

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Václava Hejnarová

Molekulární mechanismy regulující virulenci lidského patogenu *Bordetella pertussis*
Regulatory mechanisms governing the virulence of the human pathogen *Bordetella pertussis*

Bakalářská práce

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

Praha, 2020

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Branislavu Večerkovi, Ph.D. za věcné připomínky a podporu při psaní této práce. Můj dík patří také všem členům Laboratoře posttranskripční kontroly genové exprese (MBÚ AV ČR, v.v.i.), za vytvoření příjemného pracovního prostředí a zvláště Ing. Janu Čapkovi za trpělivost při uvádění do laboratorní do praxe. Ráda bych také chtěla poděkovat svým rodičům Jaroslavě a Jiřímu Hejnarovým a partnerovi Josefu Krubnerovi za podporu při studiu.

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 14. 8. 2020

.....
Václava Hejnarová

Abstrakt

Bordetella pertussis je lidský patogen způsobující vážné respirační onemocnění černý kašel. Patogenita *B. pertussis* je zprostředkována celou řadou faktorů virulence. Mezi hlavní patří pertusový toxin, adenylát cyklázový toxin, pertaktin a filamentózní hemaglutinin. Úspěšnost infekce a kolonizace hostitele se odvíjí od správného načasování produkce faktorů virulence, k čemuž bakterie využívají řadu mechanismů regulace genové exprese. Reakci na vnější podněty zajišťují dvoukomponentové fosfotransferázové systémy BvgAS, RisAK a PlrSR. Tyto systémy signální transdukce moduluji odpověď bakterie na fyziologické prostředí hostitele a navozují jednotlivé fáze infekce. Další úroveň regulace poskytují nekódující RNA, konkrétně sRNA spolu s RNA chaperonem Hfq. Hfq je posttranskripční regulátor, který zprostředkovává interakce regulačních sRNA s cílovými mRNA, čímž ovlivňuje jejich translaci. U *B. pertussis* je tímto pleiotropním regulátorem ovlivněna exprese zhruba 10% všech genů, mezi které patří i faktory virulence, jako sekreční systém typu 3, adenylát cyklázový toxin, pertusový toxin a filamentózní hemaglutinin. Znalost těchto regulačních mechanismů je klíčová pro porozumění jednotlivých fází tohoto onemocnění a může být nápomocná ke kontrole jeho šíření.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, faktory virulence, kontrola genové exprese, BvgAS, Chaperon Hfq

Abstract

Bordetella pertussis is human pathogen, which causes severe respiratory disease called pertussis or whooping cough. Pathogenicity of *B. pertussis* is mediated by a wide variety of virulence factors including pertussis toxin, adenylate cyclase toxin, pertactin and filamentous haemagglutinin. Successful infection and colonization of the host depend on the precise timing of virulence factors production. For this purpose bacteria developed miscellaneous mechanisms of gene regulation. Two-component phosphotransferase systems, such as BvgAS, RisAK and PlrSR are involved in response to external stimuli. These systems of signal transduction modulate bacterial gene expression profiles and establish consecutive phases of infection. Non-coding RNAs, particularly sRNAs and RNA chaperone Hfq provide additional level of regulation. Hfq is a post-transcriptional regulator, which mediates interaction of sRNA with target mRNA and thereby modulates their translation. Hfq affects approximately 10% of all *B. pertussis* genes including virulence factors such as type III secretion system, adenylate cyclase toxin, pertussis toxin and filamentous haemagglutinin. Knowledge of these regulatory mechanisms plays a key role in understanding of the pathogenesis of whooping cough and can lead to improved control over the spread of the disease.

Key words: *Bordetella pertussis*, virulence factors, control of gene expression, BvgAS, Hfq chaperone

Seznam zkratek

AC	A denylate c yclase d omain	Adenylát cyklázová doména
ACT	A denylate c yclase t oxin	Adenylát cyklázový toxin
ADP	A denosine d iphosphate	Adenosindifosfát
APCs	A ntigen p resenting c ells	Antigen prezentující buňky
ATP	A denosine t riphosphate	Adenosintrifosfát
<i>avg</i>	B ordetella v irulence g ene	Gen virulence u <i>Bordetella</i>
cAMP	C yclic a denosine m onophosphate	Cyklický adenosinmonofosfát
CRISPR	C lustered r egularly i nterspaced s hort p alindromic r epeats	Shluk pravidelně oddělených krátkých palindromatických repetice
DNT	D ermonecrotic t oxin	Dermonekrotický toxin
ENR	E ndoplasmatic r eticulum	Endoplazmatické retikulum
FHA	F ilamentous h emagglutinin	Filamentózní hemagglutinin
GSP	G eneral s ecretory p athway	Obecná sekretorická dráha
Hfq	H ost f actor q	Hostitelský faktor q
HK	H istidine k inase d omain	Histidin kinázová doména
Hpt	H istidine p hospho t ransferase d omain	Histidin fosfo transferázová doména
IFN-γ	I nterferon- γ	Interferon- γ
IL	I nterleukin	Interleukin
IM	I nnner m embrane	Vnitřní membrána
LOS	L ipooligosaccharide	Lipoologosacharid
LPS	L ipopolysaccharide	Lipopolysacharid
NAD	N icotineamide a denine d inucleotide	Nikotinamid adenin dinukleotid
NFκB	N ecrotic f actor κ B	Nekrotický faktor κ B
OM	O uter m embrane	Vnější membrána
PAMPs	P athogen a ssociated m olecular p atterns	Molekulární struktury asociované s patogenem
<i>plr</i>	P ersistence in the l ower r espiratory t ract	Perzistence v dolních cestách dýchacích
PRN	P ertactin	Pertaktin
PT	P ertussis t oxin	Pertusový toxin
PTL	P ertussis t oxin l iberation	Proteiny odpovědné za sekreci PTX
PTX	P ertussis t oxin	Pertusový toxin

Rec	Receiver domain	Přijímací doména
RBS	Ribosomal binding site	Vazebné místo pro ribozom
RGD	Arginin- glycin-aspartic acid motive	Arginin-glycin-aspartátový motiv
RTX	Repeats in toxin	Opakující se úseky v toxinu
sRNA	Small regulatory RNA	Malá regulační RNA
T3SS	Type III secretion system	Sekreční systém typu 3
TCT	Tracheal cytotoxin	Tracheální cytotoxin
Th	T-helper lymphocyte	Pomocný T-lymfocyt
TSP	Two-partner secretory pathway	Dvousložkový sekreční systém
<i>vag</i>	Virulence activated gene	Gen aktivovaný BvgAS
VFT	Venus fly trap	Přijímací doména proteinu BvgS
<i>vrg</i>	Virulence repressed gene	Gen reprimovaný BvgAS

Obsah

1 Úvod	1
2 Faktory virulence <i>Bordetella pertussis</i>	2
2.1 Endotoxiny	2
2.1.1 Lipopolysacharid	2
2.2 Exotoxiny	3
2.2.1 Pertusový toxin	3
2.2.2 Adenylát cyklázový toxin	4
2.2.3 Tracheální cytotoxin	5
2.2.4 Dermonekrotický toxin	5
2.3 Adheziny	5
2.3.1 Filamentózní hemagglutinin	6
2.3.2 Pertaktin	6
2.3.3 Fimbrie	6
2.4 Sekreční systém typu 3	7
3 Regulace virulence dvoukomponentovými systémy	10
3.1 BvgAS	10
3.1.1 Regulon BvgAS	12
3.2 RisAK	14
3.3 PlrSR	16
4 Regulace virulence chaperonem Hfq a malými RNA	17
4.1 Regulace genové exprese nekódujícími RNA	17
4.2 Chaperon Hfq	18
4.3 Interakce chaperonu Hfq s malými RNA u <i>B. pertussis</i>	20
5 Závěr	21
Seznam použité literatury	22

1 Úvod

Černý kašel, neboli pertuse, je závažné onemocnění respiračního traktu způsobené Gram-negativní, striktně aerobní bakterií *Bordetella pertussis*. Nejtypičtějším projevem tohoto onemocnění je dlouho přetrvávající, dávivý suchý kašel. Nejnebezpečnější je černý kašel pro neočkované novorozence (tj. děti mladší 3 měsíců), ale vyskytuje se napříč všemi věkovými skupinami. Vzhledem k závažnosti onemocnění je vakcinace nejdůležitějším preventivním opatřením. V ČR bylo plošné očkování celobuněčnou vakcínou zahájeno v roce 1958. Po zavedení očkování se začal prudce snižovat počet nakažených, ale od roku 1993 začala incidence onemocnění meziročně opět stoupat (Fabiánová *et al.*, 2019). Kvůli nepříznivým vedlejším účinkům se v devadesátých letech ve vyspělých zemích začalo ustupovat od celobuněčné varianty a byla zavedena acelulární (bezbuněčná) vakcína, obsahující vybrané antigeny *B. pertussis* (pertusový toxoid, pertaktin, fimbrie sérotypu 2 a 3 a filamentózní hemagglutinin). V ČR došlo k přechodu na acelulární vakcínu v roce 2007. Jak se ale dnes ukazuje, změna typu vakcíny má za následek nedostatečnou imunitní odpověď a může to být jeden z řady důvodů, proč je dnes pertuse na vzestupu (Esposito *et al.*, 2019).

Pro patogenezi *B. pertussis* jsou podstatné zejména faktory virulence zahrnující adheziny a toxiny, které jsou dnes již vcelku dobře prostudovány. Velkou roli ale hrají různé regulační mechanismy, jako je kontrola genové exprese dvoukomponentovými systémy, malými RNA a chaperonem Hfq. Nejenom, že znalost těchto mechanismů objasňuje chování bakterie v hostitelském systému, ale také může být využita k boji proti onemocnění. Cílem pro antibiotika se například mohou stát dvoukomponentové systémy, které se u eukaryotických organizmů běžně nevyskytují.

Cílem této práce je shrnout poznatky o hlavních faktorech virulence *B. pertussis* a jejich působením na hostitele. Hlavně ale bude kladen důraz na mechanismy, které ovlivňují expresi těchto faktorů, jako jsou dvoukomponentové systémy BvgAS, RisAK a PlrSr, ale také malé regulační RNA (sRNA) a RNA chaperon Hfq.

2 Faktory virulence *Bordetella pertussis*

Faktory virulence jsou molekuly převážně proteinové povahy asociované s patogenními organismy. Napomáhají infekci a invazi hostitele a jsou zodpovědné za projevy onemocnění. Řadí se mezi ně proteiny s enzymatickou aktivitou (například hyaluronidázy, kolagenázy a koagulózy), které dokáží narušit hostitelské tkáně a umožnit tak invazi bakterií; dále pak nukleázy, proteázy a lipázy, které štěpí nukleové kyseliny a stavební jednotky hostitelských buněk. K nejdůležitějším faktorům virulence patří adheziny, které umožňují bakteriím přichycení k tkáním hostitele a zejména pak toxiny, které způsobují patologické změny v hostiteli. Geny pro faktory virulence se nacházejí jak na chromozomu, často jako součást takzvaných ostrovů patogenity, tak extrachromozomálně na plasmidech, nebo jako součást transpozonů. Tyto geny se mohou přenášet horizontálně a z avirulentních mohou vznikat virulentní kmeny bakterií. Většina projevů onemocnění vzniká vlivem působení několika faktorů virulence, jako je tomu i u černého kašle. V této kapitole budou probrány hlavní faktory virulence *B. pertussis* s důrazem na toxiny, adheziny a sekreční systém typu 3 (T3SS).

2.1 Endotoxiny

Endotoxiny jsou strukturální molekuly obsažené ve vnější membráně (OM) Gram-negativních bakterií, které se uvolňují při lzy buňky. Jsou to často komplexy lipopolysacharidů a lipoproteinů, jsou teplotně stabilní a způsobují systémové příznaky, jako jsou horečka, zvracení a další. Jsou geneticky konzervovány a jsou kódovány chromozomálně.

2.1.1 Lipopolysacharid

Klasický lipopolysacharid (LPS) se skládá ze tří složek, lipidu A, tzv. core oligosacharidu a O-antigenu (polysacharidu). *B. pertussis* postrádá schopnost syntézy O-antigenu, protože byl lokus *wlb*, zodpovědný za syntézu O-antigenu, inaktivován inserčním elementem IS₄₈₁ a proto se někdy místo LPS označuje jako lipooligosacharid (LOS). Naproti tomu evolučně velmi příbuzné bakterie *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis* lokus *wlb* neztratily a produkují kompletní LPS (Preston *et al.*, 1999).

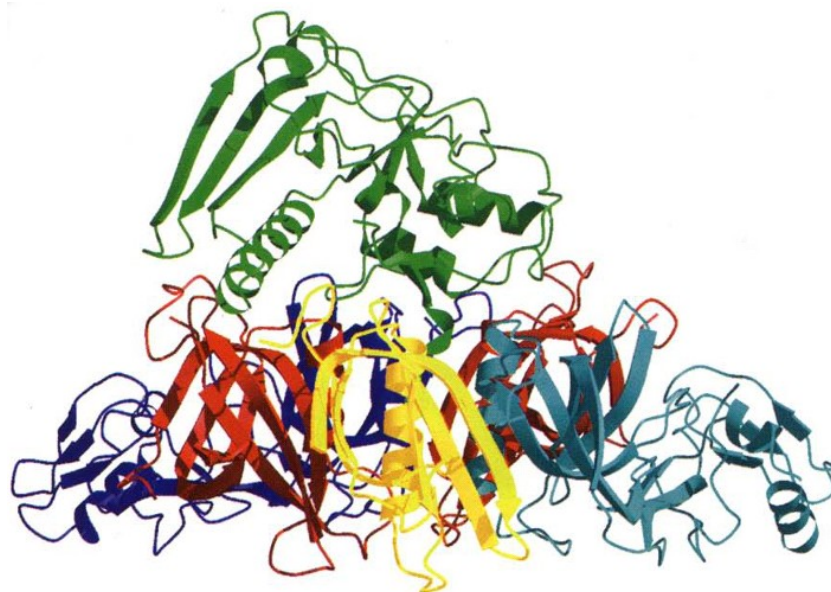
LPS se v hostiteli váže na receptory CD14, TLR4 a MD-2 (rozeznávají pathogen associated molecular patterns - PAMPs), které jsou exprimovány buňkami prezentujícími antigen (APCs), jako jsou například dendritické buňky a makrofágy (Wright *et al.*, 1990, Chow *et al.*, 1999, Nagai *et al.*, 2002). Ztráta O-antigenu u *B. pertussis* způsobuje nižší míru aktivace APCs, než je tomu u kompletního LPS *B. parapertussis* (Fedele *et al.*, 2008).

2.2 Exotoxiny

Další významné látky, které se podílejí na virulenci bakteriálního kmene, jsou exotoxiny. Jsou to látky sekretované z buňky a jsou často proteinové nebo peptidové povahy (proto jsou teplotně nestabilní). Působí lokálně a bývají často kódované na plasmidech a v mobilních genetických elementech. Dříve se všechny příznaky nemoci přisuzovaly jedinému toxinu (u *B. pertussis* to byl pertusový toxin) ale dnes víme, že je to souhra aktivit mnohých faktorů virulence.

2.2.1 Pertusový toxin

Jedním z nejvýznamnějších toxinů *B. pertussis* je bezesporu pertusový toxin (PTX). Skládá se ze šesti podjednotek – S1-S5 (S4 se v hexameru vyskytuje dvakrát). Řadí se k takzvaným AB toxinům, které se vyznačují odlišným působením komponenty A (active) a B (binding), kdy A prokazuje enzymatickou aktivitu a B se váže na membránové receptory hostitelských buněk a zprostředkovává transport komponenty A do buňky. U PTX zastává úlohu komponenty A podjednotka S1 a komponenty B podjednotky S2-S5 (Tamura *et al.*, 1982).



Obrázek 1: Schématické znázornění PTX – S2 zelená, S2 tyrkysová, S3 tmavě modrá, 2 x S4 červená, S5 žlutá. Převzato a upraveno (Stein *et al.*, 1994b).

PTX samotný je kódován lokusem *ptx*, zatímco sekreční systém typu 4, který je zodpovědný za sekreci PTX, je kódován lokusem *ptl* (pertussis toxin liberation) (Kotob *et al.*, 1995, Weiss *et al.*, 1993).

Komponenta B se naváže se na povrchové receptory hostitelských buněk, jako jsou sialoglykoproteiny (Stein *et al.*, 1994a), glykolipidy s navázanou laktózou a N-glykosylované proteiny (Tuomanen *et al.*, 1988). Poté je PTX pomocí receptorem zprostředkované endocytózy dopraven do cytoplazmy, kde se retrográdním transportem dostane do endoplazmatického retikula (ENR) (el Bayâ *et al.*, 1997). Tam se oddělí S1 od komponenty B působením NAD (nikotinamid adenin dinukleotid) glykohydrolázy a adenosintrifosfátu/adenosindifosfátu (ATP/ADP) (Burns a Manclark, 1986, Moss *et al.*, 1983).

Funkcí S1 je ADP-ribosylace α podjednotky trimerního G proteinu, což má za následek ztrátu inhibice ATP cyklázy a tudíž zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) v cytosolu (Katada a Ui, 1982). Mezi specifické projevy působení PTX patří například citlivost k histaminu (Parfentjev a Goodline, 1948), lymfocytóza (Mu *et al.*, 1994), modulace imunitního systému (Carbonetti *et al.*, 2003) a aktivace Langerhansových ostrůvků, která způsobuje hypoglykémii (Toyota *et al.*, 1978).

2.2.2 Adenylát cyklázový toxin

Dalším důležitým toxinem *B. pertussis* je adenylát cyklázový toxin (ACT). Obsahuje dvě části s odlišnou funkcí, adenylát cyklázovou (AC) doménu na N konci a repeats in toxin (RTX) hemolyzinovou část na C konci, řadí se tak k RTX toxinům. AC doména se skládá ze dvou subdomén – katalytické domény T25 a domény T18, která je zodpovědná za vazbu na kalmodulin. Část RTX obsahuje dvě místa pro posttranslační acylaci a hydrofobní domény, které jsou nezbytné pro tvorbu membránového póru hostitelských buněk (viz dále) (Guo *et al.*, 2005, Bauche *et al.*, 2006).

ACT je kódován genem *cyaA*, který se nachází v operonu spolu s geny *cyaBDE* kódující proteiny sekrečního systému typu 1, který zajišťuje transport ACT z buňky (Glaser *et al.*, 1988a, Glaser *et al.*, 1988b). V opačném směru je přepisován gen *cyaC*, jehož produkt je nezbytný pro posttranslační úpravu ACT (Barry *et al.*, 1991), při které je na lysiny 860 a 983 přidán zbytek kyseliny palmitové (Hackett *et al.*, 1994, Hackett *et al.*, 1995), což je nezbytné pro pronikání toxinu do hostitelských buněk (Basar *et al.*, 1999, Masin *et al.*, 2005).

Po sekreci z buňky se ACT váže buď na filamentózní hemagglutinin (FHA) *B. pertussis* a zůstává neaktivní (Zaretzky *et al.*, 2002), nebo na $\alpha_M\beta_2$ integrinový receptor neutrofilních granulocytů a makrofágů (Morova *et al.*, 2008). V membránách ACT vytváří oligomerní kation selektivní póry, které způsobují lyzi buněk. Monomerní AC doména je translokována do cytosolu hostitelské buňky (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009), kde se váže na kalmodulin a tím se

zvyšuje hladina cAMP (Ladant *et al.*, 1989). AC doména má také schopnost zvyšovat hladinu cytosolického Ca^{2+} , což spolu se zvýšenou hladinou cAMP způsobuje rozvrat v buněčné signalizaci (Fiser *et al.*, 2007). To má za následek například přestavbu aktinového cytoskeletu makrofágů kvůli snížení aktivity RhoA GTPázy (Kamanova *et al.*, 2008), indukci apoptózy u rezidentních alveolárních makrofágů (Gueirard *et al.*, 1998), nebo sníženou míru fagocytózy (Confer a Eaton, 1982).

2.2.3 Tracheální cytotoxin

Narozdíl od předešlých toxinů je tracheální cytotoxin (TCT) glykopeptidové povahy. Je to derivát buněčné stěny (N-acetylglukosaminyl-1,6-anhydro-N-acetylmuramylalanyl- γ -glutamyl-diaminopimelylalanin), který vzniká při přestavbě peptidoglykanu (Cookson *et al.*, 1989). Je to jeden z mála faktorů virulence, které nejsou ovlivňovány BvgAS systémem. Indukuje produkci NO v plicních epiteliálních buňkách (Flak a Goldman, 1999) a prozánětlivého faktoru interleukin-1 (IL-1) (Heiss *et al.*, 1993), což má za následek destrukci řasinkového epitelu plic (Goldman *et al.*, 1982).

2.2.4 Dermonekrotický toxin

Tetnto toxin objevili roku 1909 J. Bordett a O. Gengou na základě studia kožních lézí, které způsoboval na pokusných zvířatech. Později byl lokalizován a popsán jako intracelulární protein (Cowell *et al.*, 1979). C-konec dermonekrotického toxinu (DNT) u *B. bronchiseptica* se vyznačuje transglutaminázovou aktivitou, kterou uplatňuje na malých GTPázách rodiny Rho. Takto modifikované proteiny jsou pak zodpovědné za tvorbu stresových aktinových vláken (Horiguchi *et al.*, 1997, Schmidt *et al.*, 1999). Nejnovější studie ukazují, že se DNT váže na Ca^{2+} napěťový kanál, který se ve velké míře vyskytuje na buňkách v nervovém systému. Poznatky získané na buněčných kulturách a na myším modelu poukazují na možnou korelaci s vážnou komplikací černého kašle, encefalopatií (Teruya *et al.*, 2020).

2.3 Adheziny

Bakteriální adheziny jsou molekuly asociované s povrchem buňky a slouží k přichycení na povrchy hostitelských buněk a extracelulární matrix. Jsou klíčové pro počáteční fázi kolonizace hostitele.

2.3.1 Filamentózní hemaglutinin

Mezi nejvýznamnější adheziny *B. pertussis* patří filamentózní hemaglutinin (FHA). Je to velký protein kódovaný genem *fhaB*, který se nachází v lokusu spolu s geny *fhaA* a *fhaC* (Stibitz *et al.*, 1988). Protein FhaC tvoří pór v OM a slouží k sekreci FHA z buňky (Clantin *et al.*, 2007) pomocí sekrečního systému typu 5, konkrétně two-partner secretory pathway (TSP). FHA je nutný pro první fázi kolonizace dýchacího traktu, nicméně po kolonizaci trachey se jeho role v kolonizaci plic neprokázala, alespoň ne na myším modelu (Kimura *et al.*, 1990). Obsahuje arginin-glycin-aspartát (RGD) motiv (Relman *et al.*, 1989), kterým se váže na $\alpha_M\beta_2$ integrinový receptor buněk imunitního systému (makrofágů a neutrofilních granulocytů), nebo na glykoproteiny vyskytující se na membránách buněk řasinkového epitelu (Relman *et al.*, 1990, Prasad *et al.*, 1993). V hostiteli mimo adhezenci dokáže indukovat tvorbu interferonu- γ (IFN- γ) aktivující makrofágy (Dirix *et al.*, 2009) a potlačuje produkci IL-12, což brzdí protektivní imunitní odpověď založenou na aktivaci pomocných T-lymfocytů (Th-1) (McGuirk a Mills, 2000). Dříve byla FHA přisuzována schopnost indukovat tvorbu IL-10 u dendritických buněk, bylo však zjištěno, že tuto odpověď stimuloval kontaminující endotoxin (Romero *et al.*, 2016).

2.3.2 Pertaktin

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím kolonizaci hostitele je PRN. Je kódován genem *prn* (Charles *et al.*, 1989) a stejně jako FHA obsahuje RGD vazebný motiv, který zprostředkovává vazbu na $\alpha_M\beta_2$ integrinový receptor hostitelských buněk (Leininger *et al.*, 1991). Jeho C koncová doména slouží jako autotransportér (sekreční systém typu 5) odpovědný za sekreci PRN přes OM (Junker *et al.*, 2006). Ačkoliv PRN není zcela nezbytný pro kolonizaci dýchacího traktu bakteriemi *B. bronchiseptica* (v krysím modelu), je velmi důležitý pro přežití zánětlivé odpovědi imunitního systému hostitele (v myším modelu) (Inatsuka *et al.*, 2010). PRN indukuje tvorbu protektivních protilátek, což z něj dělá ideální antigen pro použití ve vakcínách. Polymorfní region 1 na FHA je rozeznán B-lymfocyty, indukuje tvorbu protilátek a podílí se na navození imunologické paměti (King *et al.*, 2001). V posledních letech se ale objevují kmeny *B. pertussis*, které PRN přestaly produkovat (Esposito *et al.*, 2019).

2.3.3 Fimbrie

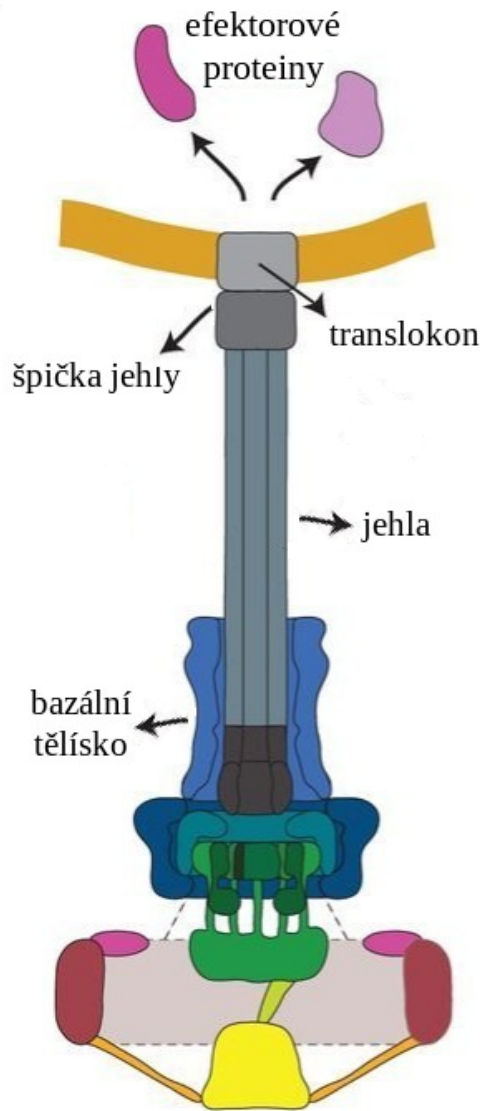
Mezi faktory virulence, sloužící ke kontaktu s hostitelem, se řadí i fimbrie sérotypu 2 a 3, jejichž hlavní podjednotky jsou kódované geny *fim2* a *fim3* (Mooi *et al.*, 1987), nicméně pro jejich správné sestavení a transport jsou zapotřebí další geny, například *fimB*, *fimC* a *fimD*

(Willems *et al.*, 1992). Fimbrie sérotypu 2 a 3 u *B. bronchiseptica* jsou klíčové pro kolonizaci dolních cest dýchacích a vyvolávají silnou protilátkovou odpověď organismu (v krysím modelu) (Mattoo *et al.*, 2000). Podjednotka FimD je nezbytná pro vazbu na monocyty (Hazenbos *et al.*, 1995) a hlavní podjednotky (Fim2, Fim3) vážou cukry obsahující sulfát (například heparan sulfát, chondroitin sulfát a dextran sulfát), které se velmi hojně vyskytují v dýchacím traktu (Geuijen *et al.*, 1996).

2.4 Sekreční systém typu 3

Sekreční systémy bakterií jsou poměrně složité transportní struktury, které lze dělit na dvě skupiny. Do první skupiny patří ty, co tvoří pór v OM a pro transport přes cytoplazmatickou membránu využívají obecnou sekretorickou dráhu (GSP) (typ 2 a 5) a do druhé skupiny patří ty, které dokáží sekretovat molekuly přes obě membrány (typ 1, 3, 4 a další). Jak bylo zmíněno výše, mnohé sekreční systémy hrají důležitou roli v transportu faktorů virulence z buňky (Green a Meccas, 2016).

Doposud ale nebyl zmíněn T3SS, významný faktor virulence používaný bakteriemi rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* a v neposlední řadě také *Bordetella* (Hueck, 1998). T3SS je kódován lokusem *bsc*, který obsahuje geny pro mnoho strukturních (*bsc* – **b**ordetella **s**ecretion) a vnějších proteinů (*bop* – **b**ordetella **o**uter **p**rotein) a lokusem *btr*, který obsahuje zejména geny regulující aktivitu T3SS (Fauconnier *et al.*, 2001, Bannan *et al.*, 1993). Díky svému tvaru a schopnosti vstříkovat efektorové proteiny přímo do cytoplazmy hostitelské buňky mechanismem podobným injekci se T3SS aparátů říká také injektizom.



Obrázek 2: Struktura T3SS – skládá se z bazálního tělíska, které stejně jako bazální tělísko bičíku prochází OM i vnitřní membránou (IM), jehly, špičky a translokonu zajišťující kontakt s eukaryotickou buňkou (Kubori, 1998) (převzato a upraveno Diepold a Armitage, 2015).

Při výstavbě injektizomu u *Yersinia enterocolitica* dochází nejprve k translokaci disků bazálního tělíska do IM, OM a do buněčné stěny (Diepold *et al.*, 2010). Tato struktura pak slouží k transportu dalších strukturních proteinů tvořící jehlu, která se skládá z mnoha molekul proteinu YscF a vzniká jeho polymerací (Hoiczky a Blobel, 2001). Vzhledem k malé tloušťce vnitřního prostoru T3SS musí být proteiny přepravovány v nesloženém stavu, což je zajištěno řadou specifických chaperonů (Radics *et al.*, 2013). Poté, co jehla dosáhne dostatečné délky je na její špičku dopraven protein LcrV (Mueller, 2005), který je nezbytný pro syntézu translokonu (Goure *et al.*, 2005). Mezi sekretované proteiny u *B. pertussis* patří Bsp22, BopN, BopB, BopC a BopD. U příbuzné bakterie *B. bronchiseptica* bylo prokázáno, že T3SS způ-

sobuje programovanou buněčnou smrt (apoptózu) a snižuje hladinu nukleárního faktoru κ B (NF κ B), čímž moduluje imunitní systém hostitele a potlačuje zánětlivou odpověď (Yuk *et al.*, 2000). BopD spolu s proteinem BopB tvoří pór v cytoplazmatické membráně hostitelských buněk (je součástí translokonu), což způsobuje hemolýzu (Nogawa *et al.*, 2004) a BopN zvyšuje hladinu IL-10, který potlačuje zánět (Nagamatsu *et al.*, 2009). Součinnost těchto proteinů při snižování zánětlivých faktorů má za následek pomalejší reakci imunitního systému a tím pádem efektivnější kolonizaci dýchacího traktu bakteriemi. Jediným doposud známým efektorovým proteinem T3SS rodu *Bordetella* je BopC, který narušuje aktinovou signální dráhu a navozuje tím nekrotickou smrt buňky (Kuwae *et al.*, 2006, Kuwae *et al.*, 2016).

3 Regulace virulence dvoukomponentovými systémy

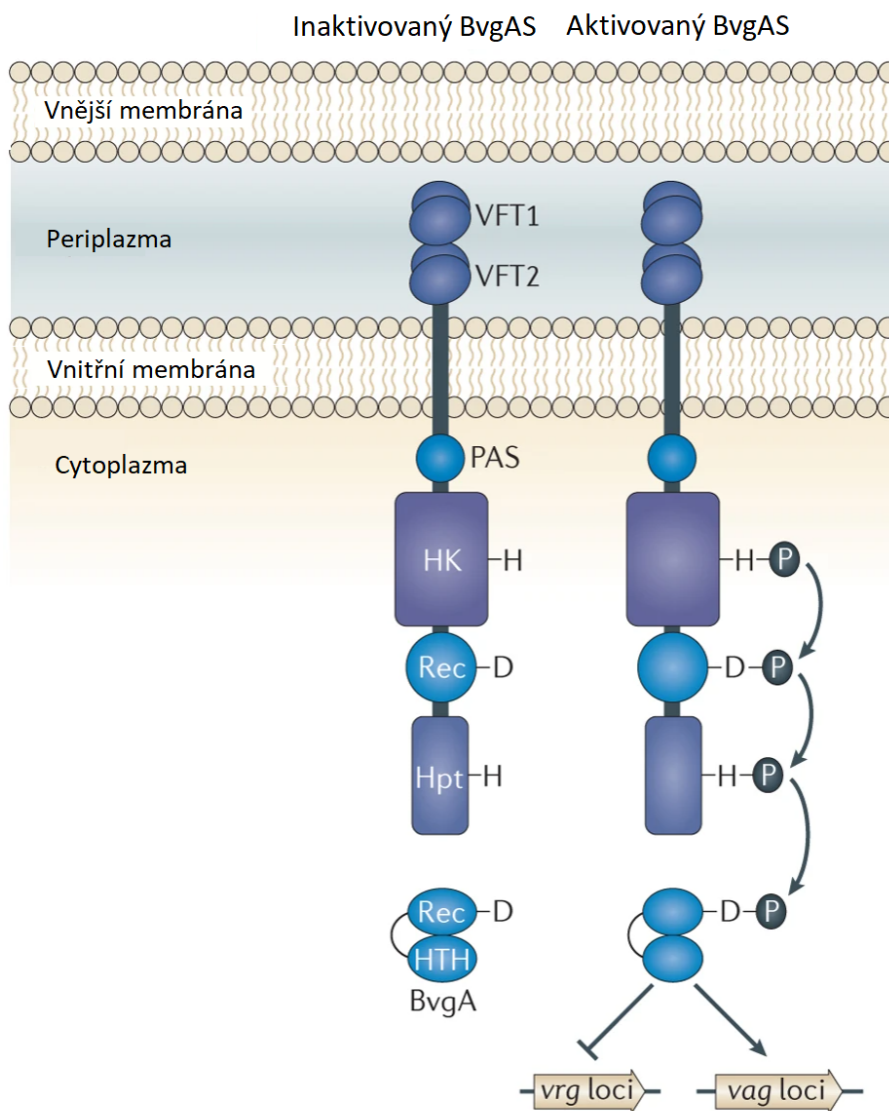
Jednou z klíčových vlastností živých organismů je transdukce informací z okolí a reakce na ně. Bakterie většinou využívají dvoukomponentové systémy, které reagují na chemické nebo fyzikální změny v okolí a předávají informaci o vnějším dění do buňky. Tyto systémy se skládají ze sensorové kinázy, proteinu integrovaného v membráně se schopností fosforylace jak sebe sama, tak i druhé komponenty, regulátoru. Ten se po aktivaci chová jako transkripční faktor, enzym, RNA vazebný protein, nebo zprostředkovává protein-proteinové interakce. Předmětem této kapitoly budou hlavní systémy signální transdukce u *B. pertussis* – BvgAS, RisAK a PlrSR. Vzhledem k tomu, že se v eukaryotických buňkách takové systémy nevyskytují, lze je využít jako cíl některých antibiotik (Mitrophanov a Groisman, 2008).

3.1 BvgAS

Nejlépe prostudovaným systémem signální transdukce u bakterií rodu *Bordetella* je BvgAS. Lokus *bvg* (*bordetella* virulence gene, dříve *vir*) obsahuje geny kódující hlavní komponenty systému – BvgA a BvgS (dříve považován za dva proteiny – BvgC a BvgB) (Stibitz *et al.*, 1988). BvgS plní funkci transmembránové sensorové kinázy a skládá se z několika domén nutných pro přenos signálu. BvgA je protein lokalizovaný v cytoplasmě a zastává roli transkripčního regulátoru.

Příjem signálu začíná na periplazmatické N-koncové části proteinu BvgS, kde se nachází dvě VFT (venus fly trap) domény (Herrou *et al.*, 2010). Do kavit těchto domén se váže ligand, který zapříčiní konformační změnu a přenos signálu pomocí autofosforylace v cytosolické části proteinu (Uhl a Miller, 1996a). Doposud nejsou známy ligandy, jež by vyvolávaly aktivaci BvgAS systému při infekci *in vivo*, ale pro modulaci virulence v laboratorních podmínkách *in vitro* se využívá nikotinová kyselina a síran hořečnatý, které inhibují fosforylační aktivitu BvgS kinázy (Dupré *et al.*, 2015, Melton a Weiss, 1993). Dříve se k deaktivaci BvgAS používala nízká teplota kultivace (25°C), nicméně bylo prokázáno, že při teplotách nižších, než 25°C nedochází k úplné deaktivaci BvgAS systému (Seydlova *et al.*, 2017). Transmembránovou doménu následuje PAS doména, nezbytná pro přenos signálu z periplazmatického prostředí do cytosolu buněk (Dupré *et al.*, 2013). Fosfát z ATP je přenesen na konzervovanou aminokyselinu histidin 729, který se nachází na histidin kinázové (HK) doméně. Dále probíhá série autofosforylací, kde je fosfát přenášen přes aspartát 1023 na tzv. receiver (Rec) doméně a histidin 1172, který je součástí C-terminální histidin fosfotransferázové (Hpt) domény BvgS a funguje jako donor fosfátu pro BvgA protein (Uhl a Miller, 1996a).

BvgA má na N-konci receiver doménu s aspartátem 54, na který se váže fosfát a C-koncovou doménu obsahující helix-turn-helix DNA-vazebný motiv (Beier *et al.*, 1995). Aktivovaný (fosforylovaný) BvgA tvoří homodimer, který se váže na DNA, konkrétně na sekvenci TTT(C/G)NTA (Boucher *et al.*, 2001) a nakonec váže a navádí RNA polymerázu na konkrétní promotor (Boucher *et al.*, 2003). Tímto mechanismem reguluje BvgAS systém velké množství genů.



Obrázek 3: Struktura a funkce signálního transdukčního systému BvgAS – Transmembránová sensorová kináza BvgS se skládá ze tří částí: periplazmatické, transmembránové a cytosolické. Periplazmatická část obsahuje dvě VFT domény nutné pro příjem signálu. Cytosolická část obsahuje PAS doménu, HK doménu, Rec doménu a Hpt doménu. Při aktivaci vnějším signálem je na HK doménu připojen fosfát, ten je přenášen přes Rec doménu až na Hpt doménu a odtud je přenesen na Rec doménu proteinu BvgA (His729→Asp1023→His1172→Asp54). BvgA má helix-turn-helix DNA vazebnou doménu a je pozitivní regulátor (aktivátor) genů *vags* a nepřímo i represor *vrgs* (virulence repressed genes) (Uhl a Miller, 1996b) (převzato a upraveno Melvin *et al.*, 2014).

3.1.1 Regulon BvgAS

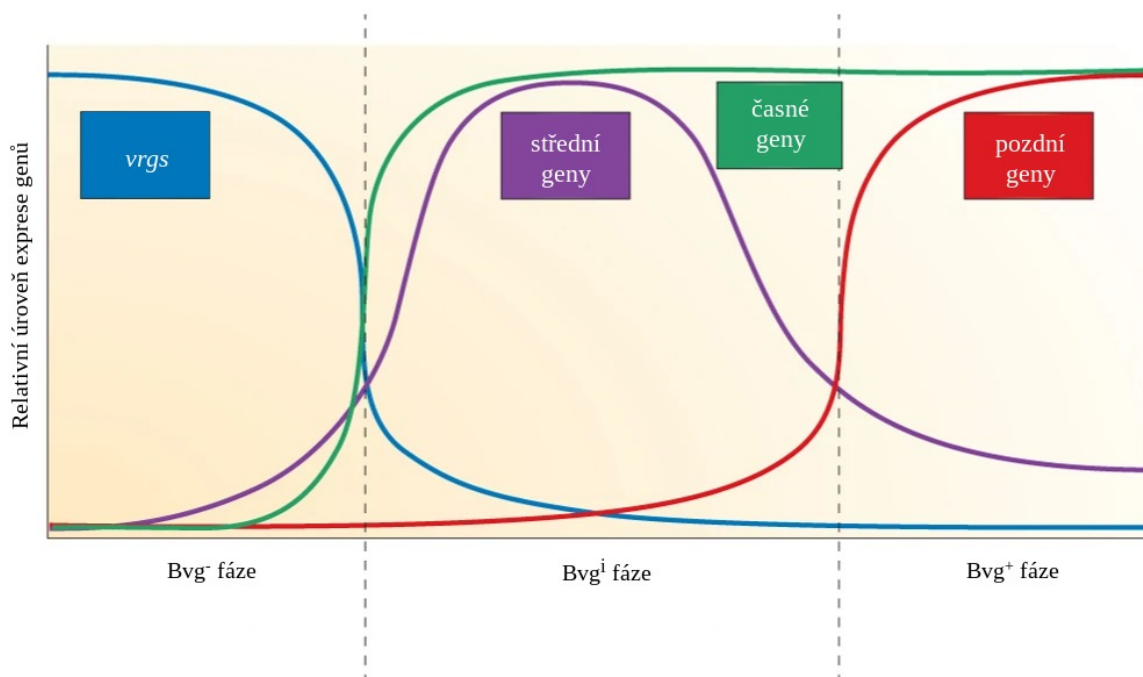
Podle transkriptomické studie, kterou provedla Moon *et al.* v roce 2017, ovlivňuje systém BvgAS expresi bezmála 550 genů, z nichž 245 pozitivně a 326 negativně. Tyto geny se dají rozdělit do několika kategorií. Do první kategorie spadají geny pro faktory virulence a další faktory pro jejich sekreci a funkci. Označují se souhrnně jako *vags* (**v**irulence **a**ctivated **g**enes) a patří k nim například geny *cyaABCDE*, *fhaBC*, *fim2*, *prn* a operony *ptl* a *ptx*. Druhá kategorie obsahuje geny pro další transkripční regulátory, jako jsou například σ faktory σ^N a BtrS, který je nezbytný pro expresi T3SS nebo dvoukomponentový systém signální transdukce KdpDE. Geny nacházející se v operonu pro T3SS patří do kategorie 3 a kategorie 4 zahrnuje geny pro transportní proteiny asociované s membránou, jejichž funkce je zatím neznámá. Mimo tyto geny dochází také k pozitivní autoregulaci samotného *bvgA* (Scarlato *et al.*, 1990). Výše popsané geny jsou pozitivně regulovány aktivovaným BvgA. Do těchto kategorií se dají rozdělit i negativně regulované geny. V první kategorii jsou to hlavně *vrgs* (**v**irulence **r**epressed **g**enes – *vrg-6*, *vrg-24*, *vrg-18* a *vrg-75*), ale i gen pro LPS *bpl* a také *fim3*. Na negativní regulaci *vrgs* se také podílí protein BvgR, který je též kódován lokusem *bvg* (Merkel *et al.*, 1998a) a je pozitivně regulován aktivovaným BvgA (Merkel *et al.*, 2003). Druhá kategorie sdružuje geny kódující enzymy metabolických dráh, například pyruvátdehydrogenáza, acyl-koenzym A syntetáza, ale i membránové proteiny pro transport cukrů a aminokyselin nebo pro syntézu peptidoglykanu. Ve třetí kategorii jsou identifikovány proteiny chladového šoku (Moon *et al.*, 2017).

	+	-
1	ACT, FHA, Fim2, PRN, PTL, PTX	<i>vrgs</i> , LPS, Fim3
2	σ^N , σ EFC, KdpDE	proteiny metabolických drah
3	T3SS	proteiny chladového šoku
4	transportní proteiny	

Tabulka 2: **Regulon BvgAS** – geny a proteiny pozitivně (+), či negativně (-) regulované systémem BvgAS, rozdělené do 4 kategorií.

Míra aktivity BvgAS, tj. které geny a v jaké míře jsou aktivní určuje minimálně tři různé fáze virulence *B. pertussis*. Jsou to fáze Bvg⁺ (virulentní), Bvgⁱ (přechodná) a Bvg⁻ (avirulentní), které korelují s postupem infekce. Při časně fázi infekce je pro bakterie stěžejní kolonizace dýchacího traktu, k čemuž potřebují produkovat velké množství adhezinů (PRN, FHA, fimbrie). Při této fázi je také nezbytné modulovat imunitní systém hostitele tak, aby nedocházelo k produkci prozánětlivých faktorů, což zajišťují zejména toxiny PTX a ACT. Po úspěšné kolonizaci

plic se začínají projevovat typické příznaky onemocnění, jako je dávivý kašel, protože dochází k destrukci buněk alveolárního epitelu a produkci prozánětlivých faktorů, na čemž se podílí převážně toxiny (ACT, PTX, DNT, TCT). Pro obě tato stadia infekce je charakteristická nadprodukce faktorů virulence, což odpovídá fázi Bvg⁺ (Cotter a Miller, 1994). Černý kašel se šíří kapénkami a aerosolem a při tomto přenosu se uplatňuje intermediální fáze Bvgⁱ, při které je produkován biofilm, na kterém se podílí protein BipA (Stockbauer *et al.*, 2001). Díky této fázi také bakterie dokáže přežít nepříznivé podmínky, včetně nedostatku živin (Cotter a Miller, 1997). Poslední fází je Bvg⁻, při které dochází k expresi *vrgs* a nejsou produkovány faktory virulence (Merkel *et al.*, 1998b). Tato fáze hraje významnou roli zejména u *B. bronchiseptica*, která je schopná přežít mimo hostitele. U *B. pertussis* má tato fáze význam při přežívání ve fagozomu makrofágů (Friedman *et al.*, 1992). Nedávné výsledky naznačují, že v intracelulárních buňkách *B. pertussis* a *B. bronchiseptica* dochází k snížení exprese faktorů virulence (Petráčeková *et al.*, 2020, Linz *et al.*, 2019). Časovou prodlevu mezi expresí časných, středních a pozdních faktorů virulence zajišťuje rozdílná afinita promotorů daných genů k dimeru BvgA (Kinnear *et al.*, 2001).



Obrázek 4: Přehled fází virulence – při první fázi, kterou lze aktivovat kyselinou nikotinovou a síranem hořečnatým (*in vitro*) jsou exprimovány *vrgs*. V Bvgⁱ fázi se přepisují časné a střední geny, které se podílejí na přenosu a prvotních stádiích infekce. Patří sem hlavně BipA (střední gen), zodpovědný na tvorbu biofilmu. Časné (adheziny) a pozdní (toxiny) geny se exprimují v Bvg⁺ fázi, při které dochází ke kolonizaci hostitele, imunomodulaci a projevy onemocnění v důsledku poškození buněk (převzato a upraveno Melvin *et al.*, 2014).

3.2 RisAK

RisAS je druhý dvoukomponentový regulační systém, který byl objeven u *B. bronchiseptica*. Skládá se ze dvou proteinů – RisS sensorové kinázy a RisA transkripčního faktoru. Jsou kódovány geny *risS* a *risA*, které se nachází v operonu *ris* a u *B. bronchiseptica* jsou plně funkční, nicméně u *B. pertussis* je *risS* pouze pseudogen, což znamená, že pro svou aktivaci RisA potřebuje jiný protein (Stenson *et al.*, 2005). Strukturně se řadí k EnvZ-OmpR fosfotransfázovému systému, kde RisS je ortolog EnvZ a RisA ortolog OmpR. Tento systém využívají například gram-negativní bakterie rodu *Shigella*, *Salmonella* a *Escherichia*. U těchto bakterií ovlivňují expresi porinů rodiny Omp, v odpovědi na měnící se osmolaritu prostředí (Forst a Roberts, 1994). U rodu *Bordetella* však tato funkce nebyla prokázána a RisAS se uplatňuje při regulaci virulence, v odpovědi na oxidativní stres a perzistenci bakterií v plicích. Stejně jako u BvgAS transdukčního systému je pro aktivaci nutná fosforylace kinázy v cytoplazmě, která probíhá na histidinu 258, poté se aktivuje autofosforylační kaskáda přes další konzervované aminokyseliny

a příjemce fosfátu na proteinu RisA je aspartát 60 (Jungnitz *et al.*, 1998).

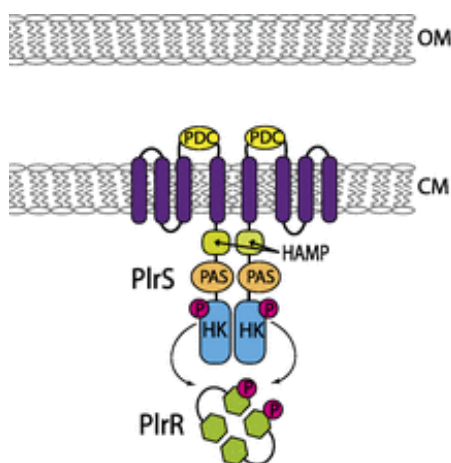
Jak už bylo řečeno výše, RisS je u *B. pertussis* pseudogen a je inaktivován bodovou mutací, která zapříčinila posun čtecího rámce. Pro fosforylaci RisA je nezbytná jiná kináza a to RisK, která se stejně jako RisS sekvenčně podobá EnvZ fosfotransferáze. Má konzervovanou HK doménu, kde se nachází histidin 274, příjemce fosfátu z ATP. Modulace síranem hořčnatým, nebo nikotinovou kyselinou se u RisAK neuplatňuje a celý systém je nezávislý na BvgAS (Chen *et al.*, 2017). Stejně jako protein BvgR se i RisA podílí na regulaci *vrgs*, ale zatímco BvgR je negativní regulátor těchto genů, RisA je důležitý pro jejich aktivaci. V promotoru *vrg6* se nachází sedminukleotidová sekvence AAAT(G/T)TA, ke které má protein RisA vysokou afinitu (Cróinn *et al.*, 2005).

I přes to, že systém RisAK není závislý na BvgAS, uplatňuje se jeho funkce při udržování fází Bvg⁺, Bvgⁱ a Bvg⁻. Podle transkriptomické analýzy se při změnách Bvg fází mění i regulace proteinem RisA. Při Bvg⁻ pozitivně reguluje *vrgs* a naopak negativně reguluje některé *vags*, jako jsou *prn*, *fhaB* a *cyaA*. Za nedomulujících podmínek, kdy je navozena fáze Bvgⁱ, respektive Bvg⁺, jsou naopak potlačeny geny *tviD* (gen pro kapsulární protein), *vrg6*, ale i *bipA* a aktivovány geny důležité pro motilitu a chemotaxi – *mot*, *flg* a *flh* (Coutte *et al.*, 2016).

3.3 PlrSR

V předchozích kapitolách byla popsána celá řada způsobů, jakými dokáže *B. pertussis* dosáhnout perzistentní kolonizace v tkáních hostitele, konkrétně v dolních cestách dýchacích. Pro tento účel je využíván i poslední diskutovaný dvoukomponentový systém PlrSR (persistence in the lower respiratory tract), který přidává na komplexitě regulační kaskádě patogenu. Lokus *plrSR* je vysoce konzervovaný mezi takzvanými klasickými druhy rodu *Bordetella* (tj. *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*) a kóduje dva proteiny, senzorovou kinázu PlrS a transkripční regulátor PlrR. Svojí strukturou se řadí k rodině fosfotransferázových systémů NtrYX, kde NtrY je kináza skládající se ze čtyř transmembránových, jedné periplazmatické a tří cytoplazmatických domén a NtrX je regulátor s Rec a DNA vazebnou doménou.

Bakterie pro orientaci v hostiteli využívají různých mechanismů. Jedním z nich je rozpoznání koncentrace plynů ve svém okolí a reakce na ni. Bakterie rodu *Bordetella* reagují na zvýšenou hladinu CO₂ v dolních cestách dýchacích zvýšenou expresí genů pro faktory virulence (Hester *et al.*, 2012). Zdá se, že právě tento signál má vliv i na systém PlrSR. Ukázalo se, že ač je BvgAS považován za hlavní a nejdůležitější regulační systém virulence, sám na perzistenci v plicích nestačí. Kmeny *B. pertussis* bez funkčního PlrSR nebyly schopné udržet a dokonce ani aktivovat Bvg⁺ fázi. Jakým způsobem ovlivňuje PlrR BvgAS však není známo (Bone *et al.*, 2017).



Obrázek 5: Stavba PlrSR dvoukomponentového systému – PlrS obsahuje čtyři domény lokalizované v cytoplazmatické membráně (CM), PDC doménu v periplazmě, HAMP, PAS a HK domény v cytoplazmě. PlrR svou Rec doménou na aspartát 52 přijímá fosfát a DNA vazebnou doménu využívá k regulaci transkripce. Oba proteiny fungují jako homodimery (převzato a upraveno Bone *et al.*, 2017).

4 Regulace virulence chaperonem Hfq a malými RNA

Důležitým nástrojem pro post-transkripční regulaci genové exprese u bakterií jsou malé nekódující molekuly RNA (sRNA), které dokáží odpovídat na mnohé změny prostředí zapínáním, nebo vypínáním různých genů. Aby byla zvýšena účinnost působení těchto molekul, využívají bakterie protein Hfq (z anglického **h**ost **f**actor **q**), který zprostředkovává tvorbu komplexů mezi sRNA a cílovou mRNA. Následující kapitola má za cíl shrnout jak obecné vlastnosti a mechanismy působení regulačních RNA v prokaryotních organizmech, tak i funkci a strukturu RNA chaperonu Hfq.

4.1 Regulace genové exprese nekódujícími RNA

Podle funkce lze všechny molekuly RNA rozdělit na kódující, sloužící jako templát pro proteosyntézu (mRNA) a nekódující, zastávající role ve struktuře ribozomu (rRNA), v přenosu aminoacylových zbytků (tRNA) a v regulaci genové exprese. Podle toho, z jakého lokusu jsou přepisovány, dělíme regulační RNA na dvě skupiny. Do první skupiny se řadí ty, které jsou kódovány v bezprostřední blízkosti jimi ovlivňovaného genu a působí *in cis* a do druhé skupiny patří ty, které jsou transkribovány nezávisle na cílovém genu a působí *in trans*.

V 5'UTR (nepřekládané oblasti na 5' konci) mRNA se kromě klíčové sekvence pro vazbu na ribozom (ribosome binding site – RBS) nachází i *cis* regulační RNA elementy. Zpravidla tvoří sekundární vlásenkovou strukturu, která zahrnuje RBS a inhibuje proteosyntézu. Patří sem riboswitch elementy, které se skládají z aptameru a expresní platformy. Po navázání ligandu na aptamer dojde k rozvolnění sekundární struktury, což je využíváno při udržování homeostázy prvků (kdy sám prvek je ligand). Ke změně z uzavřené do otevřené konformace lze využít i změny teploty, což využívají RNA termometry, kdy zvyšující se teplota uvolňuje inhibiční sekundární strukturu. To je využíváno pro orientaci bakterie v hostiteli, kdy je ovlivňována tvorba faktorů virulence, nebo při tvorbě proteinů teplotního šoku. *Cis* regulační RNA elementy se mohou přepisovat i z opačného vlákna DNA (antisense), než je cílový gen. V takovém případě dochází k vazbě regulační RNA na komplementární oblast mRNA, což způsobuje například atenuaci transkripce, inhibici translace, pozitivní i negativní ovlivnění stability mRNA a další (Brantl, 2007, Papenfort a Vogel, 2010).

Jako antisense RNA elementy nefungují jen *cis*-kódované regulační RNA. Stejným způsobem totiž fungují i *trans*-kódované RNA, které se liší tím, že jsou kódovány nezávisle na ovlivňovaném genu, jsou transkribovány pouze za určitých podmínek a mají nižší míru komplementarity s cílovou sekvencí, což jim ale umožňuje vazbu na více mRNA a tím i komplexnější odpověď na

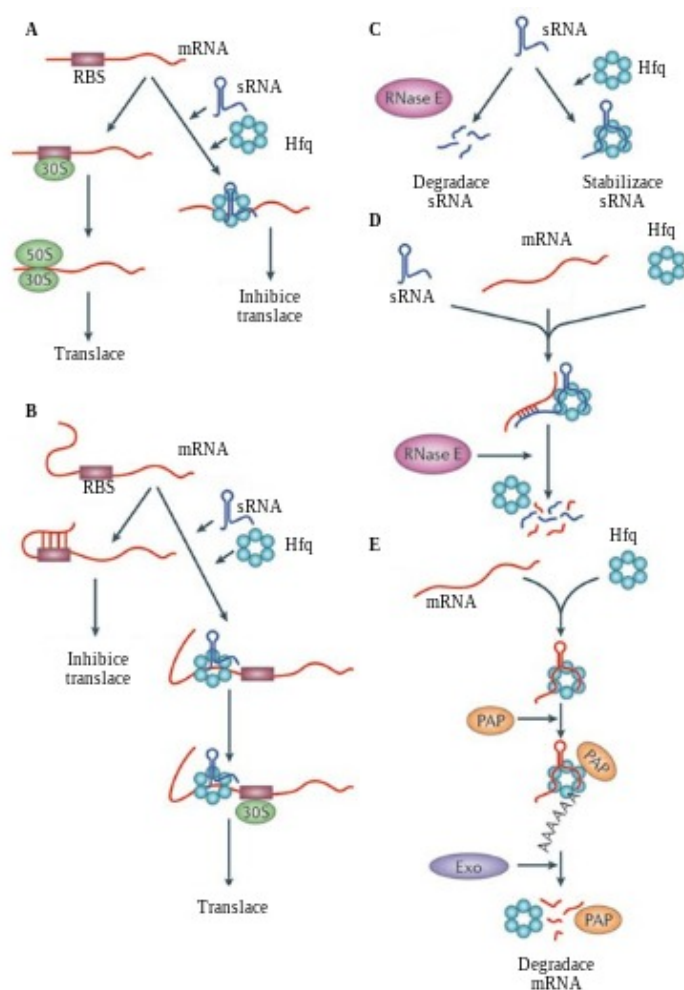
změny prostředí. Vzhledem k jejich relativně menší velikosti (50-300 bp) jsou označovány jako sRNA. Efekt působení je v naprosté většině negativní, nicméně mohou svojí vazbou narušit inhibiční sekundární strukturu a působit pozitivně. Kromě vazby na jinou RNA mohou sRNA interagovat s proteiny, jako například 6S RNA, která váže RNA polymerázu a ovlivňuje tak stresovou odpověď vyvolávanou faktory σ^S a σ^{70} . Vzhledem k menší specifitě vazeb je na místě zvyšování účinnosti tvorby vazebných komplexů. K tomu slouží RNA chaperon Hfq, který bude předmětem následujících kapitol (Gottesman, 2005, Papenfort a Vogel, 2010).

Malé RNA se mohou uplatňovat i v "imunitní odpovědi" bakterií na cizorodou RNA, nebo DNA. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) transkript je prekurzor malých crRNA, které vznikají štěpením endonukleázami rodiny Cas (Carte *et al.*, 2008). Takto vzniklé crRNA se vážou na cílovou DNA nebo RNA a zprostředkovávají tak jejich degradaci (Brouns *et al.*, 2008). Z naštěpených cizích nukleových kyselin vznikají nové spacer sekvence v CRISPR lokusu, které při opětovné infekci stejným agens fungují jako imunologická paměť (Barrangou *et al.*, 2007). Kromě ochranné funkce před invazivními nukleovými kyselinami (fágová DNA/RNA, nebo plazmidy) se systém CRISPR/Cas hojně využívá v genomovém inženýrství.

4.2 Chaperon Hfq

Posledním zmíněným systémem regulace genové exprese je post-transkripční regulátor RNA chaperon Hfq. Tento protein byl objeven v roce 1968, jako hostitelský faktor nezbytný pro replikaci RNA bakteriofága $Q\beta$ v buňkách *E. coli* (de Fernandez *et al.*, 1968). Patří do rodiny tzv. Sm-like (LSm) proteinů, které jsou funkčními i strukturními homology eukaryotních Sm proteinů (Valentin-Hansen *et al.*, 2004). Obě tyto skupiny proteinů obsahují Sm motiv, který je zodpovědný za vazbu RNA a za oligomerizaci (Hermann *et al.*, 1995). Sm proteiny tvoří heptamer a LSm, včetně Hfq tvoří hexamerní prstencovou strukturu (Møller *et al.*, 2002). U hexameru jsou rozlišovány tři strany – proximální, distální a laterální. Proximální strana má vysokou afinitu k AU bohatým oblastem RNA, každý protomer zprostředkovává vazbu s jedním nukleotidem a je specifická především pro interakci s sRNA (Schumacher, 2002). Distální strana váže tři nukleotidy na každém protomeru, upřednostňuje triplet ARN, kde R je purin a N je jakákoliv báze a podílí se zejména na tvorbě komplexu s mRNA (Link *et al.*, 2009). Laterální strana má roli v tvorbě komplexu sRNA-Hfq, dále při vazbě mRNA a následné disociaci Hfq z komplexu sRNA-Hfq-mRNA (Sauer *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013). RNA interagující s Hfq mají poměrně konzervovanou strukturu. Na 5' konci se nachází mRNA vazebná oblast,

následuje ji AU bohaté vazebné místo pro Hfq, za kterým se nachází vlásenková sekundární struktura a na 3' konci je zpravidla poly U oblast, alternativní vazebné místo pro Hfq. Vlásenková struktura plní roli transkripčního terminátoru, která by za normálních okolností byla degradována buněčnými enzymy, nicméně tomu brání vazba na Hfq (Vogel a Luisi, 2011). Hfq plní velice významnou roli v regulačních procesech, což může potvrzovat i to, že je to jeden z nejabundantnějších proteinů v exponenciální růstové fázi a počet jeho kopií se pohybuje v desítkách tisíc molekul na buňku (Azam *et al.*, 1999). Z výše zmíněných vlastností Hfq lze vyvodit, jakými způsoby bude ovlivňovat genovou expresi. Mechanismy regulace pomocí chaperonu Hfq a sRNA jsou názorně představeny v následujícím obrázku (6).



Obrázek 6: Mechanismy působení Hfq a sRNA – **A**| Tvorba komplexu sRNA-Hfq-mRNA má za následek inhibici translace, z důvodu obsazení RBS sRNA a vzniku inhibiční sekundární struktury. **B**| Opakem minulého případu je pozitivní regulace translace, kdy je již existující inhibiční struktura na mRNA odstraněna komplexem sRNA-Hfq. **C**| Vazba sRNA na Hfq brání degradaci sRNA RNázou E. **D**| Vazba mRNA na komplex sRNA-Hfq má za následek RNázou E zprostředkovanou degradaci. **E**| Hfq může fungovat jako stimulant polyadenylace mRNA pomocí poly A polymerázy (PAP), což má za následek degradaci mRNA exoribonukleázou (Exo) (převzato a upraveno Vogel a Luisi, 2011).

4.3 Interakce chaperonu Hfq s malými RNA u *B. pertussis*

Posttranskripční regulace RNA chaperonu Hfq se týká velké řady genů. U *B. pertussis* se podle transkriptomické analýzy jedná až o 10% všech exprimovaných proteinů exponenciální fáze. Celkem 368 genů, z nichž je 212 negativně a 156 pozitivně regulovaných, může být rozděleno do několika skupin. Geny související s energetickým metabolismem buňky jsou zastoupeny 20,9% v exponenciální růstové fázi, kategorie patogenita a adaptace zaujímá 13,6% a přenos informace 15,1% regulovaných genů ve stacionární fázi růstu. U kmene Δhfq s deletovaným genem pro Hfq byla jasně prokázána redukce exprese faktorů virulence z více, než 80%. Jako příklad lze uvést lokus *bsc*, kódující T3SS proteiny Bsp22, BopN a BopD. Dalším regulovaným genem je *tcfA*, který kóduje tracheální kolonizační faktor. Kmen Δhfq také vykazoval sníženou produkci ACT a nízkou hladinu sekrece u PTX a FHA. U genů *cyaA*, *ptxA* a *fhaB* ale nebyla prokázána snížená exprese a negativní regulace probíhá až na posttranslační úrovni (Bibova *et al.*, 2013, Bibova *et al.*, 2015). Komparativní studie transkriptomu a proteomu naopak ukazují zvýšenou expresi *ptx* a *ptl* genů u Δhfq kmenu. Vzhledem k celkově snížené virulenci tohoto kmene je to překvapivý výsledek a může to ukazovat na určitou kompenzaci za chybějící Hfq (Dienstbier *et al.*, 2019). Hfq ovlivňuje celou řadu genů, které se podílí na metabolismu železa a toleranci vůči stresovým podmínkám. Tyto vlastnosti jsou klíčové pro přežití bakterie ve fagozomu lidských makrofágů (Hayes *et al.*, 2020).

5 Závěr

Patogenní bakterie každoročně způsobí značné množství všech úmrtí na světě. I přes to, že černý kašel patří mezi onemocnění, kterým lze předejít vakcinací, incidence každoročně stoupá. Proto je na místě zvýšený zájem o výzkum jeho původce, bakterii *B. pertussis*. Studium faktorů virulence je třeba doplnit o zkoumání regulačních mechanismů, protože jedině tak lze porozumět chování patogenu v lidském organismu.

Z faktorů virulence jsou dnes již podrobně popsány toxiny ACT a PTX a adheziny PRN a FHA. Hrají nezanedbatelnou roli v kolonizaci hostitele a v následné perzistenci infekce na epitelu dolních cest dýchacích. Adheziny jsou nutné pro přichycení k povrchům buněk hostitele, což je nezbytné pro kolonizaci dýchacích cest. Následně se uplatňují toxiny, které poškozují řasinkový epitel plic, což se projevuje typickými příznaky onemocnění, jako je dávivý kašel. Role faktorů virulence také spočívá v modulaci imunitního systému hostitele, kdy napomáhají úniku patogenu před baktericidními aktivitami fagocytů.

Fáze nutné pro úspěšnou kolonizaci hostitele navozuje dvoukomponentový systém BvgAS, který je považován za hlavní regulátor virulence *B. pertussis*. Jeho regulon obsahuje geny pro faktory virulence, které jsou souhrnně označovány jako *vags* a *vrgs*. Patří sem faktory virulence PTX, ACT, T3SS, FHA, PRN a další. Nicméně doposud nejsou známy podmínky či ligandy, které by dokázaly aktivovat tento systém *in vivo*, což by se mělo stát předmětem dalšího výzkumu. Daleko méně popsané jsou systémy RisAS a PlrSR, které svou činností velmi dobře doplňují funkci BvgAS a poskytují tak další úroveň regulace. Nejasná je hlavně kooperace systémů mezi sebou.

Posledním diskutovaným mechanismem regulace virulence je post-transkripční kontrola genové exprese zprostředkovaná RNA chaperonem Hfq a malými regulačními sRNA. Výskyt tohoto proteinu byl prokázán u celé řady bakterií, kde působí jako post-transkripční regulátor genové exprese. Spolu s sRNA poskytuje komplexní odpovědi na změny prostředí, což se týká mimo jiné i virulence u *B. pertussis*. Delece genu pro Hfq má za následek výrazné snížení produkce a sekrece klíčových faktorů virulence, jako jsou PTX, ACT, FHA a T3SS. Kromě těchto genů ovlivňuje Hfq i geny související s odpovědí na oxidační stres, což se ukazuje být klíčové pro přežívání bakterie ve fagozomu makrofágů.

Znalost procesů regulujících genovou expresi a produkci faktorů důležitých pro virulenci *B. pertussis* nám může pomoci lépe porozumět patogenezí černého kašle a případně nalézt nové antigeny pro přípravu efektivnějších vakcín.

Seznam použité literatury

Přehledné články označeny na konci citace jako **review**.

1. T. A. Azam, A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda, A. Ishihama, Growth Phase-Dependent Variation in Protein Composition of the Escherichia coli Nucleoid. *Journal of Bacteriology* **181**, 6361–6370 (říj. 1999).
2. J. D. Bannan, M. J. Moran, J. I. MacInnes, G. A. Soltes, R. L. Friedman, Cloning and characterization of btr, a Bordetella pertussis gene encoding an FNR-like transcriptional regulator. *Journal of Bacteriology* **175**, 7228–7235 (1993).
3. R. Barrangou *et al.*, CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712 (břez. 2007).
4. E. M. Barry *et al.*, Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, cyaC, for activation. *Journal of Bacteriology* **173**, 720–726 (1991).
5. T. Basar *et al.*, The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of Bordetella pertussis adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *The Journal of biological chemistry* **274**, 10777–83 (16 dub. 1999).
6. C. Bauche *et al.*, Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *The Journal of biological chemistry* **281**, 16914–26 (25 červ. 2006).
7. D. Beier, B. Schwarz, T. M. Fuchs, R. Gross, In Vivo Characterization of the Unorthodox BvgS Two-component Sensor Protein of Bordetella pertussis. *Journal of Molecular Biology* **248**, 596–610 (květ. 1995).
8. I. Bibova *et al.*, The RNA Chaperone Hfq Is Required for Virulence of Bordetella pertussis. *Infection and Immunity* **81**, ed. J. B. Bliska, 4081–4090 (srp. 2013).
9. I. Bibova *et al.*, Transcriptional profiling of Bordetella pertussis reveals requirement of RNA chaperone Hfq for Type III secretion system functionality. *RNA Biology* **12**, 175–185 (ún. 2015).
10. M. A. Bone *et al.*, Bordetella PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E1519–E1527 (ún. 2017).

11. P. E. Boucher, A. E. Maris, M.-S. Yang, S. Stibitz, The Response Regulator BvgA and RNA Polymerase Subunit C-Terminal Domain Bind Simultaneously to Different Faces of the Same Segment of Promoter DNA. *Molecular Cell* **11**, 163–173 (led. 2003).
12. P. E. Boucher, M.-S. Yang, S. Stibitz, Mutational analysis of the high-affinity BvgA binding site in the fha promoter of *Bordetella pertussis*. *Molecular Microbiology* **40**, 991–999 (květ. 2001).
13. S. Brantl, Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *Current Opinion in Microbiology* **10**, 102–109 (dub. 2007), **review**.
14. S. J. J. Brouns *et al.*, Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* **321**, 960–964 (srp. 2008).
15. D. L. Burns, C. R. Manclark, Adenine nucleotides promote dissociation of pertussis toxin subunits. *eng, The Journal of biological chemistry* **261**, 4324–7 (9 břez. 1986).
16. N. H. Carbonetti, G. V. Artamonova, R. M. Mays, Z. E. V. Worthington, Pertussis Toxin Plays an Early Role in Respiratory Tract Colonization by *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* **71**, 6358–6366 (lis. 2003).
17. J. Carte, R. Wang, H. Li, R. M. Terns, M. P. Terns, Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes & Development* **22**, 3489–3496 (pros. 2008).
18. B. Clantin *et al.*, Structure of the Membrane Protein FhaC: A Member of the Omp85-TpsB Transporter Superfamily. *Science* **317**, 957–961 (srp. 2007).
19. D. Confer, J. Eaton, Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**, 948–950 (zář. 1982).
20. B. T. Cookson, A. N. Tyler, W. E. Goldman, Primary structure of the peptidoglycan-derived tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Biochemistry* **28**, 1744–1749 (ún. 1989).
21. P. A. Cotter, J. F. Miller, A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* bvgS gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Molecular Microbiology* **24**, 671–685 (květ. 1997).
22. P. A. Cotter, J. F. Miller, BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infection and immunity* **62**, 3381–3390 (1994).

23. L. Coutte *et al.*, The multifaceted RisA regulon of *Bordetella pertussis*. *Scientific reports* **6**, 32774 (2016).
24. J. L. Cowell, E. L. Hewlett, C. R. Manclark, Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. eng, *Infection and immunity* **25**, 896–901 (3 zář. 1979).
25. T. Ó. Cróinin, V. K. Grippe, T. J. Merkel, Activation of the *vrg6* promoter of *Bordetella pertussis* by RisA. *Journal of bacteriology* **187**, 1648–1658 (2005).
26. M. T. F. de Fernandez, L. Eoyang, J. T. August, Factor Fraction required for the Synthesis of Bacteriophage Q-RNA. *Nature* **219**, 588–590 (srp. 1968).
27. A. Dienstbier, F. Amman, D. Štipl, D. Petráčková, B. Večerek, Comparative Integrated Omics Analysis of the Hfq Regulon in *Bordetella pertussis*. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3073 (červ. 2019).
28. A. Diepold, J. P. Armitage, Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **370**, 20150020 (říj. 2015), **review**.
29. A. Diepold *et al.*, Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *The EMBO Journal* **29**, 1928–1940 (květ. 2010).
30. V. Dirix *et al.*, Monocyte-Derived Interleukin-10 Depresses the *Bordetella pertussis*- Specific Gamma Interferon Response in Vaccinated Infants. *Clinical and Vaccine Immunology* **16**, 1816–1821 (říj. 2009).
31. E. Dupré *et al.*, Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiology* **13**, 172 (2013).
32. E. Dupré *et al.*, Virulence Regulation with Venus Flytrap Domains: Structure and Function of the Periplasmic Moiety of the Sensor-Kinase BvgS. *PLOS Pathogens* **11**, ed. C. R. Roy, e1004700 (břez. 2015).
33. A. el Bayâ, R. Linnemann, L. von Olleschik-Elbheim, H. Robenek, M. Schmidt, Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *European journal of cell biology* **73**, 40–48, ISSN: 0171-9335 (květ. 1997).
34. S. Esposito *et al.*, Pertussis Prevention: Reasons for Resurgence, and Differences in the Current Acellular Pertussis Vaccines. *Frontiers in Immunology* **10** (čvc 2019), **review**.

35. K. Fabiánová, J. Zavadilová, M. Gašpárek, Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2018—epidemiologická situace. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie, SZÚ* **28** (2019).
36. A. Fauconnier *et al.*, Characterization of the type III secretion locus of *Bordetella pertussis*. *International Journal of Medical Microbiology* **290**, 693–705 (břez. 2001).
37. G. Fedele *et al.*, Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* Differently Modulate Human Dendritic Cell Functions Resulting in Divergent Prevalence of Th17-Polarized Responses. *The Journal of Immunology* **181**, 208–216 (červ. 2008).
38. R. Fiser *et al.*, Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2808–20 (5 ún. 2007).
39. T. A. Flak, W. E. Goldman, Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cellular Microbiology* **1**, 51–60 (čvc 1999).
40. S. Forst, D. Roberts, Signal transduction by the EnvZ-OmpR phosphotransfer system in bacteria. *Research in Microbiology* **145**, 363–373 (led. 1994).
41. R. L. Friedman, K. Nordensson, L. Wilson, E. Akporiaye, D. Yocum, Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and immunity* **60**, 4578–4585 (1992).
42. C. A. Geuijen, R. Willems, F. Mooi, The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infection and immunity* **64**, 2657–2665 (1996).
43. P. Glaser *et al.*, The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **2**, 19–30 (led. 1988).
44. P. Glaser, A. Danchin, D. Ladant, O. Barzu, A. Ullmann, *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *The Tokai journal of experimental and clinical medicine* **13 Suppl**, 239–252, ISSN: 0385-0005 (1988).
45. W. E. Goldman, D. G. Klapper, J. B. Baseman, Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infection and immunity* **36**, 782–94 (2 květ. 1982).
46. S. Gottesman, Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends in Genetics* **21**, 399–404 (čvc 2005), **review**.

47. J. Goure, P. Broz, O. Attree, G. Cornelis, I. Attree, Protective Anti-V Antibodies Inhibit Pseudomonas and Yersinia Translocon Assembly within Host Membranes. *The Journal of Infectious Diseases* **192**, 218–225 (čvc 2005).
48. E. R. Green, J. Mecsas, Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiology Spectrum* **4** (ún. 2016), **review**.
49. P. Gueirard, A. Druilhe, M. Pretolani, N. Guiso, Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin in Alveolar Macrophage Apoptosis during Bordetella pertussis Infection In Vivo. *Infection and Immunity* **66**, 1718–1725 (dub. 1998).
50. Q. Guo *et al.*, Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenyl cyclase toxin with calmodulin. *The EMBO Journal* **24**, 3190–3201 (zář. 2005).
51. M. Hackett *et al.*, Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in Escherichia coli. eng, *The Journal of biological chemistry* **270**, 20250–3 (35 zář. 1995).
52. M. Hackett, L. Guo, J. Shabanowitz, D. Hunt, E. Hewlett, Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *Science* **266**, 433–435 (říj. 1994).
53. J. A. Hayes *et al.*, Hfq modulates global protein pattern and stress response in Bordetella pertussis. *Journal of Proteomics* **211**, 103559 (led. 2020).
54. W. L. W. Hazenbos, C. A. W. Geuijen, B. M. van den Berg, F. R. Mooi, R. van Furth, Bordetella pertussis Fimbriae Bind to Human Monocytes via the Minor Fimbria) Subunit FimD. *Journal of Infectious Diseases* **171**, 924–929 (dub. 1995).
55. L. N. Heiss, S. A. Moser, E. R. Unanue, W. E. Goldman, Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. eng, *Infection and immunity* **61**, 3123–8 (8 srp. 1993).
56. H. Hermann *et al.*, snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *The EMBO Journal* **14**, 2076–2088 (květ. 1995).
57. J. Herrou *et al.*, Periplasmic domain of the sensor-kinase BvgS reveals a new paradigm for the Venus flytrap mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 17351–17355 (zář. 2010).
58. S. E. Hester, M. Lui, T. Nicholson, D. Nowacki, E. T. Harvill, Identification of a CO₂ Responsive Regulon in Bordetella. *PLoS ONE* **7**, ed. N. E. Freitag, e47635 (říj. 2012).

59. E. Hoiczky, G. Blobel, Polymerization of a single protein of the pathogen *Yersinia enterocolitica* into needles punctures eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 4669–4674 (dub. 2001).
60. Y. Horiguchi *et al.*, *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 11623–11626 (říj. 1997).
61. C. J. Hueck, Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 379–433 (červ. 1998), **review**.
62. I. G. Charles *et al.*, Molecular cloning and characterization of protective outer membrane protein P.69 from *Bordetella pertussis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 3554–3558 (květ. 1989).
63. Q. Chen, V. Ng, J. M. Warfel, T. J. Merkel, S. Stibitz, Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by RisA Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase RisK. *Journal of Bacteriology* **199**, ed. A. M. Stock (srp. 2017).
64. J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, F. Gusovsky, Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10689–10692 (dub. 1999).
65. C. S. Inatsuka *et al.*, Pertactin Is Required for *Bordetella* Species To Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infection and Immunity* **78**, 2901–2909 (dub. 2010).
66. H. Jungnitz, N. P. West, M. J. Walker, G. S. Chhatwal, C. A. Guzmán, A second two-component regulatory system of *Bordetella bronchiseptica* required for bacterial resistance to oxidative stress, production of acid phosphatase, and in vivo persistence. *Infection and Immunity* **66**, 4640–4650 (1998).
67. M. Junker *et al.*, Pertactin beta-helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 4918–4923 (břez. 2006).
68. J. Kamanova *et al.*, Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by RhoA Inhibition and Unproductive Ruffling. *The Journal of Immunology* **181**, 5587–5597 (říj. 2008).
69. T. Katada, M. Ui, ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *The Journal of biological chemistry* **257**, 7210–6 (12 červ. 1982).

70. A. Kimura, K. Mountzouros, D. Relman, S. Falkow, J. Cowell, Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infection and immunity* **58**, 7–16 (1990).
71. A. J. King *et al.*, Role of the polymorphic region 1 of the Bordetella pertussis protein pertactin in immunity. *Microbiology* **147**, 2885–2895 (lis. 2001).
72. S. M. Kinnear, R. R. Marques, N. H. Carbonetti, Differential Regulation of Bvg-Activated Virulence Factors Plays a Role in Bordetella pertussis Pathogenicity. *Infection and Immunity* **69**, ed. V. J. DiRita, 1983–1993 (dub. 2001).
73. S. I. Kotob, S. Z. Hausman, D. L. Burns, Localization of the promoter for the ptl genes of Bordetella pertussis, which encode proteins essential for secretion of pertussis toxin. *Infection and Immunity* **63**, 3227–3230, ISSN: 0019-9567 (1995).
74. T. Kubori, Supramolecular Structure of the Salmonella typhimurium Type III Protein Secretion System. *Science* **280**, 602–605 (dub. 1998).
75. A. Kuwae, F. Momose, K. Nagamatsu, Y. Suyama, A. Abe, BteA Secreted from the Bordetella bronchiseptica Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. *PLOS ONE* **11**, ed. F. Frischknecht, e0148387 (ún. 2016).
76. A. Kuwae *et al.*, BopC Is a Novel Type III Effector Secreted by Bordetella bronchiseptica and Has a Critical Role in Type III-dependent Necrotic Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 6589–6600 (led. 2006).
77. D. Ladant *et al.*, Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *The Journal of biological chemistry* **264**, 4015–20 (7 břez. 1989).
78. E. Leininger *et al.*, Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**, 345–349 (led. 1991).
79. T. M. Link, P. Valentin-Hansen, R. G. Brennan, Structure of Escherichia coli Hfq bound to polyriboadenylate RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 19292–19297 (lis. 2009).
80. B. Linz, L. Ma, I. Rivera, E. T. Harvill, Genotypic and phenotypic adaptation of pathogens. *Current Opinion in Infectious Diseases* **32**, 223–230 (červ. 2019).

81. J. Masin *et al.*, Acylation of Lysine 860 Allows Tight Binding and Cytotoxicity of Bordetella Adenylate Cyclase on CD11b-Expressing Cells†. *Biochemistry* **44**, 12759–12766 (zář. 2005).
82. S. Mattoo, J. F. Miller, P. A. Cotter, Role of Bordetella bronchiseptica Fimbriae in Tracheal Colonization and Development of a Humoral Immune Response. *Infection and Immunity* **68**, ed. D. L. Burns, 2024–2033 (dub. 2000).
83. P. McGuirk, K. H. Mills, Direct anti-inflammatory effect of a bacterial virulence factor: IL-10-dependent suppression of IL-12 production by filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. *European journal of immunology* **30**, 415–422 (2000).
84. A. R. Melton, A. Weiss, Characterization of environmental regulators of Bordetella pertussis. *Infection and immunity* **61**, 807–815 (1993).
85. J. A. Melvin, E. V. Scheller, J. F. Miller, P. A. Cotter, Bordetella pertussis pathogenesis: current and future challenges. *Nature Reviews Microbiology* **12**, 274–288 (břez. 2014), **review**.
86. T. J. Merkel, C. Barros, S. Stibitz, Characterization of the bvgR Locus of Bordetella pertussis. *Journal of Bacteriology* **180**, 1682–1690 (dub. 1998).
87. T. J. Merkel, P. E. Boucher, S. Stibitz, V. K. Grippe, Analysis of bvgR Expression in Bordetella pertussis. *Journal of Bacteriology* **185**, 6902–6912 (pros. 2003).
88. T. J. Merkel, S. Stibitz, J. M. Keith, M. Leef, R. Shahin, Contribution of Regulation by the bvgLocus to Respiratory Infection of Mice by Bordetella pertussis. *Infection and Immunity* **66**, ed. P. E. Orndorff, 4367–4373 (zář. 1998).
89. A. Y. Mitrophanov, E. A. Groisman, Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development* **22**, 2601–2611 (řij. 2008), **review**.
90. T. Møller *et al.*, Hfq. *Molecular Cell* **9**, 23–30 (led. 2002).
91. F. R. Mooi *et al.*, Characterization of fimbrial subunits from Bordetella species. *Microbial Pathogenesis* **2**, 473–484 (červ. 1987).
92. K. Moon *et al.*, The BvgAS Regulon of Bordetella pertussis. *mBio* **8**, ed. R. Rappuoli (řij. 2017).
93. J. Morova, R. Osicka, J. Masin, P. Sebo, RTX cytotoxins recognize $\alpha 2$ integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5355–5360 (břez. 2008).

94. J. Moss *et al.*, Activation by thiol of the latent NAD glycohydrolase and ADP-ribosyltransferase activities of Bordetella pertussis toxin (islet-activating protein). eng, *The Journal of biological chemistry* **258**, 11879–82 (19 říj. 1983).
95. H.-H. Mu, M. A. Cooley, W. A. Sewell, Studies on the lymphocytosis induced by pertussis toxin. *Immunology and Cell Biology* **72**, 267–270 (červ. 1994).
96. C. A. Mueller, The V-Antigen of Yersinia Forms a Distinct Structure at the Tip of Injectisome Needles. *Science* **310**, 674–676 (říj. 2005).
97. Y. Nagai *et al.*, Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology* **3**, 667–672 (červ. 2002).
98. K. Nagamatsu *et al.*, Bordetella evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 3073–3088 (pros. 2009).
99. H. Nogawa, A. Kuwae, T. Matsuzawa, A. Abe, The Type III Secreted Protein BopD in Bordetella bronchiseptica Is Complexed with BopB for Pore Formation on the Host Plasma Membrane. *Journal of Bacteriology* **186**, 3806–3813 (červ. 2004).
100. K. Papenfort, J. Vogel, Regulatory RNA in Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe* **8**, 116–127 (čvc 2010), **review**.
101. I. A. Parfentjev, M. A. Goodline, Histamine shock in mice sensitized with hemophilus pertussis vaccine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **92**, 411–413, ISSN: 0022-3565 (1948).
102. D. Petráčková *et al.*, Transcriptional profiling of human macrophages during infection with Bordetella pertussis. *RNA Biology* **17**, 731–742 (ún. 2020).
103. S. M. Prasad, Y. Yin, E. Rodzinski, E. I. Tuomanen, H. Masure, Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from Bordetella pertussis. *Infection and Immunity* **61**, 2780–2785 (1993).
104. A. Preston *et al.*, Genetic Basis for Lipopolysaccharide O-Antigen Biosynthesis in Bordetellae. *Infection and Immunity* **67**, ed. R. N. Moore, 3763–3767 (srp. 1999).
105. J. Radics, L. Königsmaier, T. C. Marlovits, Structure of a pathogenic type 3 secretion system in action. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**, 82–87 (pros. 2013).

106. D. A. Relman, M. Domenighini, E. Tuomanen, R. Rappuoli, S. Falkow, Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 2637–2641 (dub. 1989).
107. D. A. Relman *et al.*, Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha M\beta 2$, CD11b- CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1375–1382 (1990).
108. R. V. Romero *et al.*, *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin itself does not trigger anti-inflammatory interleukin-10 production by human dendritic cells. *International Journal of Medical Microbiology* **306**, 38–47 (led. 2016).
109. E. Sauer, S. Schmidt, O. Weichenrieder, Small RNA binding to the lateral surface of Hfq hexamers and structural rearrangements upon mRNA target recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 9396–9401 (květ. 2012).
110. V. Scarlato, A. Prugnola, B. Aricó, R. Rappuoli, Positive transcriptional feedback at the *bvg* locus controls expression of virulence factors in *Bordetella pertussis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 6753–6757 (1990).
111. G. Seydlova *et al.*, The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 8048–8058 (břez. 2017).
112. G. Schmidt, U. M. Goehring, J. Schirmer, M. Lerm, K. Aktories, Identification of the C-terminal part of *Bordetella* dermonecrotic toxin as a transglutaminase for rho GTPases. *The Journal of biological chemistry* **274**, 31875–81 (45 lis. 1999).
113. M. A. Schumacher, Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *The EMBO Journal* **21**, 3546–3556 (čvc 2002).
114. P. E. Stein *et al.*, Structure of a pertussis toxin–sugar complex as a model for receptor binding. *Nature Structural & Molecular Biology* **1**, 591–596 (zář. 1994).
115. P. E. Stein *et al.*, The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45–57 (led. 1994).
116. T. H. Stenson, A. G. Allen, J. A. Al-Meer, D. Maskell, M. S. Peppler, *Bordetella pertussis* *risA*, but not *risS*, is required for maximal expression of *Bvg*-repressed genes. *Infection and immunity* **73**, 5995–6004 (2005).
117. S. Stibitz, A. A. Weiss, S. Falkow, Genetic analysis of a region of the *Bordetella pertussis* chromosome encoding filamentous hemagglutinin and the pleiotropic regulatory locus *vir*. *Journal of Bacteriology* **170**, 2904–2913 (1988).

118. K. E. Stockbauer, B. Fuchslocher, J. F. Miller, P. A. Cotter, Identification and characterization of BipA, a Bordetella Bvg-intermediate phase protein. *Molecular Microbiology* **39**, 65–78 (led. 2001).
119. M. Tamura *et al.*, Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**, 5516–5522 (říj. 1982).
120. S. Teruya *et al.*, Bordetella Dermonecrotic Toxin Is a Neurotropic Virulence Factor That Uses CaV3.1 as the Cell Surface Receptor. *mBio* **11**, ed. J. T. Barbieri, R. Rappuoli (břez. 2020).
121. T. Toyota *et al.*, Islet activating protein (IAP) derived from the culture supernatant fluid of Bordetella pertussis: Effect on spontaneous diabetic rats. *Diabetologia* **14**, 319–323 (květ. 1978).
122. E. Tuomanen *et al.*, Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of Bordetella pertussis to human ciliated respiratory epithelial cells. *The Journal of Experimental Medicine* **168**, 267–277 (čvc 1988).
123. M. A. Uhl, J. F. Miller, Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the Bordetella pertussis BvgAS phosphorelay. *The EMBO Journal* **15**, 1028–1036 (břez. 1996).
124. M. A. Uhl, J. F. Miller, Central Role of the BvgS Receiver as a Phosphorylated Intermediate in a Complex Two-component Phosphorelay. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 33176–33180 (pros. 1996).
125. P. Valentin-Hansen, M. Eriksen, C. Udesen, The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology* **51**, 1525–1533 (ún. 2004), **review**.
126. J. Vogel, B. F. Luisi, Hfq and its constellation of RNA. *Nature Reviews Microbiology* **9**, 578–589 (srp. 2011), **review**.
127. J. Vojtova-Vodolanova *et al.*, Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *The FASEB Journal* **23**, 2831–2843 (květ. 2009).
128. A. Weiss, F. D. Johnson, D. L. Burns, Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 2970–2974 (dub. 1993).
129. R. J. L. Willems, H. G. J. Heide, F. R. Mooi, Characterization of a Bordetella pertussis fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Molecular Microbiology* **6**, 2661–2671 (zář. 1992).

130. S. Wright, R. Ramos, P. Tobias, R. Ulevitch, J. Mathison, CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**, 1431–1433 (zář. 1990).
131. M. H. Yuk, E. T. Harvill, P. A. Cotter, J. F. Miller, Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the Bordetella type III secretion system. *Molecular Microbiology* **35**, 991–1004 (břez. 2000).
132. F. R. Zaretzky, M. C. Gray, E. L. Hewlett, Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Molecular Microbiology* **45**, 1589–1598 (zář. 2002).
133. A. Zhang, D. J. Schu, B. C. Tjaden, G. Storz, S. Gottesman, Mutations in Interaction Surfaces Differentially Impact E. coli Hfq Association with Small RNAs and Their mRNA Targets. *Journal of Molecular Biology* **425**, 3678–3697 (říj. 2013).