pouze v Kazachstánu a Turkmenistánu a u lidí nemoc nevyvolává. (Olsufjev, 1986) *F. novicida* je nízké virulence, onemocnění vyvolává u oslabených pacientů. Objevena byla ve vodě v Kanadě, Austrálii a Španělsku. (Hollis, Moss, a Brenner, 1989) *F. philomiragia* je stejně jako *F. novicida* nízké virulence a vyvolává onemocnění u oslabených pacientů. Vyskytuje se ve slaných vodách. (Friis-Moller et al., 2004)

Francisella tularensis lze kultivovat na „cysteine heart“ agaru obohaceném o beraní krev (CHAB). Po 48 hodinové kultivaci má *Francisella* na tomto agaru hutné, 2 – 4 mm velké kolonie a zelenobílé barvy. (Obr. 1) (Tärnvik and Weltgesundheitsorganisation, 2007) Dále může růst na TGBA („thioglycollate – glucose blood agar“) nebo BCYE („buffered charcoal yeast extract“). (Tärnvik and Weltgesundheitsorganisation, 2007)



Obrázek 1: *Francisella tularensis* po 48 hodinové inkubaci na CHAB mediu, (Tärnvik a Weltgesundheitsorganisation 2007)

Přítomnost bakterie v organismu můžeme detekovat antigenními nebo molekulárně biologickými metodami. Mezi antigenní metody patří test přímé fluorescenční protilátky a cELISA („the capture enzyme-linked immunosorbent assay“), která detekuje antigen mAb specifický pro LPS. Molekulárně biologickou metodou je PCR detekující pro *Francisella* specifickou 16S rRNA. (Tärnvik and Weltgesundheitsorganisation, 2007)

Francisella je gramnegativní bakterie a tudíž její hlavní faktor virulence je lipopolysacharid (LPS), který v případě *Francisella* má neobvyklou strukturu lipidu A. Hlavní frakce lipidu A neobsahuje fosfátové skupiny, není acetylován na O-3 glukosaminu a obsahuje skupiny redukující glukosamin (Vinogradov et al., 2002) a proto vykazuje jen malou toxicitu. (Sandström et al. 1992) Dalším virulenčním faktorem je pouzdro složené hlavně z lipidů a molekul podobných těm, jaké jsou v LPS (O-antigen a lipid A) a chrání před lyzí. (Hood, 1977)

1. Tularémie

Tularémie je infekční onemocnění způsobené bakterií *Francisella tularensis* vyskytující se hlavně u polních zvířat jako jsou zajáci nebo hlodavci. Na člověka může být přenesena skrze inhalaci bakterií v aerosolu, kontaktem s infikovaným zvířetem nebo pomocí vektorů, například klíštětem. V České republice je největším zdrojem tularémie piják lužní (*Dermacentor reticulatus*). (Hubálek, 2004) Existují různé formy tularémie, které jsou závislé na místě vstupu infekce. Asi nejčastější forma je ulceroglandulární neboli kožní, kdy se bakterie množí v místě poranění. (Ohara et al., 1998) Další místo vstupu je skrze spojivky, kam si bakterie člověk může zanešť promnutím oka prstem a vzniká forma oční. (Steinemann 1999) Dále se může člověk nakazit vdechnutím aerosolu s bakteriemi, poté vzniká forma plicní, jejíž projevy jsou podobné zápalu plic (kašel, dušnost), ale tato forma může být taky bezpříznaková. (Tärnvik and Weltgesundheitsorganisation, 2007) Posledním způsobem nákazy je alimentární cestou, kdy se požitím špatně upraveného masa (hlavně zaječího) může vyvinout ústní nebo střevní forma. (Luotonen et al., 1986) Tularémie je léčena různými antibiotiky například tetracyklinem nebo streptomycinem a na tyto látky nebyla žádná primární (daná vlastnostmi bakterie) rezistence zaznamenána, avšak pro experimentální účely byly vyvinuty kmeny *Francisella tularensis* se získanou rezistencí vůči těmto antibiotikům. Avšak na erytromycin primární rezistence zjištěna byla a toto antibiotikum je používáno jako epidemiologický marker. (Tärnvik and Weltgesundheitsorganisation, 2007) Myslivci či pracovníci v rizikových laboratořích mohou být preventivně očkováni profylaktickou vakcínou. (Oyston et al., 2004)

2. Rozpoznání prostředí

Než se *Francisella* dostane do prostředí vhodného k replikaci, musí projít mnoha prostředími mimo i uvnitř hostitele. Na tyto změny se podmínky se umí přizpůsobit pomocí změny exprese genů. Jedny z genů ovlivněny prakticky všemi environmentálními změnami jsou faktory virulence, což je 16-19 genů, které se nacházejí na ostrovech patogenity FPI („*Francisella* pathogenity islands“) a jejich ovlivnitelnost a hojná regulovatelnost dokazuje jejich důležitost pro intracelulární přežití. (Nano and Schmerk, 2007) Za detekci změn prostředí je zodpovědný dvoukomponentový systém (TCS) (Dai et al., 2011). Senzorová kináza je KpdD a regulátor PmrA. (Johnson, 2018) *Francisella* si na rozdíl od ostatních bakterií kóduje pouze jeden alternativní sigma faktor σ^{32} , který slouží jako regulátor transkripce ve stresových situacích (např. teplotních). (Grall et al., 2009) Jednou z měnících se podmínek je například teplota. Na její změnu se *Francisella novicida* přizpůsobuje pomocí úpravy lipidu A v LPS. Při 25 °C je na glukosamidu amidově navázána 3-hydroxydekanová kyselina a při 37 °C je amidově vázaná 3-hydroxyoktanová kyselina. (Shaffer et al., 2007) Mechanismu této regulace je pravděpodobně stejně jako u jiných bakterií pomocí sigma faktoru. (Grall et al., 2009)

3. Rozpoznání *F. tularensis* imunitním systémem

Ať už při vstupu do organismu nebo při replikaci v cytosolu, je *Francisella* detekována imunitním systémem a je vystavena různým rozpoznávacím procesům a receptorům, například TLR (Toll-like receptor, receptor podobný genu Toll) a nebo cytosolickým NLR („NOD-like receptor“), které běžně rozpoznávají povrchové struktury patogenů, jako jsou PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“). Vzhledem k jedinečnému složení lipidu A lipopolysacharidů mají gramnegativní bakterie nízkou endotoxicitu a nevyvolává tak odpověď pomocí TLR4-editované signalizace, ale pomocí TLR2-editované signalizace (Cole et al., 2007). Tato dráha vyvolává produkci zánětlivých cytokinů a tu je *Francisella* následně schopná potlačit pomocí proteinu 23-kDa, který inhibuje produkci TNF- α . (Bosio a Dow 2005) Díky tomuto proteinu buňka nerozpoznává LPS a bakteriální lipopetid a neaktivuje NF- κ B („nuclear factor kappa B“), transkripční faktor odpovídající za expresi TNF- α . Dále je inhibována odpověď mitogenem aktivované protein kinázy p38, které reagují na stresové podněty, například přítomnost cytokinů nebo tepelný šok. Inhibována je i produkce proteinu c-jun, který se zabraňuje TNF- α indukované apoptóze. (Telepnev, 2003)

4. Životní cyklus

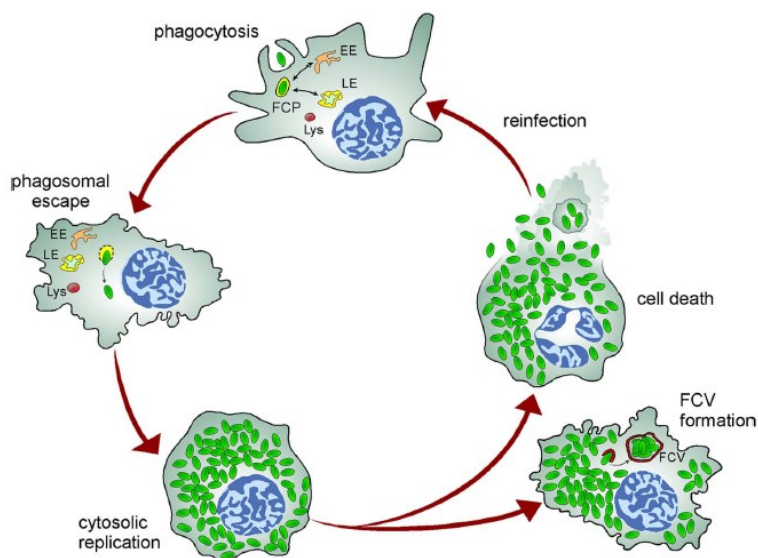
Francisella tularensis je fakultativní vnitrobuněčný patogen a jako takový má dvě fáze infekčního cyklu. Obě tyto fáze jsou důležité pro propuknutí nemoci.

A. Vněbuněčná fáze životního cyklu a rezervoár v hostiteli

Ať se patogen dostane do těla jakoukoliv cestou, později se vždy ocitne v krvi. Například u myši je extracelulární fáze životního cyklu důležitá pro vyvolání nemoci. (Forestal et al., 2007) Další důležitou událostí pro vyvolání tularemie v hostiteli je replikace v nefagocytujících buňkách. (Horzempa et al., 2010) Jedny z těchto buněk jsou erythrocyty. (Horzempa et al., 2011) Tyto buňky jsou jedny z nejčastějších v krvi organismu a slouží k přenosu kyslíku tělem, obsahují železo. Do erythrocytu *Francisella* vstupuje pomocí inaktivace faktoru komplementu C3b na C3bi, které ukládá na svůj povrch. (Clay et al., 2008) Faktor C3bi poté interaguje s receptorem CD35 a usnadňuje tak interakci bakterie s erythrocytem. Protože se *Francisella* v cytosolu erythrocytu špatně replikuje, jsou pro její přítomnost v něm jiná vysvětlení. Jedním z nich je, že slouží jako rezervoár v hostiteli. Dalším vysvětlením může být větší šance na přežití ve vektorech. (Horzempa et al., 2011) A jedním z posledních vysvětlení přítomnosti *Francisella* v erythrocytu, může být jeho vysoký obsah železa, které reguluje expresi virulenčních faktorů. (Deng et al., 2006)

B. Vnitrobuněčná fáze životního cyklu

Aby onemocnění mohlo propuknout, *Francisella tularensis* se musí šířit do buněk, ve kterých se může dobře replikovat. V jejím případě jsou to makrofágy, dendritické buňky, neutrofil, hepatocyty, endoteliální i epiteliální buňky. (Obr. 2) (Oyston et al., 2004)



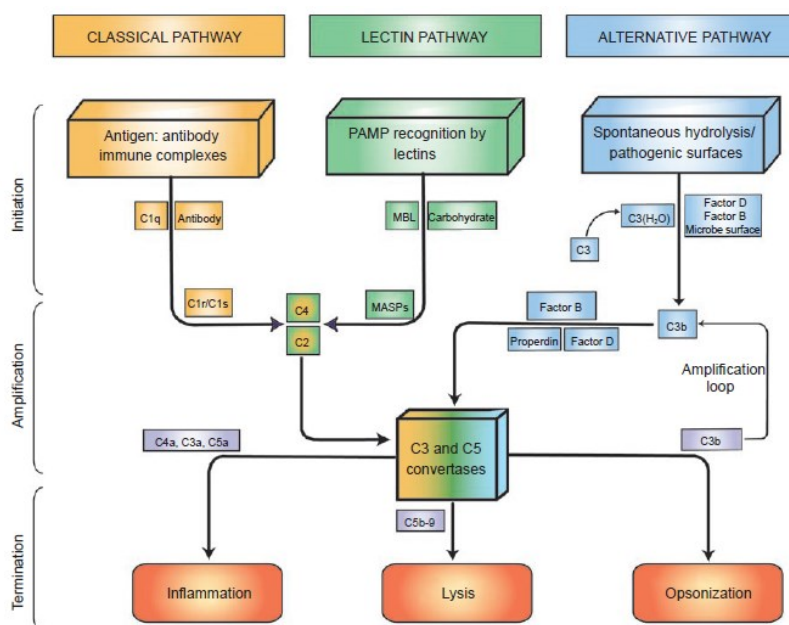
Obrázek 2: Životní cyklus bakterie *Francisella tularensis*, (Chong and Celli, 2010)

4.1. Vstup do fagocytující buňky

Patogen vstupuje do buňky, aby unikl před nehostinnými podmínkami panujícími vně buňky. Fagocyty, do kterých *Francisella tularensis* vstupuje, aby se mohla replikovat, exprimují různé receptory pro rozpoznání PAMPs nebo pro protilátky, které jsou na povrchu bakterie navázány po vstupu do hostitele procesem opsonizace. (Geier and Celli, 2011) Opsonizace je významným spouštěčem procesu vstupu bakterie do makrofága, protože mění receptory, skrze které je *Francisella tularensis* pohlcena, jakým způsobem unikne z fagosomu, a také mění způsob, jakým se bude *Francisella tularensis* proliferovat v cytosolu. (Geier and Celli, 2011) Jedním z opsoninů je faktor komplementu C3. (Barker et al., 2009) Jiný receptor hrající roli v pohlcování opsonizovaných patogenů je Fc γ . (Underhill and Ozinsky, 2002) Neopsonizovaná bakterie vstupuje do buněk pomocí mannozového receptoru. (Balagopal et al., 2006) Další možností, jak vstoupit do buňky je skrze lipidové rafty. *Francisella* v makrofázích vytváří FCP („*Francisella*-containing phagosome“), což jsou časná fagosomy plné bakterií. Tyto váčky obsahují cholesterol a caveolin-1, což jsou složky lipidových raftů a průnik přes tyto oblasti snižuje možnost degradace bakterie, jakmile se fagosom dostane do buňky. (Tamilselvam and Daefler, 2008)

4.1.1. Komplement

Komplement je systém plazmatických a membránových sérových proteinů, které vyvolávají regulované zánětlivé reakce jako odpověď na přítomnost mikroorganismů jak je vidět na obrázku 3.



Obrázek 3. Tři způsoby aktivace komplementu, (Dunkelberger and Song, 2010)

Existují tři způsoby jak komplement aktivovat. Klasickou cestu využívají složky imunitního systému, když se C1q váže na protilátku navázanou na antigen a dojde k aktivaci C1r a C1s, které štěpí C4 a C2. Ke spuštění lektinové dráhy dojde navázáním lektinu na manozu sacharidového motivu na povrchu patogenů a dojde k aktivaci MASPů („MBL-associated serine proteases“) a štěpení C4 a C2. Společným produktem štěpení těchto cest je dráha C3 konvertázy, C4bC2a. C3b se spojí s C4bC2a a vznikne C5 konvertáza. Tyto konvertázy jsou důležité pro převedení C3 a C5 proenzymů na enzymy a následné štěpení faktoru C3a na C3b, který se účastní procesu opsonizace. Posledním způsobem je alternativní cesta. Tato dráha začíná spontánní hydrolyzou C3 a vznikem počáteční AP3 konvertázy, což vede k dalšímu štěpení a možnému vzniku C3 a C5 konvertáz. Ať už je komplement aktivován kteroukoliv dráhou, výsledkem jsou tři různé akce: tvorba anafylotoxinů (silných zánětlivých molekul), vznik membránového komplexu, který lyzuje cílené povrchy nebo C3b indukující opsonizaci a následnou fagocytózu. (Dunkelberger and Song, 2010)

Francisella používá alternativní i klasickou cestu aktivace komplementu (Nasr and Klimpel, 2008) a je odolná vůči jejich lytickým účinkům díky lipopolysacharidům a struktuře buněčné stěny. (Lindemann et al., 2011) Důležitou složkou komplementu je pro *Francisella* faktor C3, protože usnadňuje její pohlcení makrofágy a oddaluje maturaci fagosomu. (Baudino et al., 2014) Jakmile je bakterie opsonizací označena k fagocytóze, naváže se na C3-receptor na povrchu makrofága a je jím pohlcena.

4.2. Vnitrobuněčné prostředí

Po vstupu do fagocytující buňky se *Francisella* vyskytuje ve fagosomu, což je organela, která vznikne fagocytózou bakterie dovnitř buňky. (Haas, 2007) Fagosom se spojuje s lyzozomem a maturací postupně dozrává do rozkladného kompartmentu zvaného fagolysosom. (Haas, 2007) Aby se bakterie vyhnula baktericidním účinkům maturujícího fagolysosomu a protože se replikuje v cytosolu, musí z něj uniknout. Na to má ve svých ostrovech patogenity geny pro sekretorickou dráhu VI typu (Clemens et al., 2018) Tato dráha sekretuje protein IglG, který pravděpodobně spolupracuje s proteinem VgrG a působí jako protein propichující membránu. (Rigard et al., 2016) Další protein sekretovaný sekretorickou dráhou VI typu je IglF, důležitý pro replikaci v cytosolu. (Rigard et al., 2016) Způsobů likvidace bakterií má fagolysosom několik. Fagolysosom může buď acidifikovat své lumen skrze v-ATPázu (Futai, 2000) nebo může produkovat reaktivní formy kyslíku pomocí NADPH oxidázy. (Babior, 2004) *Francisella* umí blokovat NADPH oxidázu a tedy i oxidativní vzplanutí a tvorbu ROS („reactive oxygen species“). (Schulert et al., 2009)

Pro poddruh *F. tularensis novicida* je pro únik z fagosomu a replikaci v cytosolu důležitý protein IglC a jeho refulátor MglA. (Santic, 2005)

4.2.1. Blokace NADPH oxidázy

NADPH oxidáza je multiproteinový komplex na membráně fagolysosomu, kde produkuje superoxidové aniony, které jsou poté pomocí superoxidodismutázy přeměněny na peroxid vodíku. (Nathan and Shiloh, 2000) Tento komplex se skládá ze dvou membránových proteinů gp91^{phox} a gp22^{phox}, které společně tvoří flavocytochrom b₅₅₈. Ten je místem ukotvení cytosolických podjednotek p47^{phox} a p40^{phox}, které je pro aktivaci nutné fosforylovat. (Babior, 2004)

Způsob blokace NADPH oxidázy je rozdílný pro jednotlivé poddruhy. *F. tularensis* a *F. holarctica* zastavují funkci NADPH oxidázy vyčleněním gp91^{phox}/gp22^{phox} z membrány, takže p47^{phox} není fosforylováno. *F. novicida* narušuje funkce NADPH oxidázy pomocí defosforylace Phox jednotek. (McCaffrey et al., 2010) (Mohapatra et al., 2010) Aby *Francisella* mohla NADPH oxidázu blokovat, potřebuje na to být vybavená regulátory virulence *fevR* („*Francisella* effector of virulence regulation“). (Buchan et al., 2009)

4.3. Replikace v cytosolu

Množení bakterií nastává krátce po uniknutí z fagolysosomu, a proto je těžké rozlišit geny pro jednotlivé části cyklu. Geny, které byly identifikovány jako důležité pro replikaci v cytosolu, jsou znázorněny v tabulce 1. Faktory, u kterých byla odhalena i funkce v replikaci jsou *purMCD*, *ggt*, *htpG*, *dsbB*, *mglB* a *pmrA*. Proteiny HtpG a DsbB se řadí mezi chaperony a gen *mglB* je transkripční regulátor. (Meibom and Charbit, 2010) Regulátor *pmrA* pozitivně ovlivňuje expresi genů v FPI, které mimo jiné kódují i sekretorickou dráhu VI typu. (Ramsey and Dove, 2016) Gen *purMCD* kóduje enzymy potřebné pro *de novo* syntézu purinových nukleotidů. Jsou to enzymy fosforibosylaminoimidazol syntetáza, SAICAR syntetáza a fosforibosylaminyglycin ligáza. (Pechous et al., 2008) Gen *ggt* kóduje γ -glutamyl transpeptidázu, která se podílí na hydrolýze glutathionu (γ -Glutamylcysteinylglycin) a tím získu cysteinu. (Alkhuder et al., 2009)

Intracellular stage	Bacterial factors	Proposed function
Cytosolic replication	<i>iglD</i> ^a	Unknown
	FTT0369c	Unknown
	<i>purMCD</i>	Purine biosynthesis
	<i>ggt</i>	γ-Glutamyl transpeptidase
	FTT0989 ^a	Unknown
	<i>nipA</i>	Unknown
	<i>htpG</i> ^b	Chaperone
	<i>dsbB</i> ^b	Disulfide bond formation
	<i>iglA</i> ^a	Unknown
	<i>iglB</i> ^b	Unknown
	<i>pdpB</i> ^b	Unknown
	<i>cds2</i> ^b	Unknown
	<i>mglB</i> ^b	Transcriptional regulator
	<i>pmrA</i> ^a	Orphaned two-component response regulator

Tabulka 1: Faktory podílející se na replikaci v cytosolu, upraveno, Chong a Celli 2010

4.4. Buněčná smrt

Způsob buněčné smrti vyvolané patogenem je různý. Mezi typy programované smrti patří apoptóza či pyroptóza. *Francisella tularensis* umí regulovat nástup buněčné smrti, dokud pro ni výstup do extracelulárního prostoru není prospěšný. (Parmely et al., 2009)

4.4.1. Autofagie

V průběhu množení v cytosolu je *Francisella* nechráněna před imunitním systémem a hrozí její zničení v průběhu autofagie. Pro autofagii je typická tvorba fagoforu a obalování cytosolových kompartmentů do membrány. Pro tvorbu fagoforu jsou nutné PI3K / Akt (fosfatidilinositolová kináza 3.třídy / protein kináza B) a Beclin 1. Pro dokončení autofagosomu jsou nutné faktory ATG12, ATG5 a ATG8. V neposlední řadě je aktivován i toll-like receptor 2 a tím zvýšena produkce prozánětlivých cytokinů. *Francisella* snižuje expresi MHC („Major histoncompatibility complex“) II. třídy a oddaluje tak vznik autofagosomu a snižuje zánětlivou reakci. (Cremer et al., 2009)

V. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je grampozitivní, nesporeující, neopouzdrěná, fakultativně anaerobní tyčinkovitá bakterie a fakultativně intracelulární patogen. (Ruppitsch et al., 2015) Pohybuje se pomocí flagelinových bičků, jejichž exprese je zvýšená v nižších teplotách (okolo 20 °C), zatímco ve 37 °C je jejich exprese snížena. (Peel et al., 1988) *Listeria monocytogenes* je původcem potravinového onemocnění zvaného listerióza. (Murray et al., 1926) Existuje 6 druhů *Listerie*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* a *L. grayi*. Jediná *L. seeligeri* je považována za nepatogenní. (Rocourt a Grimont 1983)

Listeria monocytogenes lze kultivovat na krevním agaru (nejčastěji z ovčí krve) nebo na agaru z vaječných žloutků. Kultivace není náročná, protože *Listeria* je psychrofilní a halotolerantní bakterie a roste tedy za nízkých teplot a vyšších koncentrací solí a nitrátů. (Ruppitsch et al., 2015)

Detekce *Listeria* probíhá pomocí molekulární serotypizace, pomocí variace somatických a flagelárních antigenů. (Kérouanton et al., 2010) Dalšími způsoby jsou PCR nebo analýza DNA sekvencí, typických pro *Listeria spp.* (Aires-de-Sousa et al., 2006)

Mezi virulenční faktory *Listeria* patří hemolyzin zvaný listeriolysin O (LLO), lecitináza, fosfolipáza C, internaliny a ActA („actin based intercellular motility“). (Ramana and Mohanty, 2013) Listeriolysin O je membránově aktivní cytolysin, antigen v imunitní reakci s T-buňkami a inhibitor prezentace antigenu makrofágy. (Beattie and Ziegler, 1990) Lecitináza se podílí na mezibuněčném šíření lyzováním hostitelské membrány okolo bakterie, ve které se ocitne po vstupu do buňky. (Vazquez-Boland et al., 1992) Také ActA umožňuje mezibuněčné šíření pomocí polymerace aktinu a tím podporuje pohyblivost bakterie v hostiteli. (Travier et al., 2013) Fosfolipáza C je důležitá pro únik z vakuoly a mezibuněčnému šíření. (Smith et al., 1995)

1. Listerióza

Listerióza je infekční onemocnění způsobené bakterií *Listeria monocytogenes*. S úmrtností pohybující se mezi 40-50 % patří listerióza mezi jedny z nejzávažnějších onemocnění. (McLauchlin 1990, McLauchlin 1990b) *L. monocytogenes* se vyskytuje ve vodě, půdě, tlejícím masu a vegetaci. (Welshimer, 1968) Z těchto zdrojů se nakazí domácí i divoká zvířata, u kterých způsobuje potraty a encefalitidu. Ze špatně pasterizovaného mléka či tepelně upraveného masa z nakaženého zvířete se listerióza může přenést na člověka. Pokud se nakazí těhotná žena, tak zatímco matka nemá žádné příznaky nebo má příznaky podobné chřipce, u plodu dochází

k zánětu plodových obalů, což může vést až k potratu. V lepších případech se listerióza projeví až po porodu a vzniká meningitida. Jedním z hlavních příznaků nákazy u netěhotných dospělých je gastroenteritida spojená se zvracením či průjmy. Častou formou listeriózy je meningoencefalitida, která v krajních případech může vést až k ochrnutí. Mezi méně časté formy listeriózy patří bakteriémie, myokarditida, pneumonie či hepatitida. U veterinářů či farmářů, kteří přišli do přímého kontaktu s nakaženou placentou, je jedním z příznaků listeriózy vyrážka. (Vazquez-Boland et al., 2001) Listeriόza se léčí penicilinem nebo ampicilinem v kombinaci s gentamycinem. (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007) Přirozená resistance, mezi lidskými kmeny je výjimečná (Hansen et al., 2005). Mezi zvířecími kmeny je přirozená resistance na antibiotika hojná a tyto kmeny mohou sloužit jako přenašeči ATB resistance. (Srinivasan et al. 2005) Kvůli této hrozbě jsou zakázány antibiotikové přísady do krmiva hospodářských zvířat. (Castanon, 2007) Proti bakterii *L. monocytogenes* se dá očkovat vakcínou na bázi adenoviru, které cílí na antigen LLO. (Jensen et al., 2013) Zvláštností je, že atenuovaná *Listeria monocytogenes* může sloužit jako nositelka neonatální vakcíny, proti různým typům rakoviny či dokonce bakterii *Francisella tularensis*. (Liang et al., 2014)

2. Rozpoznání prostředí

Listeria monocytogenes se musí umět přizpůsobit mnoha prostředím, než se dostane do hostitele, ve kterém se může pomnožit. A v případě *Listeria* je jedním z prostředí i chlad v lednicích. Na chladové i jiné stresové podmínky se *Listeria* přizpůsobuje dvoukomponentovým systémem LisRK, alternativními σ faktory (*sigH*, *sigB*, *sigL*, *sigC*), regulátory σ^B (*rsbT*, *rsbV*) a negativními regulátory *ctsR*, *hrcA*. (Chan et al., 2008)

Listeria má 16 různých typů LisRK a jedním z nich je například regulována chemotaxe, kde senzorovým proteinem je CheA a regulátorem CheY. (Dons et al., 1994) Faktor σ^B hraje roli v odpovědi na stresové podmínky jako je nízká teplota, vysoký tlak nebo nízké pH. (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004) V nízké teplotě je exprese *ctsR* a *hrcA* potlačena a v těchto podmínkách jsou tyto geny negativními regulátory sigma faktorů. Jinak se *ctsR* podílí například i na zvýšené odolnosti proti peroxidu vodíku. (Karatzas et al., 2003)

Transkripční regulátor, který pomáhá bakteriím *Listeria* v přechodu mezi saprofytem a patogenem je PrfA, který reguluje zhruba 10 genů souvisejících s motilitou, vstupem do cytosolu či odolnost vůči žluči. (Freitag et al., 2009)

3. Rozpoznání *L. monocytogenes* imunitním systémem

Jakmile *Listeria* začne kolonizovat hostitele, jako první reagují složky vrozené a specifické imunity. Jedna z prvních reakcí je produkce cytokinu INF- γ (interferon- γ) pomocí TH1-lymfocytů, což následně aktivuje makrofágy. Makrofágy poté produkují cytokin TNF („tumor-necrosis factor“), který může vyvolávat apoptózu napadených buněk. (Pamer, 2004) Zajímavostí je, že produkce INF typu I (INF- α a INF- β), snižuje životaschopnost infikovaných makrofágů. (Stockinger et al., 2002) Další důležitou složkou imunitní odpovědi jsou T-buňky (T-lymfocyty). Funkce $\gamma\delta$ T-buněk je kontrola zánětlivé reakce (Egan and Carding, 2000) a funkce $\alpha\beta$ T-buněk je dlouhodobá ochrana proti bakteriím. Jedny z receptorů na $\alpha\beta$ T-buňkách jsou CD8 a CD4. CD8+ T-lymfocyty na rozdíl od CD4+ T-lymfocytů zahajují obranu nezávisle na INF- γ (Harty et al., 1992), ale CD4+ T-lymfocyty vyvolávají u makrofágů větší baktericidní účinky a zabraňují úniku bakterií z fagosomu. (Portnoy, 1989) CD8+ T-lymfocyty také mají MHC glykoproteiny I. třídy, které slouží k rozeznání antigenů uvnitř cytosolu a bakterií infikované hepatocyty podléhají lýzi. (Bouwer et al., 1998) Také jsou pomocí TLR a NLR rozeznávány PAMPs.

4. Životní cyklus

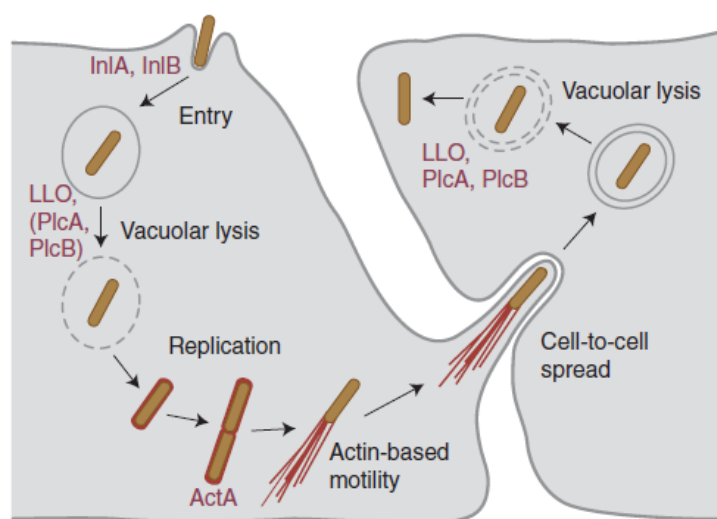
Jako fakultativní intracelulární patogen, musí *Listeria* projít extracelulární i intracelulární fází životního cyklu.

A. Vněbuněčná fáze

Než se *Listeria* dostane do hostitele, přežívá jako saprofyt. Do hostitele se nejčastěji dostane skrze zkažené jídlo a tedy do žaludku či střev a odtud pokračuje její cesta do krve. Poté je, nejčastěji v makrofázích, přepravena do jater či slinivky, odkud může znovu uniknout do krve. (Freitag et al., 2009)

B. Vnitrobuněčná fáze

Aby došlo ke kolonizaci hostitele a propuknutí onemocnění, musí se *Listeria* dostat do makrofágů, hepatocytů či střevních epitelových buněk, ve kterých se umí rozmnožit. *Listeria* napadá i buňky nervového systému, do kterých se šíří pomocí mezibuněčného kontaktu z infikovaných leukocytů nebo migrací infikovaných leukocytů do CNS. (Drevets and Campbell, 1991) Schéma životního cyklu na obrázku 4.



Obrázek 4: Životní cyklus *Listeria monocytogenes*, zobrazeny i virulenční faktory, (Pizarro-Cerdá et al., 2012)

4.1. Vstup do buňky

Vstup do buňky je důležitým krokem na cestě k vyvolání onemocnění. Proteiny hrající roli v tomto procesu jsou internaliny InlA a InlB. Pro vstup do epitheliálních buněk se InlA váže na E-cadherin, který se vyskytuje mimo jiné i na buňkách placenty. (Mengaud et al., 1996) Do hepatocytů vstupuje *Listeria* pomocí vazby InlB na receptorovou tyrosinkinázu Met, která je za normálních okolností receptorem pro HGF („hepatocyte growth factor“). (Shen et al., 2000) Protein InlB napodobuje HGF skrze vazbu repetitivních bohatých na leucin (LRR, „leucine-rich repeats“) na imunoglobulinovou doménu. (Niemann et al., 2007) Obě tyto cesty jsou součástí klatrinem zprostředkované endocytózy. V případě InlA/E-cadherin cesty dochází k interakci s lipidovým raftem, jehož součástí je caveolin-1. Ten aktivuje Src a to vede k fosforylaci E-cadherinu. Fosforylace je následována ubikvitinací pomocí ubikvitin-ligázy Hakai, což přitahuje klatrin. Src fosforyluje i cortaktin a ten aktivuje Arp2/3 komplex a polymeraci G aktinu. V případě InlB/Met dráhy dochází k autofosforylaci Met a fosforylaci ubikvitin-ligázy Clb, která jej následně ubikvitinuje. Do místa vstup je povolán dynamin, který interaguje s cortaktinem a aktivuje Arp2/3 komplex a polymeraci aktinu. Tyto interakce mezi klatrinem a aktinem vyvolávají invaginaci bakterií a jejich obalení do klatrinového váčku. (Pizarro-Cerdá et al., 2010)

Do makrofágů *Listeria* vstupuje pomocí komplementového faktoru C3 a C3 receptoru (Drevets and Campbell, 1991) a také faktoru C1q a jeho C1q receptoru. (Alvarez-Dominguez et al., 1993)

4.2. Vnitrobuněčné prostředí

Únik z fagolysosomu či z klatrinového váčku je důležitý pro přežití *Listeria* a možnosti rozmnožit se v cytosolu. Pro únik z těchto kompartmentů je ve fagocytyjících i nefagocytyjících buňkách zapotřebí listeriolysin O (LLO, produkt genu *hly*) a fosfatidylinositol specifická fosfolipáza C (produkt genu *plcA*). V průběhu maturace fagolysosomu se snižuje pH, což aktivuje produkci LLO. LLO patří mezi cytolysiny a vytváří do membrány fagolysosomu póry, které mají dva účely. Jedním z nich je snížit pH a tudíž oddálit maturaci fagolysosomu a druhým je možnost úniku bakteriemi produkované fosfolipázy, čímž jí umožní zvenku rozrušit membránu. (Marquis and Hager, 2000)

4.3. Replikace v cytosolu

Po úniku z fagolysosomu do cytosolu se může *Listeria* začít množit. Geny důležité pro replikaci v cytosolu jsou PrfA závislé. Jedním z těchto genu je i gen *hpt*, který kóduje transportní protein pro cukr fosfátovou permeázu. Tato permeáza je důležitá pro vychytávání glukóza-1-fosfátu, který slouží bakterii jako zdroj uhlíku uvnitř buňky. (Goetz et al., 2001) Gen *glpD* kóduje glycerol kinázu. Geny důležité pro syntézu aminokyselin jsou *glnA* (syntéza serinu a glutaminu), *ilvD* (leucin a valin), *arcD* a *ardC* (arginin). Geny důležité pro metabolismus dusíku jsou *glnA* a *gltAB* (syntéza glutaminu a glutamátu), přičemž donor dusíku je amino skupina na glutamátu. Gen pro stresovou odpověď je kupříkladu *clpB* (kóduje jednotku ATP-dpd Clp proteázy, také umí poskytnout aminokyseliny jako zdroj uhlíku a dusíku). Chaperony pro stresovou odpověď jsou například DnaK, GroEL či GrpE. (Joseph et al., 2006) Gen *dnaG* kódující DNA primázu, která se účastní replikace bakteriální DNA. Gen pro kondenzaci chromozomů je *smc*. (Chatterjee et al., 2006) (Graumann, 2001)

Aby bakterie měly více času na replikaci a množení, nesoutěží s buňkou o zdroje dusíku a uhlíku, ale využívají alternativní produkty hostitelské buňky. Například fosforylovaná glukóza jako zdroj uhlíku či ethanolamin z fosfolipidů jako zdroj dusíku. (Joseph et al., 2006)

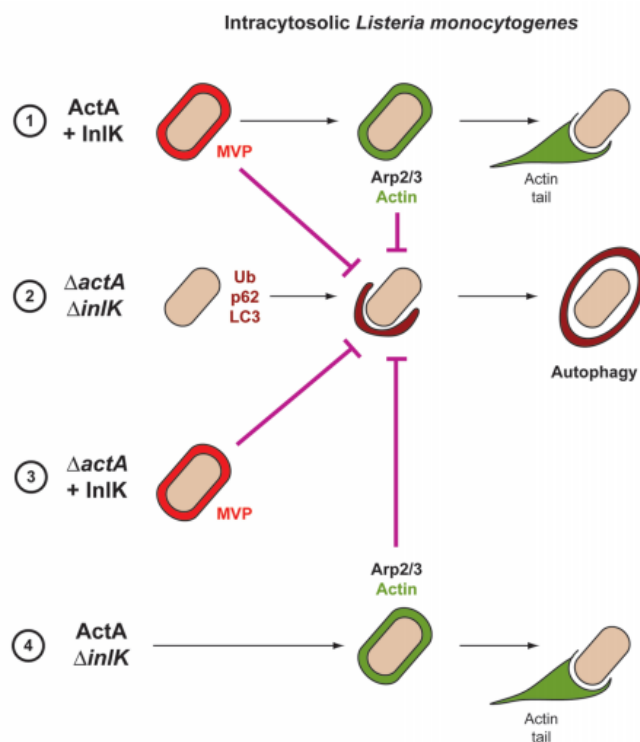
4.4. Buněčná smrt

Buněčná smrt je, v případě napadení buňky patogenem, ochrana proti šíření bakterie do dalších buněk. *Listeria* se spuštění těchto pochodů brání regulací svých virulenčních faktorů. Kupříkladu nekróze se *Listeria* vyhýbá zabráněním lytické aktivitě LLO, například degradací ubikvitinem nebo nižší aktivitou v neutrálním pH. Přítomnost bakterie *Listeria* v buňce či přítomnost aktivního LLO pravděpodobně aktivuje RIPK3 („Receptor interacting serine/threonine- protein kinase 3“) cestu nebo IRF3 („Interferon regulating factor“) závislou dráhu vedoucí k nekróze. Apoptóze v hepatocytech je pravděpodobně aktivována TNF a to

vede k aktivaci caspázy-3. V lymfocytech je apoptóza aktivována přítomností LLO nebo IFN z fagocytů. Mechanismu bakteriální ochrany proti apoptóze není znám. (McDougal and Sauer, 2018)

4.4.1. Autofagie

Listeria má několik cest jak uniká autofagii. Pro únik před autofagií používá dva virulenní faktory, ActA a InlK. Protein ActA slouží k polymeraci aktinu a což vede k pohybu uvnitř i mezi buňkami. InlK spolupracuje s MVP („Major vault protein“), což jsou cytoplazmatické části ribonukleoproteinu. Protein ActA je regulován dvěma promotory, proximálním a upstream promotorem. Proximální promotor je důležitý pro intracelulární expresi proteinu ActA a je aktivován v cytosolu hostitelské buňky. (Shetron-Rama et al., 2002) Expresí InlK zatím není zcela objasněná, jen se ví, že InlK není regulován PrfA ani σ^B . (Dortet et al., 2011) Podle toho, který protein je exprimován může nastat jedna z následujících možností, které jsou shrnuty na obrázku 5.



Obrázek 5: Způsoby jak se *Listeria monocytogenes* vyhýbá autofagii, (Dortet, Mostowy, a Cossart 2012)

(1) ActA i InlK mohou být exprimovány zároveň a InlK povolalo MVP. Jakmile je InlK nahrazeno ActA, je i MVP nahrazeno aktinem, vytvoří se aktinový ocas a autofagie nenastane. (2) Pokud není ani jeden protein exprimován dojde k ubiquitinaci, navázání p62 a LC3 a bakterie je předurčena k autofagii. Také může být exprimovaný jen jeden z proteinů.

(3) Pokud je exprimován je InlK, je bakterie označena MVP a je chráněn před autofagií a pokud (4) je exprimován jen ActA dochází k vytvoření aktinového ocasu a uniku před autofagií. (Dortet et al., 2012)

4.5. Mezibuněčné šíření

K pohybu uvnitř buňky i mezi nimi *Listeria* využívá protein ActA, který polymeruje aktin, což vytváří sílu pro pohyb v cytoplazmě hostitele. Jakmile dojde ke kontaktu bakterie s membránou, protlačí výčnělek hostitelské plazmatické membrány směrem do mezibuněčného prostoru, který může být až 10 mikrometrů dlouhý. Při kontaktu výčnělku s recipientní buňkou, dojde k pohlcení výběžku obsahujícího bakterii, která se tak dostane do cytoplazmy další buňky. V této nové buňce je bakterie obalená dvěma membránami, ze kterých uniká pomocí LLO. Po tomto úniku obnoví aktinový ocas a znovu se začne pohybovat uvnitř buňky. (Ortega et al., 2019)

VI. Závěr

Tato práce se zabývá popisem a srovnáním známých faktů o životním a infekčním cyklu dvou fakultativně vnitrobuněčných patogenů, bakteriích *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes*.

Přestože je *Francisella tularensis* gramnegativní kokobacil řadící se do třídy Gammaproteobacteria a *Listeria monocytogenes* je grampozitivní tyčinkovitá bakterie a přísluší do třídy Bacilli, jsou obě bakterie zástupci fakultativně vnitrobuněčných patogenních bakterií a původci vážných lidských onemocnění s vysokým procentem úmrtnosti. V případě bakterie *Francisella tularensis* se jedná o tularemii a bakterie *Listeria monocytogenes* způsobuje listeriózu. *F. tularensis* i *L. monocytogenes* rozpoznávají prostředí, ve kterém se nachází pomocí dvoukomponentového systému a alternativních sigma faktorů. *F. tularensis* si na rozdíl od *L. monocytogenes* kóduje pouze jeden sigma faktor pro všechny stresové situace. Po vstupu do těla jsou povrchové epitopy PAMPs obou bakterií rozpoznávány pomocí TLR a poté uvnitř buňky pomocí NLR. Dále se produkují cytokiny, které je *F. tularensis* schopná potlačit expresí 23-kDa proteinu. Obě bakterie také procházejí vněbuněčnou fází životního cyklu. Pro bakterii *F. tularensis* je tato fáze cyklu a pobyt v erythrocytech důležitou součástí virulence. Vněbuněčná fáze *L. monocytogenes*, kdy žije jako saprofyt, je důležitá pro rozpoznání a přizpůsobení se různým prostředím. *L. monocytogenes* i *F. tularensis* se umí replikovat ve fagocytujících i nefagocytujících buňkách. Pro vstup do fagocytujících buněk využívají stejný mechanismus zneužití faktorů komplementu C3 a C1q a jejich receptorů. Do nefagocytujících buněk každá vstupuje jinak, *F. tularensis* pomocí manozového receptoru, *L. monocytogenes* pomocí internalinů InlA a InlB. Po vstupu do buňky jsou obě bakterie uzavřeny v fagosomu, ale každá má jiný způsob, jak z něj uniknout.

F. tularensis si ve svých FPI kóduje sekterotickou dráhu VI typu, která sekretuje membránu propichující protein IglG spolupracující s proteinem VgrG. Dále také umí blokovat NADPH oxidázu. Postup blokace NADPH oxidázy je specifický pro jednotlivé poddruhy *F. tularensis*. *L. monocytogenes* uniká z fagosomu ještě před začátkem jeho maturace, pomocí listeriolysinu O, který dělá póry do membrány fagosomu, a pomocí fosfolipázy C, která narušuje strukturu fagosomální membrány.

Po úniku z fagosomu se obě bakterie množí v cytosolu. Při cytosolické replikaci jsou bakterie rozpoznávány imunitním systémem a *L. monocytogenes* i *F. tularensis* umí oddálit buněčnou smrt. *F. tularensis* buněčnou smrt oddaluje pomocí downregulace MHC II. třídy a oddaluje tak

vznik autofagosomu. *L. monocytogenes* se chrání před autofagií expresí ActA pro polymeraci hostitelského aktinu a následným vznikem aktinového ocasu nebo expresí InlK pro obalení do MVP. V poslední fázi cyklu *F. tularensis* unikne do extracelulárního prostoru po lyzi buňky. *L. monocytogenes* se šíří z buňky do buňky pomocí aktinového ocasu a vytvoření membránového výběžku infikované buňky ke kontaktu s neinfikovanou buňkou.

I přesto, že jsou *Francisella tularensis* a *Listeria monocytogenes* zcela rozlišné bakterie, jejich infekční cyklus má spoustu společných rysů. Velký rozdíl je v odlišné hloubce poznání jednotlivých fází infekčního cyklu u obou bakterií. Vysvětlují si to faktem, že *Francisella tularensis* je na seznamu potencionálních biologických zbraní a proto je složitější s ní pracovat. Budoucnost výzkumu těchto patogenů vidím v hlubším poznání mechanismů virulence, jejich regulace a vývoji cílených vakcín.

VII. Seznam použité literatury

Review označeny *

- *Aires-de-Sousa, M., Boye, K., de Lencastre, H., Deplano, A., Enright, M.C., Etienne, J., Friedrich, A., Harmsen, D., Holmes, A., Huijsdens, X.W., Kearns, A.M., Mellmann, A., Meugnier, H., Rasheed, J.K., Spalburg, E., Strommenger, B., Struelens, M.J., Tenover, F.C., Thomas, J., Vogel, U., Westh, H., Xu, J., Witte, W., 2006. High Interlaboratory Reproducibility of DNA Sequence-Based Typing of Bacteria in a Multicenter Study. *J. Clin. Microbiol.* 44, 619–621. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.619-621.2006>
- Alkhuder, K., Meibom, K.L., Dubail, I., Dupuis, M., Charbit, A., 2009. Glutathione Provides a Source of Cysteine Essential for Intracellular Multiplication of *Francisella tularensis*. *PLoS Pathog.* 5, e1000284. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000284>
- Alvarez-Dominguez, C., Carrasco-Marin, E., Leyva-Cobian, F., 1993. Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect. Immun.* 61, 3664–3672.
- Avery, O., Dubos, R., 1931. The protective action of a specific enzyme against type III *Pneumococcus* infection in mice
- Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., Rappuoli, R., 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6671–6675. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.17.6671>
- *Babor, B.M., 2004. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>
- *Badiaga, S., Brouqui, P., 2012. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 332–337. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03778.x>
- Balagopal, A., MacFarlane, A.S., Mohapatra, N., Soni, S., Gunn, J.S., Schlesinger, L.S., 2006. Characterization of the Receptor-Ligand Pathways Important for Entry and Survival of *Francisella tularensis* in Human Macrophages. *Infect. Immun.* 74, 5114–5125. <https://doi.org/10.1128/IAI.00795-06>
- Barker, J.H., McCaffrey, R.L., Baman, N.K., Allen, L.-A.H., Weiss, J.P., Nauseef, W.M., 2009. The role of complement opsonization in interactions between *F. tularensis* subsp. *novicida* and human neutrophils. *Microbes Infect.* 11, 762–769. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.016>
- Baudino, L., Sardini, A., Ruseva, M.M., Fossati-Jimack, L., Cook, H.T., Scott, D., Simpson, E., Botto, M., 2014. C3 opsonization regulates endocytic handling of apoptotic cells resulting in enhanced T-cell responses to cargo-derived antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1503–1508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316877111>
- Beattie, I.A., Ziegler, H.K., 1990. Cloning and Characterization of T-Cell-Reactive Protein Antigens. *INFECT IMMUN* 12.
- Black, M., Moolhuijzen, P., Chapman, B., Barrero, R., Howieson, J., Hungria, M., Bellgard, M., 2012. The Genetics of Symbiotic Nitrogen Fixation: Comparative Genomics of 14 *Rhizobia* Strains by Resolution of Protein Clusters. *Genes* 3, 138–166. <https://doi.org/10.3390/genes3010138>
- Bosio, C.M., Dow, S.W., 2005. *Francisella tularensis* Induces Aberrant Activation of Pulmonary Dendritic Cells. *J. Immunol.* 175, 6792–6801. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6792>
- Bouwer, H.G.A., Bai, A., Forman, J., Gregory, S.H., Wing, E.J., Barry, R.A., Hinrichs, D.J., 1998. *Listeria monocytogenes*-Infected Hepatocytes Are Targets of Major

- Histocompatibility Complex Class Ib-Restricted Antilisterial Cytotoxic T Lymphocytes. *Infect. Immun.* 66, 2814–2817.
- Buchan, B.W., McCaffrey, R.L., Lindemann, S.R., Allen, L.-A.H., Jones, B.D., 2009. Identification of migR, a Regulatory Element of the Francisella tularensis Live Vaccine Strain iglABCD Virulence Operon Required for Normal Replication and Trafficking in Macrophages. *Infect. Immun.* 77, 2517–2529. <https://doi.org/10.1128/IAI.00229-09>
- *Casadevall, A., Pirofski, L.-A., 1999. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *INFECT IMMUN* 67, 11.
- *Castanon, J.I.R., 2007. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult. Sci.* 86, 2466–2471. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>
- *Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E.A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S.J., Wood, T.K., García-Contreras, R., 2015. Role of quorum sensing in bacterial infections. *World J. Clin. Cases WJCC* 3, 575–598. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i7.575>
- Chambers, H., 2001. The Changing Epidemiology of Staphylococcus aureus? *Emerg. Infect. Dis.* 7, 178–182. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010204>
- Chan, Y.C., Hu, Y., Chaturongakul, S., Files, K.D., Bowen, B.M., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2008. Contributions of Two-Component Regulatory Systems, Alternative σ Factors, and Negative Regulators to Listeria monocytogenes Cold Adaptation and Cold Growth. *J. Food Prot.* 71, 420–425. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.2.420>
- Chatterjee, S.S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., Hain, T., 2006. Intracellular Gene Expression Profile of Listeria monocytogenes. *Infect. Immun.* 74, 1323–1338. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006>
- *Chong, A., Celli, J., 2010. The Francisella Intracellular Life Cycle: Toward Molecular Mechanisms of Intracellular Survival and Proliferation. *Front. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00138>
- Clay, C.D., Soni, S., Gunn, J.S., Schlesinger, L.S., 2008. Evasion of Complement-Mediated Lysis and Complement C3 Deposition Are Regulated by Francisella tularensis Lipopolysaccharide O Antigen. *J. Immunol.* 181, 5568–5578. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.8.5568>
- *Clemens, D.L., Lee, B.-Y., Horwitz, M.A., 2018. The Francisella Type VI Secretion System. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00121>
- Clemens, D.L., Lee, B.-Y., Horwitz, M.A., 2004. Virulent and Avirulent Strains of Francisella tularensis Prevent Acidification and Maturation of Their Phagosomes and Escape into the Cytoplasm in Human Macrophages. *Infect. Immun.* 72, 3204–3217. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3204-3217.2004>
- Cole, L.E., Shirey, K.A., Barry, E., Santiago, A., Rallabhandi, P., Elkins, K.L., Puche, A.C., Michalek, S.M., Vogel, S.N., 2007. Toll-Like Receptor 2-Mediated Signaling Requirements for Francisella tularensis Live Vaccine Strain Infection of Murine Macrophages. *Infect. Immun.* 75, 4127–4137. <https://doi.org/10.1128/IAI.01868-06>
- *Cossart, P., Helenius, A., 2014. Endocytosis of Viruses and Bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016972–a016972. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016972>
- Cremer, T.J., Amer, A.O., Tridandapani, S., Butchar, J.P., 2009. Francisella tularensis regulates autophagy-related host cell signaling pathways. *Autophagy* 2009, 125–128. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7305>
- *Dai, S., Mohapatra, N.P., Schlesinger, L.S., Gunn, J.S., 2011. Regulation of Francisella Tularensis Virulence. *Front. Microbiol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00144>

- Deng, K., Blick, R.J., Liu, W., Hansen, E.J., 2006. Identification of *Francisella tularensis* Genes Affected by Iron Limitation. *Infect. Immun.* 74, 4224–4236. <https://doi.org/10.1128/IAI.01975-05>
- *Dennis, D.T., Inglesby, T.V., Henderson, D.A., Bartlett, J.G., Ascher, M.S., Eitzen, E., Fine, A.D., Friedlander, A.M., Hauer, J., Layton, M., Lillibridge, S.R., McDade, J.E., Osterholm, M.T., O’Toole, T., Parker, G., Perl, T.M., Russell, P.K., Tonat, K., for the Working Group on Civilian Biodefense, 2001. Tularemia as a Biological Weapon: Medical and Public Health Management. *JAMA* 285, 2763. <https://doi.org/10.1001/jama.285.21.2763>
- *Dimijian, G.G., 2000. Evolving together: the biology of symbiosis, part 13, 10.
- Dons, L., Olsen, J.E., Rasmussen, O.F., 1994. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *DNA Seq.* 4, 301–311. <https://doi.org/10.3109/10425179409020856>
- Dortet, L., Mostowy, S., Cossart, P., 2012. *Listeria* and autophagy escape. *Autophagy* 8, 132–134. <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.18218>
- Dortet, L., Mostowy, S., Louaka, A.S., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E.A.C., Dussurget, O., Cossart, P., 2011. Recruitment of the Major Vault Protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* Strategy to Avoid Autophagy. *PLoS Pathog.* 7, e1002168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002168>
- Drevets, D.A., Campbell, P.A., 1991. Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 59, 2645–2652.
- *Dunkelberger, J.R., Song, W.-C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res.* 20, 34–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.139>
- Egan, P.J., Carding, S.R., 2000. Downmodulation of the Inflammatory Response to Bacterial Infection by $\gamma\delta$ T Cells Cytotoxic for Activated Macrophages. *J. Exp. Med.* 191, 2145–2158. <https://doi.org/10.1084/jem.191.12.2145>
- Forestal, C.A., Malik, M., Catlett, S.V., Savitt, A.G., Benach, J.L., Sellati, T.J., Furie, M.B., 2007. *Francisella tularensis* Has a Significant Extracellular Phase in Infected Mice. *J. Infect. Dis.* 196, 134–137. <https://doi.org/10.1086/518611>
- *Freitag, N.E., Port, G.C., Miner, M.D., 2009. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 623–628. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2171>
- Friis-Moller, A., Lemming, L.E., Valerius, N.H., Bruun, B., 2004. Problems in Identification of *Francisella philomiragia* Associated with Fatal Bacteremia in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1840–1842. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1840-1842.2004>
- Futai, M., 2000. Acidification of organelles by V-ATPase 10.
- *Galanos, C., Freudenberg, M.A., 1993. Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. *Mediators Inflamm.* 2, S11–S16. <https://doi.org/10.1155/S0962935193000687>
- Geier, H., Celli, J., 2011. Phagocytic Receptors Dictate Phagosomal Escape and Intracellular Proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* 79, 2204–2214. <https://doi.org/10.1128/IAI.01382-10>
- Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J.-A., Beck, M., Slaghuis, J., Szalay, A.A., Goebel, W., 2001. Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12221–12226. <https://doi.org/10.1073/pnas.211106398>

- Grall, N., Livny, J., Waldor, M., Barel, M., Charbit, A., Meibom, K.L., 2009. Pivotal role of the *Francisella tularensis* heat-shock sigma factor RpoH. *Microbiology* 155, 2560–2572. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029058-0>
- Graumann, P., 2001. SMC proteins in bacteria: Condensation motors for chromosome segregation? *Biochimie* 83, 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01218-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01218-9)
- *Haas, 2007, 2007. The Phagosome: Compartment with a License to Kill - Haas - 2007 - Traffic - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1600-0854.2006.00531.x> (accessed 4.19.19).
- Hansen, J.M., Gerner-Smidt, P., Bruun, B., 2005. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958–2001. *APMIS* 113, 31–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130105.x>
- Harty, J.T., Schreiber, R.D., Bevan, M.J., 1992. CD8 T cells can protect against an intracellular bacterium in an interferon gamma-independent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 11612–11616.
- Hollis, D.G., Moss, C.W., Brenner, D.J., n.d. *Francisella- philomiragia* comb. nov. (Formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* Biogroup Novicida (Formerly *Francisella novicida*) Associated with Human Disease. *J CLIN MICROBIOL* 8.
- Hood, A.M., 1977. Virulence factors of *Francisella tularensis*. *J. Hyg. (Lond.)* 79, 47–60.
- Horzempa, J., O’Dee, D.M., Shanks, R.M.Q., Nau, G.J., 2010. *Francisella tularensis* pyrF Mutants Show that Replication in Nonmacrophages Is Sufficient for Pathogenesis In Vivo. *Infect. Immun.* 78, 2607–2619. <https://doi.org/10.1128/IAI.00134-10>
- Horzempa, J., O’Dee, D.M., Stolz, D.B., Franks, J.M., Clay, D., Nau, G.J., 2011. Invasion of Erythrocytes by *Francisella tularensis*. *J. Infect. Dis.* 204, 51–59. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir221>
- Hubálek, 2004. Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent... - Abstract - Europe PMC [WWW Document]. URL <https://europepmc.org/abstract/med/9457420> (accessed 4.18.19).
- Jensen, S., Steffensen, M.A., Jensen, B.A.H., Schluter, D., Christensen, J.P., Thomsen, A.R., 2013. Adenovirus-Based Vaccine against *Listeria monocytogenes*: Extending the Concept of Invariant Chain Linkage. *J. Immunol.* 191, 4152–4164. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301290>
- *Johnson, D.I., 2018. *Francisella* spp., in: *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Springer International Publishing, Cham, pp. 241–247. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67651-7_16
- Jones, R.M., Nicas, M., Hubbard, A., Sylvester, M.D., Reingold, A., 2005. The Infectious Dose of *Francisella Tularensis* (Tularemia). *Appl. Biosaf.* 10, 227–239. <https://doi.org/10.1177/153567600501000405>
- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., Goebel, W., 2006. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Contributing to Intracellular Replication by Expression Profiling and Mutant Screening. *J. Bacteriol.* 188, 556–568. <https://doi.org/10.1128/JB.188.2.556-568.2006>
- Karatzas, K.A.G., Wouters, J.A., Gahan, C.G.M., Hill, C., Abee, T., Bennik, M.H.J., 2003. The CtsR regulator of *Listeria monocytogenes* contains a variant glycine repeat region that affects piezotolerance, stress resistance, motility and virulence. *Mol. Microbiol.* 49, 1227–1238. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03636.x>
- Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T.T., Brisabois, A., 2010. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *J. Microbiol. Methods* 80, 134–137. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.11.008>

- *Liang, Z.Z., Sherrid, A.M., Wallecha, A., Kollmann, T.R., 2014. *Listeria monocytogenes*: A promising vehicle for neonatal vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 1036–1046. <https://doi.org/10.4161/hv.27999>
- Lindemann, S.R., Peng, K., Long, M.E., Hunt, J.R., Apicella, M.A., Monack, D.M., Allen, L.-A.H., Jones, B.D., 2011. *Francisella tularensis* Schu S4 O-Antigen and Capsule Biosynthesis Gene Mutants Induce Early Cell Death in Human Macrophages. *Infect. Immun.* 79, 581–594. <https://doi.org/10.1128/IAI.00863-10>
- Luotonen, J., Syrjala, H., Jokinen, K., Sutinen, S., Salminen, A., 1986. Tularemia in Otolaryngologic Practice: An Analysis of 127 Cases. *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.* 112, 77–80. <https://doi.org/10.1001/archotol.1986.03780010079015>
- Lüderitz, O., Galanos, C., Lehmann, V., Mayer, H., Rietschel, E.Th., Weckesser, J., 1978. Chemical structure and biological activities of lipid A's from various bacterial families. *Naturwissenschaften* 65, 578–585. <https://doi.org/10.1007/BF00364907>
- Marquis, H., Hager, E.J., 2000. pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 289–298.
- McCaffrey, R.L., Schwartz, J.T., Lindemann, S.R., Moreland, J.G., Buchan, B.W., Jones, B.D., Allen, L.-A.H., 2010. Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 88, 791–805. <https://doi.org/10.1189/jlb.1209811>
- *McDougal, C.E., Sauer, J.-D., 2018. *Listeria monocytogenes*: The Impact of Cell Death on Infection and Immunity. *Pathogens* 7. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010008>
- McLauchlin, J., 1990a. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol. Infect.* 104, 181–189.
- McLauchlin, J., 1990b. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol. Infect.* 104, 191–201.
- *Meibom, K.L., Charbit, A., 2010. The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.11.007>
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mège, R.-M., Cossart, P., 1996. E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. *Cell* 84, 923–932. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81070-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81070-3)
- Mohapatra, N.P., Soni, S., Rajaram, M.V.S., Dang, P.M.C., Reilly, T.J., El-Benna, J., Clay, C.D., Schlesinger, L.S., Gunn, J.S., 2010. *Francisella* Acid Phosphatases Inactivate the NADPH Oxidase in Human Phagocytes. *J. Immunol.* 184, 5141–5150. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903413>
- *Moulder, J.W., 1985. Comparative Biology of Intracellular Parasitism. *MICROBIOL REV* 49, 40.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407–439. <https://doi.org/10.1002/path.1700290409>
- *Nano, F.E., Schmerk, C., 2007. The *Francisella* Pathogenicity Island. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105, 122–137. <https://doi.org/10.1196/annals.1409.000>
- Nasr, A.B., Klimpel, G.R., 2008. Subversion of complement activation at the bacterial surface promotes serum resistance and opsonophagocytosis of *Francisella tularensis*. *J. Leukoc. Biol.* 84, 77–85. <https://doi.org/10.1189/jlb.0807526>
- *Nathan, C., Shiloh, M.U., 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8841–8848. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>

- Niemann, H.H., Jäger, V., Butler, P.J.G., van den Heuvel, J., Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E., Heinz, D.W., 2007. Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase Met in Complex with the Listeria Invasion Protein InlB. *Cell* 130, 235–246. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.037>
- *Novick, R.P., Geisinger, E., 2008. Quorum Sensing in Staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42, 541–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640>
- Ohara, Y., Sato, T., Homma, M., 1998. Arthropod-Borne Tularemia in Japan: Clinical Analysis of 1,374 Cases Observed Between 1924 and 1996. *J. Med. Entomol.* 35, 471–473. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.471>
- Olsufjev, N.G., 1986. Subspecific Taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912t 3.
- Ortega, F.E., Koslover, E.F., Theriot, J.A., 2019. *Listeria monocytogenes* cell-to-cell spread in epithelia is heterogeneous and dominated by rare pioneer bacteria 26.
- *Oyston, P.C.F., Sjöstedt, A., Titball, R.W., 2004. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 967–978. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1045>
- Paldrychová, M., 2017. Quorum sensing ve vztahu k virulenci mikroorganismů, *Chem. Listy* 111, 637–643
- *Pamer, E.G., 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 812–823. <https://doi.org/10.1038/nri1461>
- *Parmely, Fischer, Pinson, 2009. Programmed cell death and the pathogenesis of tissue injury induced by type A *Francisella tularensis* | *FEMS Microbiology Letters* | Oxford Academic [WWW Document]. URL <https://academic.oup.com/femsle/article/301/1/1/614903> (accessed 5.2.19).
- Parsot, C., Mekalanos, J.J., 1990. Expression of ToxR, the transcriptional activator of the virulence factors in *Vibrio cholerae*, is modulated by the heat shock response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 9898–9902. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.24.9898>
- Pechous, R.D., McCarthy, T.R., Mohapatra, N.P., Soni, S., Penoske, R.M., Salzman, N.H., Frank, D.W., Gunn, J.S., Zahrt, T.C., 2008. A *Francisella tularensis* Schu S4 Purine Auxotroph Is Highly Attenuated in Mice but Offers Limited Protection against Homologous Intranasal Challenge. *PLoS ONE* 3, e2487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002487>
- Peel, M., Donachie, W., Shaw, A., 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2171–2178. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-8-2171>
- Pizarro-Cerdá, J., Bonazzi, M., Cossart, P., 2010. Clathrin-mediated endocytosis: What works for small, also works for big. *BioEssays* 32, 496–504. <https://doi.org/10.1002/bies.200900172>
- *Pizarro-Cerdá, J., Cossart, P., 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell* 124, 715–727. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>
- *Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A., Cossart, P., 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a010009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010009>
- Pollack, M., Taylor, N.S., Iii, L.T.C., 1977. Exotoxin Production by Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *INFECT IMMUN* 15, 5.
- Portnoy, D.A., 1989. Gamma interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. *J. Exp. Med.* 170, 2141–2146. <https://doi.org/10.1084/jem.170.6.2141>

- Ramana, K.V., Mohanty, S.K., 2013. Human Listeriosis: An Update. <https://doi.org/10.12691/ajeid-1-4-7>
- Ramsey, K.M., Dove, S.L., 2016. A response regulator promotes *Francisella tularensis* intramacrophage growth by repressing an anti-virulence factor. *Mol. Microbiol.* 101, 688–700. <https://doi.org/10.1111/mmi.13418>
- Rigard, M., Bröms, J.E., Mosnier, A., Hologne, M., Martin, A., Lindgren, L., Punginelli, C., Lays, C., Walker, O., Charbit, A., Telouk, P., Conlan, W., Terradot, L., Sjöstedt, A., Henry, T., 2016. *Francisella tularensis* IglG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. *PLOS Pathog.* 12, e1005821. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005821>
- Rocourt, J., Grimont, P.A.D., 1983. Notes: *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 866–869. <https://doi.org/10.1099/00207713-33-4-866>
- *Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., Tuohy, K., 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* 57, 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H.L., Allerberger, F., Harmsen, D., Mellmann, A., 2015. Defining and Evaluating a Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Whole-Genome Sequence-Based Typing of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* 53, 2869–2876. <https://doi.org/10.1128/JCM.01193-15>
- Sandström, G., Sjöstedt, A., Johansson, T., Kuoppa, K., Williams, J.C., 1992. Immunogenicity and toxicity of lipopolysaccharide from *Francisella tularensis* LVS. *FEMS Microbiol. Lett.* 105, 201–210. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05902.x>
- Santic, 2005. The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IglC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent... - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15953029> (accessed 5.6.19).
- Saslaw, S., 1961. Tularemia Vaccine Study: I. Intracutaneous Challenge. *Arch. Intern. Med.* 107, 689. <https://doi.org/10.1001/archinte.1961.03620050055006>
- Schulert, G.S., McCaffrey, R.L., Buchan, B.W., Lindemann, S.R., Hollenback, C., Jones, B.D., Allen, L.-A.H., 2009. *Francisella tularensis* Genes Required for Inhibition of the Neutrophil Respiratory Burst and Intramacrophage Growth Identified by Random Transposon Mutagenesis of Strain LVS. *Infect. Immun.* 77, 1324–1336. <https://doi.org/10.1128/IAI.01318-08>
- Shaffer, S.A., Harvey, M.D., Goodlett, D.R., Ernst, R.K., 2007. Structural heterogeneity and environmentally regulated remodeling of *Francisella tularensis* subspecies novicida lipid a characterized by tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 1080–1092. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.03.008>
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K., 2000. InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell* 103, 501–510. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00141-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00141-0)
- Shetron-Rama, L.M., Marquis, H., Bouwer, H.G.A., Freitag, N.E., 2002. Intracellular Induction of *Listeria monocytogenes* actA Expression. *Infect. Immun.* 70, 1087–1096. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1087-1096.2002>
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S.N., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., Goldfine, H., 1995. The Two Distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Have Overlapping Roles in Escape from a Vacuole and Cell-to-Cell Spread. *INFECT IMMUN* 63, 7.
- Steinemann, T., 1999. Oculoglandular Tularemia
- Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., Unger, H., Chakraborty, T., Levy, D.E., Muller, M., Decker, T., 2002. Production of Type I IFN

- Sensitizes Macrophages to Cell Death Induced by *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 169, 6522–6529. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6522>
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P., 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 9, 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
- Tamilselvam, B., Daefler, S., 2008. Francisella Targets Cholesterol-Rich Host Cell Membrane Domains for Entry into Macrophages. *J. Immunol.* 180, 8262–8271. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.12.8262>
- *Tärnvik, A., Weltgesundheitsorganisation (Eds.), 2007. WHO guidelines on tularaemia: epidemic and pandemic alert and response. World Health Organization, Geneva.
- Telepnev, 2003. Francisella tularensis inhibits Toll-like receptor-mediated activation of intracellular signalling and secretion of TNF- α and IL-1 from murine macrophages - Telepnev - 2003 - Cellular Microbiology - Wiley Online Library [WWW Document]. URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1462-5822.2003.00251.x> (accessed 5.6.19).
- Travier, L., Guadagnini, S., Gouin, E., Dufour, A., Chenal-Francisque, V., Cossart, P., Olivo-Marin, J.-C., Ghigo, J.-M., Disson, O., Lecuit, M., 2013. ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. *PLoS Pathog.* 9, e1003131. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003131>
- Uhl, M.A., Miller, J.F., 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15, 1028–1036. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00440.x>
- Uhl, M.A., Miller, J.F., 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1163–1167.
- *Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. PHAGOCYTOSIS OF MICROBES : Complexity in Action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825–852. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.103001.114744>
- *Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J., 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Vazquez-Boland, J.-A., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., COSSARTI, P., 1992. Nucleotide Sequence of the Lecithinase Operon of *Listeria monocytogenes* and Possible Role of Lecithinase in Cell-to-Cell Spread. *INFECT IMMUN* 60, 12.
- Vinogradov, E., Perry, M.B., Conlan, J.W., 2002. Structural analysis of Francisella tularensis lipopolysaccharide: Francisella tularensis lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 269, 6112–6118. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03321.x>
- Welshimer, H.J., 1968. Isolation of *Listeria monocytogenes* from Vegetation 95, 4.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P.P.L.A., Hain, T., Chakraborty, T., Abee, T., 2004. Identification of Sigma Factor B-Controlled Genes and Their Impact on Acid Stress, High Hydrostatic Pressure, and Freeze Survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3457–3466. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3457-3466.2004>
- *Wexler, H.M., 2007. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 593–621. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-07>
- *Wilson, J.W., 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad. Med. J.* 78, 216–224. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>