

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.



**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Ivana Čurnová**

**Využití lidské monocytární buněčné linie THP-1 pro studium patogeneze  
původce černého kašle *Bordetella pertussis***

**Application of human monocytic cell line THP-1 for study of pathogenesis  
in whooping cough agent *Bordetella pertussis***

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Denisa Petráčková, Ph.D.

Praha, 2023

Tato diplomová práce byla vypracována na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky v Praze.

**Prohlášení:**

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

V Praze, 5. 1. 2023

Podpis:.....  
Ivana Čurnová

**Poděkování:**

*Nejprve bych chtěla poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Denise Petráčkové, Ph.D. za její trpělivost a čas, který mi věnovala při psaní diplomové práce, ale také za návrhy a pomoc při řešení infekčních experimentů.*

*Dále bych ráda poděkovala RNDr. Branislavu Večerkovi, CSc., za možnost pracovat v Laboratoři post-transkripční kontroly genové exprese (MBÚ AV ČR, v.v.i.), ale také za návrhy a konzultaci infekčních experimentů. Také bych ráda poděkovala všem kolegům z laboratoře, kteří mi pomáhali při řešení experimentů a připravovali kmeny, které jsem testovala.*

*Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům za pomoc a vytvoření příjemných podmínek pro mé studium a psaní této práce.*

## Abstrakt

*Bordetella pertussis* je striktně lidský patogen, který způsobuje vysoce nakažlivé respirační onemocnění zvané černý kašel, které je v současné době na vzestupu. Tato bakterie byla dlouhou dobou považována za extracelulárního patogena, nicméně v současné době se ukazuje její schopnost odpovídat na baktericidní aktivitu makrofágů a přežít v časných endozomech makrofágů. Intracelulární přežívání *B. pertussis* v makrofázích se zkoumá jak na lidské monocytární buněčné linii THP-1, tak na primárních makrofázích z lidských dárců. V této práci jsme se zaměřili na THP-1 infekční model a to hlavně na časnou fázi infekce. Dříve provedená transkriptomická studie ukázala významně ovlivněné geny *B. pertussis* intracelulárně se vyskytující v THP-1 makrofázích. Pro tuto práci byly vybrány geny, které nějakým způsobem souvisí s přežíváním uvnitř makrofágů či toto přežívání významně ovlivňují. Vliv mutace v těchto genech byl testován jak na míře cytotoxicity k THP-1 buňkám, tak s tím související množství přeživších bakterií uvnitř makrofágů. Méně cytotoxický byl deleční kmen ve dvou genech pro cystein dioxygenázu (*BP2871* a *BP3011*) a mutantní kmen trvale se vyskytující v Bvg<sup>+</sup> fázi. Sledování vlivu opsonizace na intracelulární přežívání nepřineslo tak jasné výsledky. Vliv séra na *B. pertussis* se zdá být více komplexní. Nicméně se podařilo optimalizovat infekční model, na kterém lze otestovat i další podmínky či jiné mutací kmeny.

**Klíčová slova:** *Bordetella pertussis*, THP-1 buněčná linie, infekční model, intracelulární přežívání, faktory virulence, opsonizace.

## Abstract

*Bordetella pertussis* is strictly human pathogen that causes severe infection of the respiratory tract known as whooping cough, which is currently on the rise. *B. pertussis* was considered as an extracellular pathogen for a very long time. Recently it was shown the ability of *B. pertussis* to survive inside early endosomes of macrophages. This ability is studied in the human monocytic cell line THP-1 and also in primary macrophages from human donors. This diploma thesis is focused on THP-1 infectious model and mainly for the early phase of infection. A previously performed transcriptomic study showed significantly affected genes of *B. pertussis* during intracellular survival in THP-1 macrophages. In this study, we selected genes that are in some way related to intracellular survival inside human macrophages or have significantly effect for intracellular survival. The effect of the mutation in these genes was tested both on the level of cytotoxicity to THP-1 cells and the related number of surviving bacteria inside the macrophages. The deletion strain in two genes for cysteine dioxygenase (*BP2871* and *BP3011*) and the mutant strain allocated in the Bvg<sup>+</sup> phase were less cytotoxic than the control strain. Monitoring the effect of opsonization to intracellular survival have not such clear results. The effect of serum to *B. pertussis* seems to be more complex. However, we optimized the infection model, on which other conditions or other mutant strains can be tested.

**Key words:** *Bordetella pertussis*, THP-1 cell line, infection model, intracellular survival, virulence factors, opsonization.

## Seznam zkratek

ACT	<u>a</u> denylate <u>c</u> yclase <u>t</u> oxin	adenylát cyklázový toxin
aP	<u>a</u> cellular <u>p</u> ertussis <u>v</u> accines	acelulární pertusová vakcína
APC	<u>a</u> ntigen- <u>p</u> resenting <u>c</u> ell	antigen prezentující buňka
ATP	<u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate	adenosintrifosfát
BG	<u>B</u> ordet- <u>G</u> engou agar	Bordet-Gengou agar
Bvg	<u>B</u> ordetella <u>v</u> irulence <u>g</u> ene	gen virulence <i>Bordetelly</i>
cAMP	<u>c</u> yclic <u>a</u> denosine <u>m</u> onophosphate	cyklický adenosinmonofosfát
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation	skupina povrchových markerů buněk
c-di-GMP	<u>c</u> yclic <u>d</u> iguanylat	cyklický diguanylát
CFU	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nits	jednotky tvořící kolonie
CLIP	<u>c</u> lass II- <u>a</u> ssoiated <u>i</u> nvariant <u>c</u> hain <u>p</u> eptide	peptid invariantního řetězce <i>asociovaný s</i> třídou II
Co	<u>c</u> obalt	kobalt
DC	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell	dendritická buňka
FCS	<u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum	fetální telecí sérum
Fe	<u>f</u> errum	železo
FHA	<u>f</u> ilamentous <u>h</u> emagglutinin	filamentózní hemagglutinin
Fim	<u>f</u> imbrie	fimbrie
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein	zelený fluorescenční protein
CHA	<u>c</u> harcoal agar	charcoal agar
IFN	<u>i</u> nter <u>f</u> eron	interferon
Ig	<u>i</u> munoglobulin	protilátka
IL	<u>i</u> nter <u>l</u> eukin	interleukin
LPS	<u>l</u> ipopolysaccharide	lipopolysacharid
MAC	<u>m</u> embrane <u>a</u> ttact <u>c</u> omplex	membranolytický komplex
MBL	<u>m</u> annose <u>b</u> inding <u>l</u> ectin	manózu vazající lektin
MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex	hlavní histokompatibilitní komplex
Mn	<u>m</u> anganese	mangan
MOI	<u>m</u> ultiplicity <u>o</u> f <u>i</u> nfection	multiplicita infekce
NADPH	<u>n</u> icotinamide <u>a</u> denine <u>d</u> inucleotide <u>p</u> hosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
OD	<u>o</u> ptical <u>d</u> ensity	optická denzita
PAMP	<u>p</u> athogen- <u>a</u> ssoiated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns	molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenů
PMA	<u>p</u> horbol-12- <u>m</u> yrystate-13- <u>a</u> cetate	forbol-12-myristát-13-acetát
PRN	<u>p</u> ertaktin	pertaktin



PTX	<u>p</u> ertussis <u>t</u> oxin	pertusový toxin
qPCR	<u>q</u> uantitative <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
ROS	<u>r</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies	reaktivní formy kyslíku
SA	<u>a</u> ctive <u>s</u> erum	aktivní sérum
SI	<u>i</u> nactivated <u>s</u> erum	inaktivované sérum
SPI	<u>S</u> almonella <u>p</u> atogenicity island	ostrov patogenity
SS	<u>S</u> tainer- <u>S</u> cholte medium	Stainer-Scholte medium
T3SS	<u>T</u> ype <u>III</u> <u>s</u> ecretion <u>s</u> ystem	sekreční systém typu 3
T6SS	<u>T</u> ype <u>VI</u> <u>s</u> ecretion <u>s</u> ystem	sekreční systém typu 6
TGF	<u>t</u> ransforming <u>g</u> rowth <u>f</u> actor	transformující růstový faktor
Th	<u>T</u> <u>h</u> elper cells	pomocné T lymfocyty
TLR	<u>T</u> oll <u>l</u> ike <u>r</u> eceptor	Toll like receptor
TNF	<u>t</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor	faktor nádorové nekrózy
TRM	<u>t</u> issue- <u>r</u> esident <u>m</u> emory T cells	rezidentní tkáňové T lymfocyty
vrgs	<u>v</u> irulence- <u>r</u> epressed <u>g</u> enes	geny potlačené virulencí
wP	<u>w</u> hole-cell pertussis vaccine	celobuněčná pertusová vakcína

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	12
<b>2. Literární přehled</b> .....	13
2.1. Rod <i>Bordetella</i> .....	13
2.1.1. Klasické druhy rodu <i>Bordetella</i> .....	13
2.1.1.1. Patogeneze onemocnění u <i>Bordetella pertussis</i> .....	14
2.1.2. Faktory virulence a jejich regulace .....	15
2.2. Imunitní odpověď hostitele na přítomnost patogena .....	16
2.2.1. Oponizace bakterií a vliv komplementu .....	18
2.2.2. Modelová buněčná linie THP-1 .....	21
2.3. Intracelulární přežívání bakterií rodu <i>Bordetella</i> , <i>Mycobacterium</i> a <i>Salmonella</i> .....	22
2.3.1. Intracelulární přežívání <i>Bordetella bronchiseptica</i> v parazitických amébách .....	25
2.3.2. Intracelulární přežívání <i>B. pertussis</i> .....	27
2.3.2.1. Infekční modely pro intracelulární přežívání <i>B. pertussis</i> .....	28
2.3.2.1.1. Regulace exprese bakteriálních genů během intracelulárního přežívání zkoumána na THP-1 buňkách .....	30
2.3.2.1.1.1. Geny <i>B. pertussis</i> se zvýšenou expresí během intracelulárního přežívání .....	31
2.3.2.1.1.2. Geny <i>B. pertussis</i> se sníženou expresí během intracelulárního přežívání .....	34
<b>3. Materiál a metody</b> .....	35
3.1. Materiál .....	35
3.1.1. Biologický materiál .....	35
3.1.1.1. <i>Bordetella pertussis</i> .....	35
3.1.1.2. Lidská buněčné linie – THP-1 .....	36
3.1.2. Kultivační půdy .....	36
3.1.2.1. Pevné půdy .....	36
3.1.2.2. Komplexní kultivační médium pro růst <i>B. pertussis</i> .....	37
3.1.2.3. Komplexní kultivační médium pro THP-1 buňky .....	38
3.1.3. Pufry .....	38
3.1.4. Chemikálie .....	39
3.1.4.1. Séra .....	39
3.1.5. Technické zázemí .....	39
3.1.5.1. Sterilizace .....	39
3.1.5.2. Měření pH .....	40
3.2. Metody .....	41
3.2.1. Kultivace <i>B. pertussis</i> .....	41
3.2.1.1. Měření růstové křivky bakteriální kultury .....	41

3.2.2. THP-1 buňky .....	41
3.2.2.2. Počítání THP-1 buněk .....	42
3.2.2.3. Diferenciace THP-1 buněk .....	42
3.2.3. Infekce makrofágů THP-1 divokými kmeny a delečními mutanty <i>B. pertussis</i> .....	42
3.2.3.1. Fluorescenční mikroskopie .....	44
3.2.3.2. CFU .....	45
3.2.3.3. WST-1 assay .....	45
3.2.3.4. Infekce makrofágů THP-1 opsonizovanými <i>B. pertussis</i> .....	46
<b>4. Cíle práce</b> .....	<b>48</b>
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>49</b>
5.1. Růstová charakteristika kmenů <i>B. pertussis</i> použitých při infekčních experimentech .....	49
5.2. THP-1 monocytární buněčná linie .....	50
5.3. THP-1 infekční model .....	51
5.4. Přežívání bakterie <i>Bordetella pertussis</i> v THP-1 buňkách .....	53
5.4.1. Vliv fyziologického stavu bakterie před infekcí na průběh přežívání v hostiteli .....	54
5.4.2. Míra přežívání divokých kmenů <i>B. pertussis</i> v THP-1 buňkách .....	56
5.4.3. Míra přežívání mutantních kmenů <i>B. pertussis</i> v hostiteli .....	58
5.4.3.1. Mutace v genech regulujících virulenci bakterie <i>B. pertussis</i> – bvg regulon a RisAK dvoukomponentový systém .....	58
5.4.3.2. Mutace v genech pro cystein dioxygenázu u <i>B. pertussis</i> ( $\Delta BP2871$ , $\Delta BP3011$ ) .....	60
5.4.4. Vliv opsonizace a komplementu na přežívání <i>B. pertussis</i> v THP-1 buňkách .....	62
5.4.4.1. Testování vlivu séra na životaschopnost <i>B. pertussis</i> .....	62
5.4.4.2. Vliv opsonizace bakterií na míru přežívání v makrofázích THP-1 a jejich cytotoxický účinek na hostitele .....	64
5.4.4.2. Vliv opsonizace bakterií na efektivitu fagocytózy THP-1 buněk .....	69
<b>6. Diskuze</b> .....	<b>72</b>
<b>7. Souhrn</b> .....	<b>79</b>
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	<b>81</b>

# 1. Úvod

Bakterie rodu *Bordetella* obsahují velké množství patogenních i nepatogenních zástupců, z nichž nejznámější je *B. pertussis*, která je tzv. epidemickým klonem. Jedná se o klonální linii, která vznikla před méně než 100 000 lety z jiného druhu, se kterým stále sdílí mnoho společných vlastností, v tomto případě z *B. bronchiseptica*. *B. pertussis* je striktně lidský patogen, který kolonizuje horní dýchací cesty a způsobuje onemocnění zvané černý kašel. Jelikož je v posledních letech i přes vysokou míru proočkovanosti toto onemocnění opět na vzestupu, zvyšuje se zájem o studium jeho původce, především o jeho interakce s imunitním systémem a hostitelskými buňkami.

Dlouhou dobu se předpokládalo, že *B. pertussis* je extracelulárním patogenem. Od 2. poloviny 20 století se však začala zkoumat schopnost bakterie přežít intracelulárně v hostitelských buňkách. Tato vlastnost se zkoumá především na makrofázích, které žijí v lidském těle poměrně dlouhou dobu a mohly by sloužit jako rezervoár bakterií během infekce a přispívat migraci bakterií a kolonizaci dýchacího traktu hostitele.

*B. bronchiseptica*, z které se *B. pertussis* vyvinula, má svůj životní cyklus spojený s přežíváním v parazitických amébách, které jsou strukturně velmi podobné makrofágům. Po kolonizaci hostitele je dokonce schopná přežít v hostitelských buňkách. Při interakci s parazitickými amébami a pravděpodobně i hostitelskými buňkami přechází *B. bronchiseptica* do avirulentní Bvg<sup>-</sup> fáze, která přispívá vyhýbání se imunitnímu systému. Ukazuje se, že *B. pertussis* volí pravděpodobně stejnou strategii.

Cílem této práce bylo ověření životaschopnosti mutantních kmenů *B. pertussis* při intracelulárním přežívání v THP-1 makrofázích, vycházejícího z hypotézy, že přežívání *B. pertussis* v buňkách imunitního systému je součástí životního cyklu bakterie a umožňuje jí vyhnout se akutní imunitní odpovědi hostitele. Testované kmeny obsahovaly mutaci v genech, jejichž exprese byla výrazně modulována během intracelulárního přežívání a mohly by hrát důležitou roli v intracelulárním přežívání. Tato práce se také zaměřuje na vliv protilátek a komplementu obsažených v lidském séru na intracelulární přežívání *B. pertussis*.

## 2. Literární přehled

### 2.1. Rod *Bordetella*

Bakterie rodu *Bordetella* jsou gram negativní kokobacily patřící do čeledi Alcaligenaceae. Jedná se o taxonomicky rozsáhlou skupinu obsahující přes 70 druhů. Nejvíce je prozkoumáno kolem 16 druhů, z nichž většina může být patogenní i pro lidského hostitele. Nicméně velké množství druhů je nepatogenních a vyskytuje se v prostředí (např. půda, voda). Mezi druhy tohoto rodu doposud popsané pouze z environmentálních zdrojů patří například *B. petrii* a *B. muralis* (Bridel *et al.* 2022; Tazato *et al.* 2015, Hamidou Soumana *et al.* 2017). V průběhu let se z těchto nepatogenních druhů pravděpodobně vyvinula i malá část druhů patogenních. Důkazem by mohla být existence patogenních druhů jako např. bakterie *B. bronchiseptica*, která má stále zachovanou schopnost růst a množit se v environmentálním prostředí, které bakterii slouží i jako rezervoár. Nakonec existují druhy, které mají svůj životní cyklus spojený pouze se zvířecím či lidským hostitelem – např. *B. pertussis* či *B. parapertussis*, které se vyvinuly z *B. bronchiseptica* (Hamidou Soumana *et al.* 2017).

#### 2.1.1. Klasické druhy rodu *Bordetella*

Nejvíce studovanými zástupci rodu *Bordetella* jsou *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica*.

Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je bakterie *B. pertussis*. Jedná se o striktně lidského patogena, který kolonizuje řasinkový epitel dýchacích cest a způsobuje respirační onemocnění zvané černý kašel.

Kmeny druhu *B. parapertussis* jsou řazeny do dvou podskupin. Zástupci první podskupiny mají lidského hostitele, ale způsobují mírnější průběh onemocnění než *B. pertussis*. Zástupci druhé podskupiny mají jako hostitele ovce. Kmeny *B. parapertussis* izolované z lidského hostitele jsou na rozdíl od kmenů izolovaných z ovcí velmi homogenní, což by mohlo ukazovat na nedávný vznik této větve z jednoho klonu ovčí linie (Porter *et al.* 1996).

Druh *B. bronchiseptica* napadá primárně dýchací cesty zvířat, např. koček, psů, králíků (Finger a von Koenig 1996), ale může napadnout i imunosuprimované lidské jedince (Monti *et al.* 2017). *B. bronchiseptica* se může na rozdíl od *B. pertussis* a *B. parapertussis* vyskytovat i volně v environmentálním prostředí, či intracelulárně v parazitických amébách.

### 2.1.1.1. Patogeneze onemocnění u *Bordetella pertussis*

Onemocnění černý kašel vyvolané bakterií *B. pertussis* kolonizující horní cesty dýchací je známé od 16. století. Černý kašel je charakteristický prudkými, opakovanými záchvaty kašle, které trvají 1-2 měsíce. Tyto záchvaty jsou tak silné, že během nich může dojít ke zlomení žeber či roztržení bránice (Mattoo a Cherry 2005). Černý kašel je nebezpečný především u kojenců, kteří nemají plně vyvinutou adaptivní imunitu. Nejlepší prevencí proti černému kašli stále zůstává vakcinace novorozenců. Ovšem i přes vysokou proočkovanost celosvětové populace je v současné době černý kašel opět na vzestupu (podle dat NNDSS – National Notifiable Diseases Surveillance System). Zvýšený počet jedinců s černým kašlem v posledních letech je zaznamenán také v České republice (Fabiánová *et al.* 2019). Důvodem je pravděpodobně přechod z očkování celobuněčnou vakcínou (wP) na vakcínu acelulární (aP), která obsahuje pouze majoritní antigeny bakterie a má tedy méně vedlejších účinků (Noble *et al.* 1987), neposkytuje však dostatečnou ochranu proti tomuto onemocnění. U očkovaného jedince nedochází tak k propuknutí onemocnění spojeného s typickými příznaky, není však zabráněno přenosu bakterií *B. pertussis* na naivní jedince v okolí, např. neočkované děti, pro které může být onemocnění fatální (Warfel *et al.* 2014).

Nedostatečnost aP vakcíny se může projevat jako i tzv. asymptomatická infekce *B. pertussis*. Tato infekce nemusí mít žádné projevy, případně se projevuje jako mírné onemocnění doprovázené kašlem, který trvá pouze několik dní. Tato forma se může vyskytovat i u očkovaných kojenců, i když v nižší míře než u dospělých jedinců.

Výskyt tohoto onemocnění je poslední dobou velmi častý a bývá častokrát zaměňován s běžným nachlazením. Analýzou vzorků z nosohltanu asymptomatických jedinců metodou qPCR na univerzitě v Zambii se zjistila mnohem vyšší přítomnost pertusových infekcí, než se očekávalo (Gill *et al.* 2021). Množství asymptomatických infekcí, či infekcí s velmi mírným průběhem, bylo zaznamenáno i po vytvoření systematického přehledu monitorujícího infekce *B. pertussis* v různých zemích světa (Craig *et al.* 2020). Schwartz a kol. (2016) dokonce uvedli, že ochrana proti černému kašli po očkování aP vakcínou výrazně klesá od 4. roku po vakcinaci. Každým dalším rokem, který uplynul po obdržení aP vakcíny, se dokonce zvýší pravděpodobnost onemocněním černým kašlem o 27 %.

### 2.1.2. Faktory virulence a jejich regulace

Při infekci hostitele a vyvolání onemocnění se uplatňují majoritní faktory virulence *B. pertussis*, které významně přispívají k uchycení, kolonizaci epitelu (adheziny) a přežívání v lidském hostiteli (toxiny). Nejznámějšími adheziny *B. pertussis* jsou filamentózní hemagglutinin (**FHA**) a fimbrie (**Fim**). FHA a Fim také snižují tvorbu zánětu v místě infekce, čímž přispívají k perzistenci *B. pertussis* v dýchacích cestách (Scheller *et al.* 2015). FHA je také zásadní pro tvorbu biofilmu, který bakterie chrání před vlivy prostředí, v tomto případě před imunitním systémem hostitele. Perzistence bakterií *B. pertussis* v nosohltanu, se pak může projevit jako chronická infekce spojená s vleklým kašlem (Conover *et al.* 2010; Sloan *et al.* 2020).

Nejznámějšími toxiny *B. pertussis* jsou adenylcyklázový toxin (**ACT**) a pertusový toxin (**PTX**), který je typický pro druh *B. pertussis*. Oba toxiny vedou k aktivaci adenylcyklázy, která vede k přeměně ATP na cAMP (Selwa *et al.* 2014; Katada *et al.* 1983). Jedná se o klíčovou signální molekulu, jejíž zvýšená koncentrace v buňce má za následek deregulaci signálních drah a metabolismu hostitelských buněk. Dalším příkladem vlivu ACT může být přestavba aktinového cytoskeletu fagocytů či epitelálních buněk a inhibice fagocytózy (Kamanová *et al.* 2008; Hasan *et al.* 2018), či blokace oxidačního vzplanutí neutrofilů spojená s produkcí ROS molekul (Černý *et al.* 2017).

Nejznámějším regulačním systémem *B. pertussis* je dvoukomponentový systém BvgAS, který reguluje expresi většiny faktorů virulence. Tento systém (komplex) je složený z transmembránové sensorové kinázy (BvgS) a cytoplazmatického regulátoru odpovědi, který je tvořen histidinovou kinázou (BvgA). BvgS vnímá svou N koncovou částí různé fyzikální a chemické změny v periplazmatickém prostoru bakterie, čímž dojde k jeho autofosforylaci. Spustí se fosforylační kaskáda, která končí na proteinu BvgA, který slouží jako aktivátor celé řady genů. Systém BvgAS v hostiteli umožní transkripci mnoha faktorů virulence, mezi které patří FHA, Fim, ACT, PTX či sigma faktor BtrS potřebný pro expresi části genů sekrečního systému III (Moon *et al.* 2017). K docílení optimálních podmínek pro kolonizaci hostitele obsahují faktory virulence různé třídy promotorů, což způsobuje jejich expresi v odlišných časových bodech infekčního procesu. Nejdříve dochází k transkripci adhezinu FHA a následně, cca po 2 hodinách od infekce, dochází k expresi toxinu PTX (Kinnear *et al.* 2020).

Byly objeveny i další dvoukomponentové systémy, např. RisAK, jehož hlavní funkcí je aktivovat expresi BvgAS reprimovaných genů – *vrgs* genů (konkrétně proteinem BvgR) v avirulentní Bvg<sup>-</sup> fázi (Coutte *et al.* 2016). BvgR exprimovaný pouze v Bvg<sup>+</sup> fázi štěpí c-di-GMP (cyklický diguanylát) na GMP. Tímto mechanismem se zvedne hladina c-di-GMP,

kteřá je potřebná k aktivaci genů *RisA* kinázou. Z tohoto důvodu je *RisA* aktivní pouze v Bvg<sup>-</sup> fázi (Chen *et al.* 2017; Belcher *et al.* 2021).

Vliv na virulenci má i další dvoukomponentový systém – PlrRS objevený u bakterie *B. bronchiseptica*. Tento systém je důležitý pro aktivaci BvgAS v dolních dýchacích cestách, a přežití, resp. perzistenci bakterie v dolních dýchacích cestách (Bone *et al.* 2017).

Bylo objeveno také 8 malých RNA (Bpr1-7 a Bpr9) nezávislých na systému BvgAS, které jsou silně exprimované během infekce. Tyto sRNA pravděpodobně hrají důležitou roli v patogenezi *B. pertussis* a adaptaci na hostitele. Jejich regulace se nyní zkoumá (Hiramitsu *et al.* 2020).

## 2.2. Imunitní odpověď hostitele na přítomnost patogena

Po vdechnutí *B. pertussis* hostitelem musí bakterie uniknout obranným mechanismům dýchacího traktu. Bakterie se setkává jak s mechanickými zábranami, např. produkce mucinů v dýchacích cestách, které brání jejímu navázání na buňky dýchacího traktu, tak bariérami vrozené i adaptivní imunity. Vývoj imunitních reakcí proti *B. pertussis* je znázorněn na Obr. 1.

Humorální imunitu zajišťuje komplement a protilátky, zatímco do buněčné imunity se nejvíce zapojují neutrofilý, slizniční dendritické buňky (DC) nebo alveolární makrofágy a následně také T a B lymfocyty. Hlavním obranným mechanismem přirozené imunity je zánět, do kterého jsou zapojeny především neutrofilní granulocyty a monocyty. Neutrofilý hrají důležitou roli v odstranění opsonizovaných buněk *B. pertussis*, Jejich migrace do dýchacích cest je však inhibována PTX toxinem (Kirimanjeswara *et al.* 2005). Neutrofilý hrají zásadní roli při odstranění *B. pertussis* z organismu především u PRN negativních kmenů (Inatsuka *et al.* 2010), jejichž počet se používáním acelulární vakcíny zvýšil. Jejich hlavním mechanismem je tvorba neutrofilových sítí v mezibuněčném prostoru, která může být blokována ACT toxinem (Eby *et al.* 2014).

Dendritické buňky a makrofágy fungují jako antigen prezentující buňky (APC), které rozpoznávají antigeny *B. pertussis* na jejím povrchu, tzv. PAMP molekuly. Mezi PAMP molekuly patří LPS vázající se na receptor TLR4, adheziny, či toxiny. Po pohlcení bakterie dojde k jejich aktivaci a antigen z pohlcené bakterie vystaví imunitní buňky na svém povrchu (MHC molekuly II. třídy). Poté migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen T lymfocytům, čímž je aktivují (Jahnsen *et al.* 2006). Tím je spuštěna i adaptivní imunita.



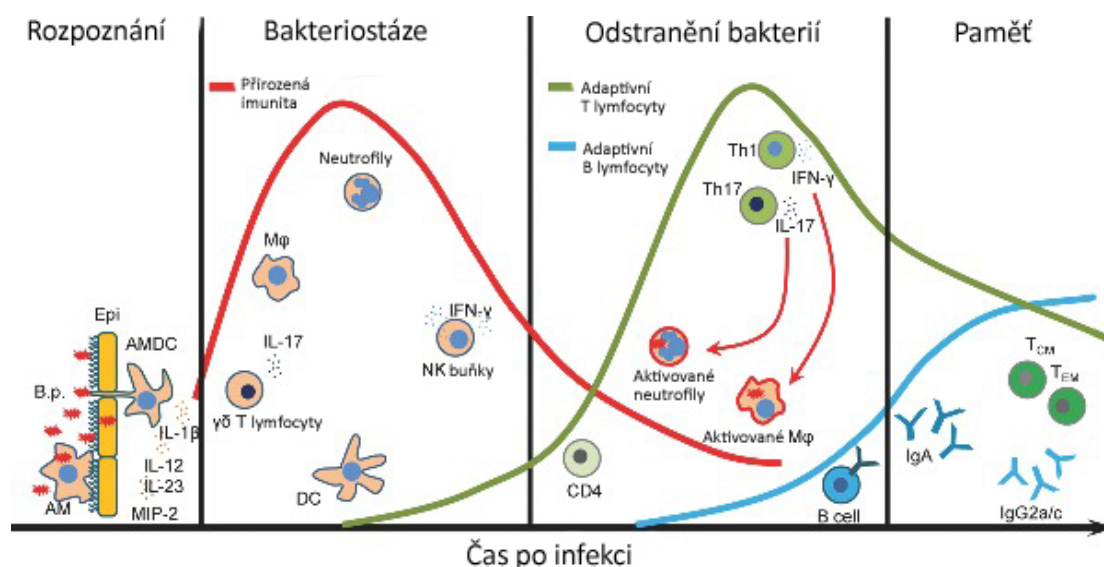
Aktivací buněk vrozené imunity dochází také k produkci cytokinů a chemokinů, které následně regulují imunitní reakci hostitele na přítomnost patogena. Produkce IL-12 a IFN $\gamma$  vede k rozvoji Th1 reakce spojené s vysokou produkcí IFN $\gamma$ . Diferencované Th1 buňky interagují s makrofágy, zajišťují jejich přeměnu v aktivované makrofágy, což následně přispívá k eliminaci intracelulárních patogenů. Při působení cytokinů IL-6, TGF- $\beta$  a IL-1 $\beta$  se vyvíjí zánětlivá odpověď Th17 spojená s produkcí cytokinu IL-17, rozvojem zánětlivé reakce a migrací neutrofilů do postiženého místa. Imunitní odpověď typu Th1 a Th17 je zásadní pro odstranění intracelulárních bakterií, mezi které patří i *B. pertussis*. Ukázalo se, že pro odstranění *B. pertussis* z organismu je klíčová produkce především IFN $\gamma$  (Barbic *et al.* 1997, Warfel a Merkel. 2013).

Na druhé straně dnes běžně používaná acelulární vakcína aktivuje především imunitní odpověď typu Th2, která vzniká působením IL-4. Th2 lymfocyty se naopak podílí především na eliminaci extracelulárních parazitů ve spolupráci s bazofily, eozinofily a mastocyty. Z tohoto důvodu není imunitní odpověď typu Th2 v eliminaci bakterií *B. pertussis* tolik zásadní (Mills *et al.* 2014).

Důležitou roli v dlouhodobé imunitě hrají rezidentní tkáňové T lymfocyty (TRM), které se po infekci hromadí v plicích a během reinfekce hostitele dochází k jejich proliferaci a expanzi do dýchacích cest. Podobně jako Th1 a Th17 lymfocyty i TRM lymfocyty produkují především cytokiny IL-17 a IFN $\gamma$  (Wilk *et al.* 2017). Při reinfekci *B. pertussis* se snižuje doba nástupu adaptivní imunity.

Toxiny produkované *B. pertussis* ovlivňují imunitní reakce hostitele. V nedávné době se ukázalo, že migraci DC do lymfatických uzlin brání PTX a rovněž zpomaluje nástup adaptivní imunity (Klímová *et al.* 2022). Vazba PTX na DC má za následek produkci IL-12 a IFN $\gamma$ , které jsou potřebné pro rozvoj imunitní odpovědi typu Th1, která je zásadní pro odstranění bakterie z organismu. PTX se rovněž účastní také stimulace Th17 imunitní odpovědi (Andereason *et al.* 2009). Th17 imunitní odpověď je rovněž stimulována ACT, který aktivuje NALP3 inflamazomu, čímž se aktivuje kaspáza 1 a dojde k produkci IL-1 $\beta$ , který podporuje rozvoj imunitní odpovědi typu Th17 (Dunne *et al.* 2010).

**Obr. 1: Imunitní odpověď hostitele na infekci *B. pertussis*.**



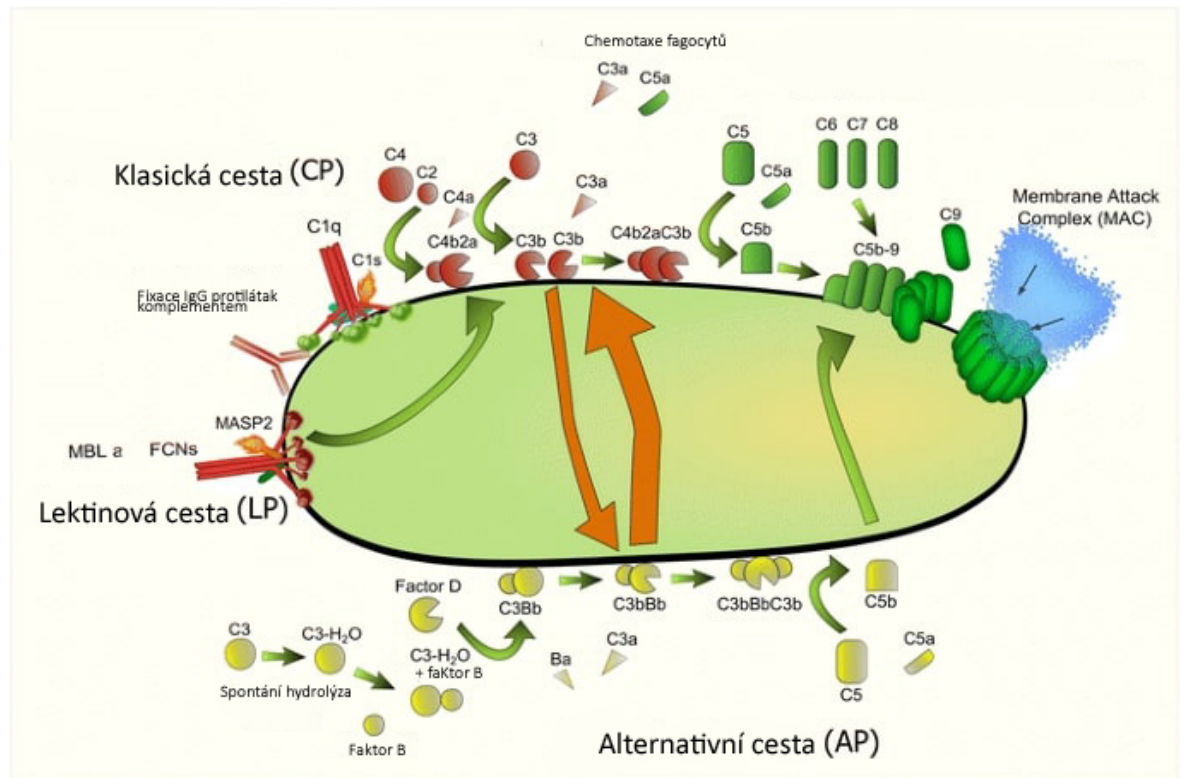
Obrázek ukazuje komplexitu procesu odpovědi na infekci *B. pertussis*. Dochází k aktivaci, náboru imunitních buněk do místa infekce a vytvoření dlouhotrvající adaptivní imunity. Po přichycení *B. pertussis* k řasinkovému epitelu dochází k jejímu rozpoznání místními dendritickými buňkami (AMDC) či makrofágy (AM). Imunitní buňky začnou sekretovat prozánětlivé interleukiny čímž dojde k přilákání imunitních buněk do místa infekce. Neutrofilly a makrofágy ve velké míře fagocytují bakterie, dendritické buňky po pohlcení bakterie putují do lymfatických uzlin, kde prezentací antigenu na svém povrchu aktivují T lymfocyty. Diferenciované T lymfocyty migrují do míst infekce, produkcí IFN- $\gamma$  a IL-17 aktivují makrofágy a neutrofilly. Nakonec dochází k aktivaci B lymfocytů, které produkují specifické protilátky proti *B. pertussis*. V posledním kroku se z malé části B a T lymfocytů stanou paměťové buňky, které zabráňují další infekci stejným patogenem. Převzato a upraveno (Brummelman *et al.* 2015).

### 2.2.1. Opsonizace bakterií a vliv komplementu

Mezi klíčové obranné mechanismy hostitele patří komplement, který je součástí vrozené imunity, a specifické protilátky, které jsou částí adaptivní imunity. Komplementovou kaskádu (viz Obr. 2) lze aktivovat třemi různými cestami, kterými jsou klasická, lektinová a alternativní. Všechny tři zmiňované dráhy vedou k aktivaci C3 konvertázy spojené s následnou aktivací C5 konvertázy. Tyto procesy vyústí ve vytvoření MAC komplexu (membrane attact complex) spojeného s tvorbou pórů v membráně bakterií. Protilátky jsou získané buď předchozí interakcí hostitelského organismu s daným patogenem, nebo vakcinací (Bradstreet *et al.* 2009).

Produkce B lymfocytů je spojena s produkcí specifických protilátek proti *B. pertussis* – především IgG a IgA, které zaručují dlouhodobou ochranu před tímto patogenem. Nejvyšší koncentrace protilátek se v krvi vyskytuje v okamžiku, když je infekce už téměř vyléčená (Mills *et al.* 1993).

**Obr. 2: Aktivace komplementu třemi různými cestami.**



Komplement při infekci *B. pertussis* je spouštěn hlavně klasickou cestou, která začíná fixací protilátek IgG (zejména IgG1 a IgG3) komplementem. Lektinová cesta začíná vázáním polysacharidu manózy či fikolinů. Alternativní dráha začíná samovolným štěpením fragmentu C3 a následně dochází k vazbě na faktor B, který je následně štěpen faktorem D. Hlavní složkou všech 3 drah je protein C3, který je C3 konvertázou štěpen na fragment C3b, který se kovalentně váže na bakteriální povrch a je součástí C5 konvertázy. Výsledkem všech 3 drah je tvorba MAC komplexu pomocí C5 konvertázy. Převzato a upraveno (Jongerijs *et al.* 2015).

Ukázalo se, že expozice séra či krve vede k výrazným transkripčním změnám u klasických Bordetel. Docházelo ke zvýšené expresi faktorů virulence a rovněž se projevila zvýšená cytotoxicita bakterií k makrofágům. Tyto změny pravděpodobně přispívají k perzistenci bakterií v hostiteli a k úspěšné kolonizaci nových hostitelů (Gestal *et al.* 2018). Z tohoto důvodu se sleduje také vliv opsonizace specifickými protilátkami proti *B. pertussis* přítomnými v krvi na intracelulární přežívání *B. pertussis*. Specifické protilátky IgG jsou produkovány B lymfocyty po očkování (Gouw *et al.* 2014) či po vniknutí *B. pertussis* do organismu. Největší množství specifických protilátek IgG bylo zaznamenáno u nemocných jedinců s typickými příznaky černého kašle. Po uzdravení se množství protilátek v organismu snížilo. U uzdravených jedinců byla také snížena opsonizace a následná fagocytóza bakterií ve srovnání s jedinci trpící černým kašlem (Hovingh *et al.* 2018). Protilátky jsou specifické pro různé faktory virulence přítomné na povrchu bakterie. Vznikají především protilátky IgG proti PRN

a Fim 3, které výrazně zvyšují ochranu před infekcí *B. pertussis* a jsou tedy zásadní pro odstranění *B. pertussis* z organismu. Velké množství protilátek proti PRN a Fim3 vzniká z důvodu, že se jedná o vysoce exprimované faktory virulence na povrchu bakterie, které na rozdíl od jiných faktorů virulence (toxinů či FHA adhezinu) nejsou uvolňované do okolí. Zjistilo se, že po použití acelulární vakcíny vznikají především protilátky proti PRN (Lesne *et al.* 2020). Kvůli velkému množství PRN specifických protilátek se začaly v populaci objevovat kmeny *B. pertussis*, které neobsahují PRN. Tyto PRN negativní kmeny jsou hůře rozpoznávané imunitním systémem a lépe přetrvávají v horních dýchacích cestách hostitele. Používání aP vakcíny mělo za následek vznik a rozšíření PRN negativních kmenů (Lesne *et al.* 2020, Martin *et al.* 2015).

Zjistilo se, že antigeny Vag8 a BrkA jsou zapojeny do rezistence *B. pertussis* vůči baktericidní aktivitě komplementu a pravděpodobně blokují vazbu protilátek (Lesne *et al.* 2020), které jsou prvním krokem klasické dráhy komplementu. Do rezistence *B. pertussis* ke komplementu jsou zapojeny i další proteiny, např. BapC, jehož mechanismus působení však zatím není známý (Noofeli *et al.* 2011). *B. pertussis* získala schopnost rezistence vůči komplementu především schopností vázat proteiny regulující komplement.

Prvním známým proteinem hrajícím roli v rezistenci ke komplementu je autotransportér **Vag8**, který inhibuje vazbu komplementu na povrch bakterie na úrovni C4b (součást klasické C3 konvertázy) a zároveň se specificky váže na C1 inhibitor, což vede k odštěpení C2 a C4 z povrchu bakterií (Hovingh *et al.* 2017). Ukázalo se, že protilátky proti *B. pertussis* u jedinců, kteří se s patogenem potkali, blokují vazbu Vag8 na C1 inhibitor a zvyšují tím funkci komplementu v eliminaci *B. pertussis* (Brookes *et al.* 2018).

Druhým zkoumaným proteinem hrajícím roli v rezistenci ke komplementu je protein **BrkA**, který zabraňuje skládání C4 na bakteriální povrch či podporuje jeho degradaci, čímž inhibuje klasickou dráhu komplementu vedoucí k tvorbě pórů v membráně G<sup>-</sup> bakterií (Barnes a Weiss, 2001). Zprostředkovaná rezistence *B. pertussis* ke komplementu díky BrkA byla potvrzena i o 2 roky později. Také se prokázalo, že k usmrcení *B. pertussis* komplementem se používá především klasická cesta a nedochází k aktivaci drah, které nejsou závislé na protilátkách (Barnes a Weiss, 2003). Klasická cesta komplementu však může být inhibována proteinem C4BP (regulátorem lidského komplementu), který se může vázat na povrchový FHA u *B. pertussis*. Vazba na stejné místo C4BP byla pozorována i u dalších bakterií, např. *Streptococcus pyogenes* (Berggard *et al.* 1997).

*B. pertussis* se umí vyhýbat také alternativní dráze komplementu, která nicméně není tak častá. *B. pertussis* se váže na C doménu inhibitoru alternativní dráhy – faktoru H. Vazba

k faktoru H byla dokonce silnější než vazba k C4BP (Amdahl *et al.* 2011). Při odstraňování *B. pertussis* se pravděpodobně uplatňuje i lektinová dráha komplementu, která je iniciována sérovým lektinem MBL (lektin vázající manózu). Koncentrace MBL je výrazně snížena u dospělých jedinců, což zvyšuje jejich riziko onemocnění černým kašlem (Gröndahl-Yli-Hannuksela *et al.* 2013).

Důležitou roli v odolnosti proti komplementu hraje také O antigen, který je exprimovaný blízkými příbuznými bakteriemi *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*, nikoliv však *B. pertussis*, přesto se však *B. pertussis* úspěšně vyhýbá zabíjení v hostiteli pravděpodobně obrannými mechanismy zmíněnými výše (Pishko *et al.* 2003).

### 2.2.2. Modelová buněčná linie THP-1

THP-1 linie je imortizovaná buněčná linie získaná z jednoročního chlapce trpícího akutní monocytickou leukémií, hojně využívána v laboratořích. Mezi její hlavní výhody patří dobrá reproducibilita THP-1 buněk a jejich nižší variabilita v porovnání s primárními monocyty / makrofágy získanými z lidského dárce. Nicméně díky podobnosti obou systémů může tento model adekvátně zastoupit méně reprodukovatelný systém monocytů / makrofágů získaných z pacientů (Kohro *et al.* 2004). Navíc se při pokusech s *M. tuberculosis* ukázalo, že obě linie disponují stejnou mírou fagocytózy a životaschopností bakterií uvnitř buněk (Madhvi *et al.* 2019).

Nicméně i přes vysokou podobnost obou linií se v některých parametrech liší – např. nižší hladinou CD14 receptoru na povrchu THP-1 buňky, či produkcí IL-8 vzniklého stimulací LPS i u trvale CD-14 transfekovaných THP-1 buněk (Bosshart a Heinzelmann 2016). Pravděpodobně se u THP-1 buněk liší i struktura chromatinu, která může ovlivnit expresi mnoha genů a biologických drah. Tyto nastíněné rozdíly mezi buňkami jsou pravděpodobně způsobené imortizací a dlouhodobým pasážírováním THP-1 buněk v laboratořích (Liu *et al.* 2021).

THP-1 buněčná linie se využívá pro studium funkce, mechanismů nebo signálních drah monocytů / makrofágů, ale také pro studium interakce s bakteriemi, které jsou schopné dlouhodobě přežít či se dokonce replikovat uvnitř makrofágů. K diferenciaci THP-1 monocytů na makrofágy se používá chemický stimul – PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate, analogu k diacylglycerolu), který se k aktivaci makrofágů používá od druhé poloviny dvacátého století (Tsuchiya *et al.* 1982). Při diferenciaci THP-1 monocytů je důležité použití správné koncentrace PMA. Ve vysokých koncentracích PMA nedochází k tvorbě klasických

povrchových markerů makrofágů a po infekci bakteriemi dochází k rychlé buněčné smrti (Starr *et al.* 2018). Po diferenciaci makrofágů pomocí PMA došlo k expresi Nramp1 proteinu, který je zásadní pro intracelulární přežívání mnohých bakterií, mezi které patří rody *Salmonella*, *Leishmania*, nebo *Mycobacterium* (Knowles *et al.* 2006; Canonne-Hergaux *et al.* 1999).

THP-1 makrofágy jsou často používány jako *in vitro* modely pro studium interakcí mezi hostitelem a širokou škálou patogenních bakterií a hub (Tóth *et al.* 2017; Bosshart a Heinzelmann 2016; Madhvi *et al.* 2016; Trotta *et al.* 2018). Mezi významné patogenní bakterie, které byly pomocí tohoto modelu studovány, patří např. *Acinetobacter baumannii*, který je považován za extracelulární oportunní patogen. Počet jedinců infikovaných touto bakterií v současnosti neustále roste a z tohoto důvodu se *A. baumannii* stává předmětem zájmu intenzivních studií. Ukázalo se, že *A. baumannii* je schopný přetrvávat a replikovat se uvnitř THP-1 buněk, čímž se pravděpodobně vyhýbá imunitní odpovědi hostitele, což napomáhá jeho šíření (Sycz *et al.* 2021). Další studovanou bakterií je *Mycobacterium tuberculosis*, která patří mezi typické intracelulární bakterie. Zjistilo se, že se obchází imunitní systém pomocí inhibice apoptózy makrofágů (Riendeau a Kornfeld *et al.* 2003). Buněčná linie THP-1 je využívána také ve studiích zaměřených na schopnost bakterie *B. pertussis* přežít intracelulárně v časných endozomech hostitelských buněk (Lamberti *et al.* 2016; Valdez *et al.* 2016). Během intracelulárního přežívání *B. pertussis* dochází ke zvýšené expresi stovek genů THP-1 buněk, které kódují cytokiny, chemokiny či transkripční faktory. Geny se zvýšenou expresí reprezentovaly geny zapojené v regulaci imunitního systému, prezentaci antigenu či aktivaci imunitních buněk. Naopak geny, které vykazovaly sníženou expresi, představovaly geny dýchacího řetězce či replikace DNA (Petráčková *et al.* 2020).

### 2.3. Intracelulární přežívání bakterií rodu *Bordetella*, *Mycobacterium* a *Salmonella*

Mnoho bakterií po infekci hostitele přežívá intracelulárně v hostitelských buňkách. Mezi typické intracelulární bakterie patří například bakterie rodů *Mycobacterium* a *Salmonella*. Intracelulární přežívání je však známé také u *B. bronchiseptica* a nedávno bylo objeveno také u příbuzné *B. pertussis*. Z důvodů porozumění intracelulárnímu přežívání *B. pertussis* v lidských imunitních buňkách se zkoumá i podobnost s lépe prozkoumanými intracelulárními bakteriemi.

*Mycobacterium* jsou převážně intracelulární bakterie. Nejznámějším zástupcem je *Mycobacterium tuberculosis*, který je schopný přežít a množit se uvnitř lidských makrofágů.

Během intracelulárního přežívání moduluje genovou expresi hostitele a dochází k snížené expresi genů potřebných pro mezibuněčnou komunikaci (např. povrchových receptorů CLIP či MHC I / MHC II důležitých pro prezentaci antigenu) a genů důležitých pro intracelulární přežívání *M. tuberculosis*, mezi které patří například geny potřebné pro fagocytózu, NADPH oxidázu, či enzymové systémy potřebné k okyselení fagozomu a usmrcení bakterie uvnitř (von Both *et al.* 2018). Zároveň je výrazně zvýšena exprese genů zapojených v opravě poškození buněčného obalu bakterie, protože makrofág pravděpodobně poškozuje lipidní součást povrchu buněk. Rovněž je zvýšena exprese genů zapojených v  $\beta$ -oxidaci mastných kyselin, které bakterie využívá jako zdroj uhlíku a energie během intracelulárního přežívání (Schnappinger *et al.* 2003). Pro využití mastných kyselin je důležitý enzym isocitrát lyáza, který hraje roli v glyoxylátovém cyklu a konvertuje deriváty mastných kyselin na jednoduché uhlíkaté sloučeniny. Isocitrát lyáza je tedy zásadní pro perzistence *M. tuberculosis* v makrofázích (McKinney *et al.* 2000). Intracelulární přežívání *M. tuberculosis* je umožněno také díky schopnosti bakterie inhibovat apoptózu a tím se vyhýbat imunitnímu systému hostitele (Behar a Briken, 2019).

Další typickou intracelulární bakterií jsou bakterie rodu *Salmonella*, které infikují epiteliální buňky, makrofágy i dendritické buňky – zatím však nebylo dokázáno, že by se v dendritických buňkách byly schopné množit (García *et al.* 2000). Pro přežití bakterií *Salmonella* uvnitř hostitelské buňky a následné replikaci je vyžadován ostrov patogenity 2 (SPI-2), (Singh *et al.* 2018). Během intracelulární lokalizace v hostitelských buňkách bakterie rodu *Salmonella* moduluje imunitní odpověď hostitele. Dochází k zvýšení glykolýzy, či potlačení syntézy serinu spojenou s akumulací 3-fosfoglycerátu. Tyto změny vedou k vytvoření ideálních podmínek k replikaci bakterie uvnitř makrofágů (Jiang *et al.* 2021). *Salmonella* je také schopná měnit permeabilitu membrány otevřením či uzavřením póru ve vnější membráně. Snížení permeability membrány je spojena s odolností bakterie proti toxickým látkám, což je důležitý faktor především během oxidačního stresu. Změny permeability membrány jsou důležitým faktorem pro intracelulární přežívání bakterií *Salmonella* (van der Heijden *et al.* 2016).

Pro intracelulární přežívání mnohých bakterií (včetně bakterií rodu *Mycobacterium* a *Salmonella*) je zásadní Nramp1 protein (Canonne-Hergaux *et al.* 1999). Jedná se o integrální membránový protein vyskytující se na lysozomech myeloidních imunitních buněk. Existují různé genetické varianty tohoto genu, které zhoršují odolnost vůči infekcím intracelulárními patogeny. Některé varianty genu mohou být zodpovědné za odstraňování dvoumocných kovů z fagozomů důležitých pro replikaci intracelulárních bakterií, např. *Mycobacterium tuberculosis* (Cellier *et al.* 2013). Jelikož se po infekci *M. tuberculosis* se rozvine onemocnění

u méně než 10 % infikovaných jedinců, zkoumala se také souvislost mezi různými alelami genu kódující Nrampl1 protein a projevem onemocnění. Výsledky naznačují, že tento protein může opravdu hrát důležitou roli v obraně hostitele před rozvojem onemocnění a mohl by být zásadní i pro obranu před dalšími intracelulárními bakteriemi (Li *et al.* 2010).

Bakterie *B. bronchiseptica*, z níž se později vyvinuly druhy *B. pertussis* a *B. parapertussis*, má životní cyklus spojený s intracelulárním přežíváním uvnitř parazitických améb, které se vyskytují v environmentálním prostředí (Dewan a Harvill, 2019). Parazitické améby jsou strukturně i morfologicky podobné makrofágům, ve kterých *B. bronchiseptica* přežívá po infekci hostitele. Ukázalo se, že i další patogenní druhy rodu *Bordetella* jsou schopny intracelulárně přežít v makrofázích – např. *B. hinzii* či *B. trematum*, které nepatří mezi klasické *Bordetelly*. Pravděpodobně se tedy jedná o získané mechanismy, díky kterým bakterie odolávaly jednobuněčným predátorům v prostředí. Intracelulární přežívání je způsobeno vysoce konzervovanými geny, jejichž exprese je zvýšena během intracelulárního přežívání uvnitř makrofágů a jsou pravděpodobně zodpovědné za perzistenci bakterií uvnitř makrofágů. Předpokládá se, že právě tyto geny mohly environmentálním bakteriím usnadnit přechod na patogenní způsob života (Rivera *et al.* 2019).

Blíže příbuzné druhy *B. pertussis* a *B. parapertussis* již nemají životní cyklus spojený s amébami a životem v environmentálním prostředí. Podobně jako *B. bronchiseptica* jsou však schopné přežít intracelulárně v hostitelských buňkách. Schopnost intracelulárního přežívání *B. parapertussis* v nekyselých fagozomech je umožněna díky přítomnosti O antigenu (součást LPS ve vnější membráně buněčné stěny), který brání fagolyzozomálnímu zrání, čímž nedochází k okyselení fagozomu důležitému pro degradaci bakterií uvnitř fagozomu. Naopak přítomnost hostitelských IgG protilátek, které opsonizují bakterii, výrazně zvýšilo fagocytózu a likvidaci pohlcených bakterií (Gorgojo *et al.* 2014). Během intracelulárního přežívání v makrofázích produkuje *B. parapertussis* typ melaninu, který chrání bakterie před produkcí ROS molekul a následným usmrcením v makrofázích. Rovněž bylo zjištěno, že exprese genu *hppD*, který je zapojen v produkci melaninu, není regulována dvoukomponentovým systémem BvgAS a je nezávislá na BvgAS (Hiramatsu *et al.* 2021). Schopnost intracelulárně přežít uvnitř makrofágů se zkoumá i u *B. pertussis*, u které se dlouhou dobu předpokládalo, že je pouze extracelulárním patogenem (Belcher *et al.* 2021).



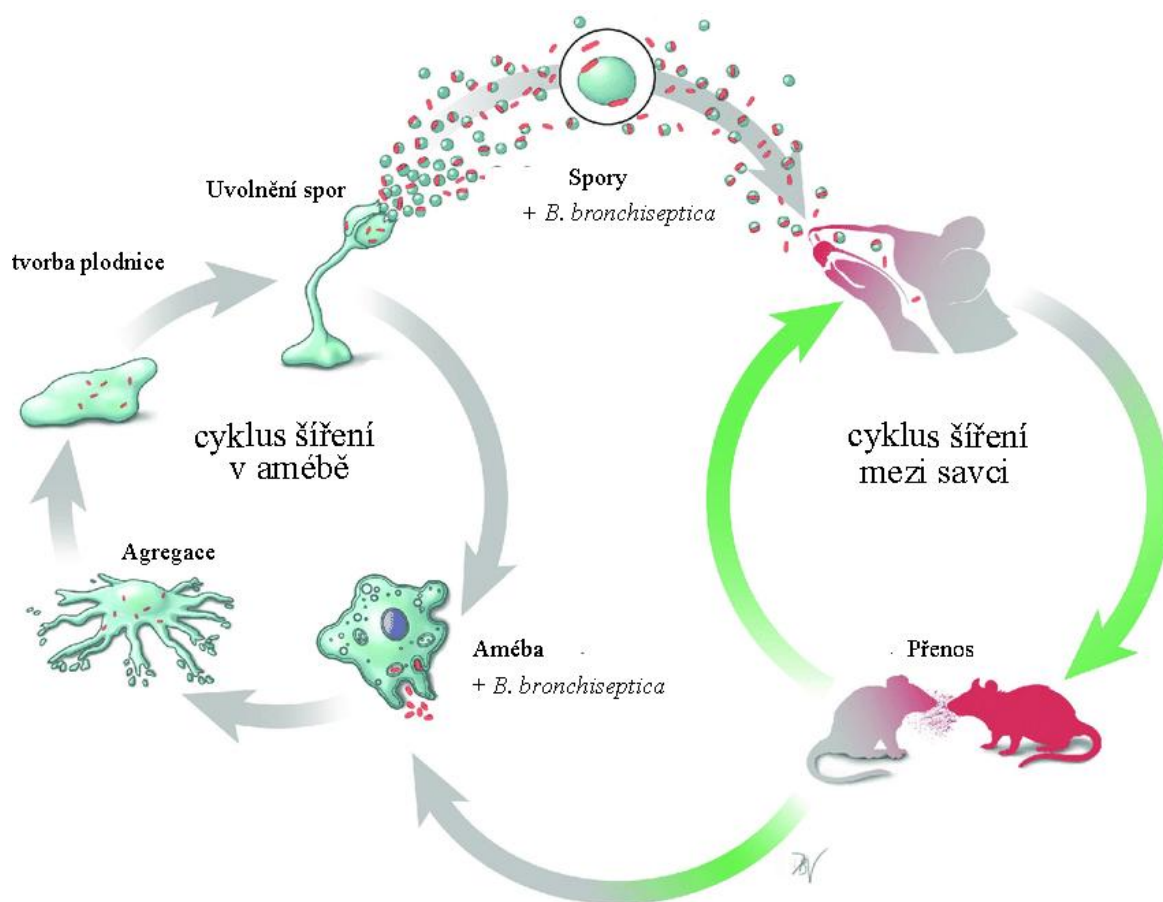
### 2.3.1. Intracelulární přežívání *Bordetella bronchiseptica* v parazitických amébách

Životní cyklus *B. bronchiseptica* je asociovaný především s infekcí dýchacích cest velké řady drobných savců. Tato bakterie si však ponechala i schopnost přežít a množit se v prostředí (Hamidou Soumana *et al.* 2017), nebo uvnitř parazitických améb. Přežívání v parazitických amébách je součástí životního cyklu *B. bronchiseptica*. Bakterie vyskytující se v prostředí je pohlcena amébou, ve které je schopna se namnožit. Součástí životního cyklu améb je i tvorba plodnic z více jedinců. Z plodnic se uvolňují spory do okolí a spolu se sporami se rozšiřuje i bakterie *B. bronchiseptica* lokalizovaná na jejich povrchu. Uvolněná *B. bronchiseptica* může následně infikovat nového hostitele (Obr. 3). Přenos spor na jiné místo může být zprostředkován i bodavým hmyzem či klíšťaty. *B. bronchiseptica* je schopna dlouhodobě přežít, růst a množit se v různých druzích améb, které tím výrazně přispívají k šíření *B. bronchiseptica* do dalších míst a na nové hostitele (Taylor-Mulneix *et al.* 2017).

Úspěšnou interakci s amébami přítomnými v prostředí pravděpodobně zprostředkovávají geny exprimované v Bvg<sup>-</sup> fázi. Po přenosu bakterie do savčího hostitele se dojde k aktivaci virulentní Bvg<sup>+</sup> fáze (Taylor-Mulneix *et al.* 2017). Po kolonizaci hostitele mohou bakterie *B. bronchiseptica* přežít intracelulárně i v imunitních buňkách. Zjistilo se, že v Bvg<sup>+</sup> fázi je bakterie výrazně toxičtější k hostitelským buňkám než ve fázi Bvg<sup>-</sup>. Naopak schopnost adheze a intracelulární lokalizace bakterií byla výrazně vyšší u bakterií v Bvg<sup>+</sup> fázi (Brockmeier a Register, 2000). Ukázalo se, že *B. bronchiseptica* s nefunkčním BvgAS systémem je schopná dlouhodobě přežít v dendritických buňkách, (Guzman *et al.* 1994). Souhrnně tato pozorování naznačují přechod *B. bronchiseptica* do Bvg<sup>-</sup> fáze podobně jako v amébách (Guzman *et al.* 1994).

Pro intracelulární přežívání *B. bronchiseptica* je naopak důležitý dvoukomponentový systém RisAK. Mutace v tomto systému snižovala počet intracelulárních bakterií (Jungnitz *et al.* 1998). Jedním z mechanismů, jakým systém RisA přispívá intracelulárnímu přežívání, je zpomalení acidifikace fagozomů, která je hlavním mechanismem hostitele pro eliminaci bakterií (Zimna *et al.* 2001). Důležitou úlohu během infekce *B. bronchiseptica* má sekreční systém typu 6 (T6SS). Funkční T6SS je důležitý pro modulaci cytokinů a rozšíření infekce v hostiteli. Ztrátou T6SS dochází ke zvýšení intracelulárního přežívání bakterií uvnitř antigen prezentujících buněk (APC). Bakterie v APC se dostávají do systémových orgánů, které kolonizují. Tato pozorování naznačují, že ztráta T6SS napomáhá perzistenci *B. bronchiseptica* v organismu (Bendor *et al.* 2015).

**Obr. 3: Životní cyklus *B. bronchiseptica* spojený s parazitickými amébami.**



Na obrázku je znázorněno pochlčení bakterie amébou a její následná transmise pomocí spor do nového hostitele. Bakterie *B. bronchiseptica* (značena červeně) se může šířit mezi malými savci, kteří jsou její přirozeními hostiteli. Její životní cyklus se může spojit i s parazitickými amébami. Spolu se sporamí améby (zelená barva) může infikovat nové hostitele. Převzato a upraveno (Dewan a Harvill, 2019).

Během intracelulárního přežívání v makrofázích aktivuje *B. bronchiseptica* především expresi genů podílejících se na opravě DNA a proteinů, či aktivaci různých metabolických drah a biosyntézy membrány. Nedochozí však ke zvýšené expresi genů zapojených do virulence a některé tyto geny jsou dokonce utlumeny (ACT, T3SS či geny pro expresi O antigenu), (Rivera *et al.* 2019). Podobnou regulaci exprese uvnitř makrofágů vykazuje i blízce příbuzná *B. pertussis*, která má během intracelulárního přežívání potlačenou expresi genů mnoha faktorů virulence – např. ACT, PTX, PRN, Fim2 a další (Farman *et al.* 2022).

Tyto výsledky souhrnně naznačují pravděpodobnou strategii *B. pertussis* během intracelulárního přežívání uvnitř imunitních buněk hostitele, kdy se bakterie snaží být „neviditelná“ a uniknout tak imunitnímu systému.

### 2.3.2. Intracelulární přežívání *B. pertussis*

Pohled na životní strategii *B. pertussis* se v průběhu poznávání tohoto patogena měnil. *B. pertussis* byla tradičně popisována jako extracelulární patogen kolonizující řasinkový epitel horních cest dýchacích. O schopnosti *B. pertussis* přežít intracelulárně v hostitelských buňkách se začalo uvažovat od roku 1959, kdy bylo popsáno přežití bakterií *B. pertussis* uvnitř HeLa buněk a buněk ledvin makaka po dlouhodobém vystavení těchto buněk antibiotikům (Crawford a Fishel, 1959). Dlouhodobé přežívání *B. pertussis* v makrofázích se začalo objevovat i v dalších studiích v druhé polovině 20. století (Gray a Cheers, 1967). Tato teorie byla definitivně potvrzena až na konci 20. století, kdy Friedman a kol. prokázali dlouhodobé přežití *B. pertussis* v primárních makrofázích *in vitro* (Friedman *et al.* 1992).

Makrofágy jsou svým vzhledem podobné parazitickým amébám, které hrají důležitou roli v životním cyklu *B. bronchiseptica*, ze které se *B. pertussis* vyvinula. Jedná se o významné antigen prezentující buňky v lidském imunitním systému. Zároveň jde o profesionální fagocyty s vysokou kapacitou fagocytózy. Jsou odvozené od monocytů, které však mají sníženou schopnost prezentace antigenu a fagocytózy. Makrofágy hrají důležitou roli pro odstranění *B. pertussis* z infikovaného organismu. Zjistilo, že z celkového počtu fagocytovaných bakterií je následně 70 % usmrceno v kyselých kompartmentech buňky jako je pozdní endozom či lysozom, do dvou hodin po infekci. Zbylé bakterie jsou lokalizovány v časných endozomech s neutrálním pH, ve kterých jsou schopny se replikovat v období jednoho až dvou dnů po infekci (Lamberti *et al.* 2010). Zdrojem energie intracelulárních bakterií je pravděpodobně kyselina glutamová (Lamberti *et al.* 2016). Na rozdíl od blízké příbuzné *B. bronchiseptica* není *B. pertussis* schopná přežít v endozomech s nízkým pH, které má na *B. bronchiseptica* jen malý vliv (Schneider *et al.* 2000). Produkci ACT dochází k blokaci makrofágových markerů a je tedy znemožněno vzniku komplexních makrofágů. Ke ztrátě makrofágových markerů navíc může dojít i u zralých a plně diferenciovaných makrofágů (Ahmad *et al.* 2019).

Oponizace *B. pertussis* specifickými protilátkami IgG výrazně zvyšuje počet intracelulárních *B. pertussis* (Hazenbos *et al.* 1994; Lamberti *et al.* 2010). Po oponizaci *B. pertussis* specifickými protilátkami došlo také ke zvýšení množství bakterií degradovaných v kyselých kompartmentech makrofágů. Nižší počet bakterií, které přežily intracelulárně uvnitř makrofágů, byl zaznamenán i po 2 dnech. Oponizace má tedy zásadní vliv na přežívání *B. pertussis* uvnitř lidských makrofágů a je zásadní v účinném boji proti tomuto patogenu (Lamberti *et al.* 2010). Fagocytóza oponizovaných bakterií *B. pertussis* je inhibována faktory virulence, které naopak hrají důležitou roli v adherenci neopsonizovaných *B. pertussis*

k monocytům – konkrétně adheziny PRN, Fim a FHA (Hazenbos *et al.* 1994). Při studiu vlivu opsonizace *B. pertussis* na neutrofilů, se ukázalo, že opsonizace tepelně inaktivovaným sérem obsahujícím protilátky snížila adhezi a fagocytózu bakterií neutrofilů, ale nezměnila životaschopnost bakterií uvnitř neutrofilů, která se pohybuje mezi 1-2 %. Je tedy možné, že *B. pertussis* je schopná pouze krátkodobě přežít v těchto buňkách (Lenz *et al.* 2000). Jiná studie ukazuje účinnou fagocytózu granulocyty po opsonizaci *B. pertussis* protilátkami IgG, které se navážou na receptory FcyR na povrchu granulocytů. Tyto receptory jsou dále zodpovědné za přenos a degradaci bakterií v lysozomech spojenou s nižší životaschopností bakterií. Podobným způsobem fungovala i opsonizace specifickými protilátkami IgA (Rodriguez *et al.* 2001).

Extracelulární *B. pertussis* může na hostitelské buňky působit cytotoxicky a vyvolat apoptózu, která je provázána kondenzací a fragmentací DNA v jádře a vede k následnému rozpadu na apoptotická tělíčka (Zhang a Xu, 2000). Předpokládalo se, že intracelulární lokalizaci bakterie v hostiteli dojde k urychlení zabíjení hostitelských buněk. Nicméně během intracelulární lokalizace působí bakterie *B. pertussis* spíše anti-apoptoticky. Zjistilo se, že apoptóza je vyvolaná ACT, naopak PTX nemá na cytotoxicitu hostitelských buněk vliv (Khelef *et al.* 1993). Podobnou roli jako ACT by mohl hrát i další faktor virulence – FHA. Působí na makrofágy i epitelární buňky dýchacího traktu, u kterých vyvolává prozánětlivé reakce produkcí TNF $\alpha$ . Je známo, že produkce TNF $\alpha$  je stimulována LPS přítomného na povrchu bakterie *B. pertussis*. FHA však násobně zvyšuje jeho produkci, to je způsobené pravděpodobně vnitřní cytotoxickou aktivitou FHA. Působením FHA se také zvyšovala apoptóza buněk, ta však nebyla zprostředkována prozánětlivým faktorem TNF $\alpha$ , ale faktorem TNRF1 (Abramson *et al.* 2001). Pro zvýšení cytotoxicity by mohl být důležitý i T3 sekreční systém bakterie, který vstříkne do cytoplazmy hostitelské buňky mechanismem injekční stříkačky efektorový protein BteA. U *B. pertussis* je však snížena exprese T3SS ve srovnání s blízkce příbuznou *B. bronchiseptica*. Tento rozdíl je dán inzercí alaninového zbytku do pozice 503. Při odstranění alaninového zbytku došlo ke zvýšení cytotoxicity *B. pertussis* – k potlačení zánětlivé odpovědi a rozvoji onemocnění u myší, naopak vložení alaninového zbytku do genu u *B. bronchiseptica* došlo ke snížení cytotoxicity bakterií (Bayram *et al.* 2020).

### 2.3.2.1. Infekční modely pro intracelulární přežívání *B. pertussis*

Intracelulární přežívání *B. pertussis* se zkoumá na několika buněčných modelech, mezi které patří lidské primární makrofágy, lidská monocytární linie THP-1, myší makrofágy či lidské

epiteliální buňky. Makrofágy byly pro studium intracelulárního přežívání *B. pertussis* vybrány také proto, že v lidském těle žijí poměrně dlouhou dobu. Mohly by tedy sloužit jako rezervoár bakterií během infekce, či přispívat migraci bakterií v dýchacím traktu hostitele.

Při studiu intracelulárních bakterií na **primárních makrofázích** se ukázalo, že pokud u bakterie dojde ke snížení produkce faktorů virulence (ACT, PTX, Fim a dalších), dojde ke zvýšení počtu intracelulárních bakterií a prodloužení doby, po kterou je bakterie schopná perzistovat v plicích (Novák *et al.* 2020). Na primárních makrofázích se také zkoumal vliv polarizace na intracelulární přežívání *B. pertussis*. Makrofágy se mohou polarizovat na několik typů – M1, M2a a M2c. Typ M1 je aktivován IFN- $\gamma$  a následně likviduje intracelulární bakterie produkcí ROS a přispívá tvorbě zánětu produkcí prozánětlivých cytokinů: IL-6 či TNF- $\alpha$ . M2 makrofágy jsou spojeny s buněčnou odpovědí typu Th2. Jsou aktivovány IL-4. Tyto buňky neprezentují antigen, produkují minimální množství ROS molekul a jsou spojovány s poslední fází zánětu. Bakterie *B. pertussis* se dostávají do makrofágů vazbou na CD11b. Vazba *B. pertussis* na makrofágy může být pravděpodobně i přes molekulu CD206. Tato molekula je ve větší míře exprimovaná makrofágy typu M2. Intracelulárně lokalizované bakterie mohou modulovat makrofágy. U makrofágů typu M1 dojde k vyvolání zánětlivé odpovědi, která je potlačena u makrofágů typu M2 zvýšenou expresí protizánětlivých cytokinů. Rozdílné reakce makrofágů jsou spojeny s výrazně nižším počtem *B. pertussis* přežívajících v M1 buňkách již 3 hodiny po infekci, tento rozdíl byl pozorován i 48 hodin po infekci. Bakterie jsou tedy schopné přežít uvnitř obou typů makrofágů, ovšem zásadní jsou makrofágy typu M2, které by mohly sloužit jako rezervoár bakterií (Valdez *et al.* 2021).

Intracelulární přežívání *B. pertussis* bylo zkoumáno i na **myších makrofázích**. Zjistilo se, že v obraně hostitelského organismu proti infekci *B. pertussis* hraje důležitou roli Mal protein exprimovaný imunitními buňkami. Mal protein je zásadní pro vrozenou imunitu hostitele. Hraje důležitou roli v aktivaci imunitních buněk prostřednictvím TLR receptorů, kontroluje infekci, růst bakterií v plicích, tvorbu zánětu, šíření infekce do jater, sílu infekce a také zabraňuje přežívání a replikaci *B. pertussis* uvnitř makrofágů (Bernard *et al.* 2015).

Při infekci hostitele neproniká *B. pertussis* pouze do makrofágů. Adherence, vnik a intracelulární přežívání je zkoumáno také na **epiteliálních buňkách dýchacího traktu**. *B. pertussis* přežívaly intracelulárně v časných endozomech epitheliálních buněk, byly však schopny znovu osídlit extracelulární prostředí (Lamborti *et al.* 2013, Sivarajan *et al.* 2021).

Intracelulární přežívání *B. pertussis* se nejvíce zkoumá na **lidské monocytární linii THP-1**. Na této linii se zkoumá především regulace exprese velkého množství bakteriálních genů, které umožňuje přizpůsobení bakterie na intracelulární prostředí makrofága.

### 2.3.2.1.1. Regulace exprese bakteriálních genů během intracelulárního přežívání zkoumána na THP-1 buňkách

Regulace exprese genů *B. pertussis* během intracelulárního přežívání se nejvíce zkoumá na THP-1 buňkách, které se vyznačují vysokou reproducibilitou a nižší variabilitou v porovnání s primárními monocyty / makrofágy. Po analýze bakteriálních proteomů intracelulárních a extracelulárních bakterií bylo objeveno 762 proteinů, jejichž exprese v intracelulárních bakteriích se lišila (změna se týkala 24 % - 29 % detekovaných proteinů). Po intracelulární lokalizaci bakterie došlo k snížení exprese genů pro biosyntézu a metabolismus aminokyselin či nukleotidů. Naopak se zvýšil počet proteinů figurujících v syntéze proteinů či opravě DNA. Také se zjistilo, že tato adaptace probíhá velmi rychle a byla pozorovaná už 3 hodiny po infekci makrofágů *B. pertussis*. Změna proteinů se zkoumala po dobu 48 hodin, došlo však ke změně už pouze 8 % bakteriálních proteinů. Mezi změněné proteiny patřil např. chaperon ClpB (jehož hladina se po prvních 3 hodinách infekce nezměnila), který formuje agregované proteiny do původního stavu. Tento chaperon by mohl hrát důležitou roli v intracelulárním přežívání (Lamberti *et al.* 2016). Důležitý pro intracelulární přežívání je protein BP0414, homologní k proteinu MgtC, u kterého byl popsán vliv na intracelulární přežívání patogenů. Protein MgtC obsahuje konzervovanou N koncovou doménu a zabraňuje degradaci bakterií v lysozomu. Navíc je důležitý pro přežití v časných endozomech a adaptaci na mírně kyselé prostředí (Cafiero *et al.* 2018).

THP-1 systém je dále využíván pro studium produkce faktorů virulence spojených s intracelulárním přežíváním. Předpokládalo se totiž, že produkce toxinů by mohla být důležitá pro modulaci infikovaných buněk a přispívat tak k intracelulárnímu přežívání bakterií. Tuto hypotézu podporovaly studie z roku 2016, které poukázaly na stejné, či zvýšené hladiny faktorů virulence (ACT, PTX či FHA) během intracelulárního přežívání a také sníženou schopnost intracelulárního přežívání u bakterií deficientních pro tyto faktory (Lamberti *et al.* 2016, Valdez *et al.* 2016). Tato hypotéza je v rozporu s pozorováním v primárních makrofázích, kde při snížené produkci faktorů virulence bakterie lépe přežívala uvnitř makrofágů (Novák *et al.* 2020). To podporují také výsledky z transkriptomické analýzy (získané metodou dual RNA seq) *B. pertussis* v THP-1 makrofázích. Zjistilo se, že během infekce je snížena exprese *bvgR*, důležitého pro expresi většiny faktorů virulence – byla pozorována snížená hladina faktorů virulence PTX, Fim i PRN. Naopak došlo ke zvýšené expresi některých genů kódujících proteiny transportu železa, cystein dioxygenázy či regulátory transkripce. Získané výsledky podporují hypotézu, že bakterie v intracelulárním prostředí

přecházejí do avirulentní fáze a makrofágy využívají pouze jako vektory k přemístění do jiného místa či jako svůj rezervoár (Petračková *et al.* 2020). Získané výsledky by mohly naznačovat využití makrofágů *B. pertussis* jako intracelulární niky pravděpodobně spojené s transportem bakterie do ještě neinfikovaných míst. Tato fáze by mohla hrát významnou roli v životním cyklu bakterie, ostatně jako hrají améby u blízce příbuzné *B. bronchiseptica*.

Během intracelulárního přežívání dále dochází k zvýšené expresi i dalších dvoukomponentových systémů – např. RisAK, či BP2547/2548 homologického s dvoukomponentovým systémem PmrAB, který se vyskytuje u bakterií rodu *Salmonella*. Navíc u *B. pertussis* pozorujeme přizpůsobení membrán stresu vyvolaného makrofágy (nízké pH, ROS molekuly a další), což by mohla být doba snížení permeability membrán během intracelulárního přežívání salmonel. Silně modulovány byly i geny zapojené v metabolismu síry – došlo ke zvýšené expresi genů pro cystein dioxygenázu či genu pro export cysteinu. Získaná data také poukazyvala na inhibici apoptózy během intracelulárního přežívání *B. pertussis*, která je známá u mnoha intracelulárních patogenů včetně *M. tuberculosis*. Změna exprese se týkala i celé řady jiných genů, které se podílejí na opravě poškozených proteinů, transportu kovů či energetickém metabolismu. Celkově námi získané výsledky naznačují, že *B. pertussis* je extracelulární patogen s intracelulární fází v lidských makrofázích, během které se vyskytuje v avirulentní Bvg<sup>-</sup> fázi (Farman *et al.* 2022).

### 2.3.2.1.1.1. Geny *B. pertussis* se zvýšenou expresí během intracelulárního přežívání

Mezi hlavní oblasti *B. pertussis* se zvýšenou expresí během intracelulárního přežívání patří geny zapojené v opravě buněk spojených s biosyntézou, transportem, přenosem signálu, regulací transkripce či homeostáze buněk. Během intracelulárního přežívání jsou buňky vystaveny mnohým stresům a je potřeba se na ně přizpůsobit. Prvním takovým stresem je membránový stres.

Během intracelulárního přežívání je *B. pertussis* vystavena nízkému pH či působením ROS molekul. Aby se bakterie byla schopná účinně bránit, dochází ke změně složení membrány i změně napětí. Dochází k remodelaci lipidů A, čímž dochází ke zpevnění buněčné stěny (Farman *et al.* 2022). Remodelaci lipidů A prokázala už i dřívější studie, která považuje modifikaci lipidů A jako výhodu během infekce před složkami adaptivní imunity (Marr *et al.* 2010). Důležitou roli v přizpůsobení membránového stresu hraje také sigma faktor E (zodpovědný za např. sestavení LPS a proteinů vnější membrány), který je negativně řízený

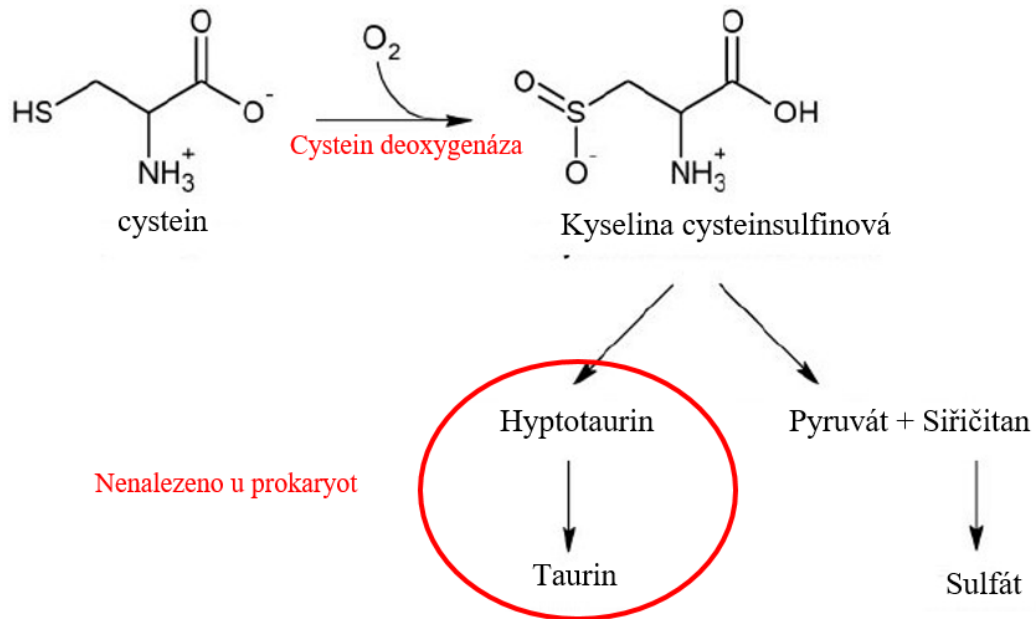
anti sigma faktorem RseA. Bylo dokonce prokázáno, že delecí anti sigma faktoru RseA se zvýší odolnost *B. pertussis* proti membránovému stresu, či se zvýší rychlost růstu *B. pertussis* při nižších teplotách (25 °C), (Hanawa *et al.* 2013).

Působením ROS molekul také dochází k oxidaci cysteinových a methioninových zbytků, které byly následně redukovány příslušnými oxidoreduktázami, jejichž exprese byla během intracelulárního přežívání zvýšena (Farman *et al.* 2022). Redukce methioninových zbytků je potřebná k jejich interakci s kalmodulinem, čímž se zvýší jeho afinita k ACT a dochází k jeho aktivaci potřebné během kolonizace hostitele (Vougier *et al.* 2004).

Byla zjištěna také zvýšená exprese genů pro cystein dioxygenázu či export cysteinu ven z buňky (Farman *et al.* 2022). Dlouhou dobu se předpokládalo, že cystein dioxygenáza, která hraje důležitou roli v homeostázi cysteinu, se vyskytuje pouze u eukaryot. Byl však dokázán její výskyt u velké skupiny eubakterií (Dominy *et al.* 2006). Jedná se o důležitý regulátor intracelulárního cysteinu a zároveň se jedná o první enzym vedoucí k přeměně cysteinu až na pyruvát (dráha je znázorněna na Obr. 4), který je následně použit k energetickému metabolismu. Po sulfooxidaci cysteinu cystein dioxygenázou může také dojít k následné dekarboxylaci cystein sulfinové kyseliny na hypotaurin. Tato dráha se však u bakterií nevyskytuje (Cook *et al.* 2005). Pro regulaci cysteinu v buňce jsou důležité také efluxní pumpy, které zabraňují jakýmkoliv toxickým účinkům cysteinu. Bylo dokázáno, že při nedostatku cysteinu je aktivita cystein dioxygenázy snížena, a naopak při přebytku cysteinu je velmi aktivní a dochází k přeměně toxického cysteinu (Stipanuk *et al.* 2009). U bakterie *Pantoea ananatis* bylo dokázáno, že po delecí cystein dioxygenázy a nadprodukcí efluxních pump pro cystein dochází k zvýšené produkci cysteinu bakterií, který je transportován ven z buňky (Takumi *et al.* 2017) Nadprodukce cysteinu je způsobena jeho důležitou rolí v metabolismu síry. Syntéza L-cysteinu je hlavním mechanismem redukce síry na organické sloučeniny, které mohou být následně použity k syntéze glutathionu, biotinu či koenzymu A. Kromě toho hraje cystein důležitou roli i při tvorbě S-S disulfidických můstků, skládání proteinů, či ochraně před oxidativním stresem. Cystein je tedy velmi potřebná a zároveň toxická látka. Také se ukázalo se, že homeostáza cysteinu je velmi důležitá pro adaptaci a intracelulární přežití *B. pertussis* v makrofázích (Farman *et al.* 2022).



**Obr. 4: Dráha přeměny cysteinu na pyruvát**



Na obrázku jsou znázorněny přeměny cysteinu. Jedna dráha přeměny cysteinu na pyruvát byla nalezena i u velké skupiny eubakterií. Převzato a upraveno (Dominy *et al.* 2006).

Rovněž se zvyšuje exprese genů zapojených do transportu esenciálních kovů, kterými je kobalt, nikl či hořčík. Např. u bakterií rodu *Salmonella* bylo zjištěno, že gen z rodiny ZupT přenáší kromě očekávaného zinku také mangan (Diaz-Ochoa *et al.* 2017). Bez příjmu mikroživin, mezi které patří i tyto kovy, by *B. pertussis* nemohla přežít v hostitelském prostředí – např. mangan hraje důležitou roli ve virulenci, jako antioxidant či enzymový kofaktor. Kobalt je zase nezbytná součást vitamínu B12. I u jiných bakterií se ukazuje, že defekty v transportu manganu mají vliv na zvýšenou citlivost k ROS molekulám v hostiteli a nižší virulenci těchto defektních kmenů (Tseng *et al.* 2001; Tseng *et al.* 2002). Hostitelské buňky se snaží bakteriím zabránit v příjmu mikroelementů, a tím zabránit jejich namnožení a kolonizaci hostitele, např. produkcí proteinu kalprotektinu uvolňovaného především z neutrofilů. Kalprotektin vycytává mangan a zinek z hostitelského prostředí, čímž dojde k zvýšení citlivostí bakterií k ROS molekulám (Kehl-Fie *et al.* 2011). Vychytávání mikroelementů se však bakterie může bránit – např. bakterie *Salmonella typhium* tvoří další kovové transportéry s vysokou afinitou, jejichž funkce není narušena kalprotektinem (Diaz-Ochoa *et al.* 2017). Kumulace mikroelementů – opět např. manganu však může být pro bakterii toxické. *B. pertussis* se velkému množství

intracelulárního manganu brání aktivaci manganového exportéru, který je za normálních podmínek nefunkční (způsobeno inhibiční duplikací v tomto genu). Funkce exportéru se obnoví 48 – 72 h po vystavení bakterie toxickému množství manganu (Čapek *et al.* 2021).

#### 2.3.2.1.1.2. Geny *B. pertussis* se sníženou expresí během intracelulárního přežívání

Během intracelulárního přežívání *B. pertussis* dochází také k snížené expresi části genů – např. některých faktorů virulence (PTX, PRN, Fim2). Dochází však také k snížené expresi sideroforů, či některých komponent dýchacího řetězce, čímž dochází ke snížení energetického metabolismu bakterie.

Siderofory jsou známá  $\text{Fe}^{3+}$  vazebná činidla, která vážou  $\text{Fe}^{3+}$  během jeho nedostatku s vysokou afinitou. Následně dochází k redukci nerozpustného  $\text{Fe}^{3+}$  na rozpustný  $\text{Fe}^{2+}$ . Během nedostatku  $\text{Fe}^{2+}$  také dojde k inaktivaci Fur represoru, čímž se aktivuje transport ostatních kovů, mezi které patří např. Mn či Co. Ionty železa získané siderofory, např. alcaliginem, jsou potřebné pro kolonizaci hostitele v prvotních fázích infekce (Brickman *et al.* 2007), perzistenci v hostiteli a intracelulární přežívání *B. pertussis*. Pokud se však *B. pertussis* setká s nedostatkem  $\text{Fe}^{2+}$  v hostiteli, dochází k expresi mnoha genů spojených s virulencí – např. genů sekrečního systému typu III (Brickman *et al.* 2011). V pozdějších hodinách infekce však dochází ke zvýšené produkci alcaliginových sideroforů, což naznačuje adaptaci *B. pertussis* na zdroje  $\text{Fe}^{2+}$  přítomného v intracelulárním prostředí makrofágů (Farman *et al.* 2022).

## 3. Materiál a metody

### 3.1. Materiál

#### 3.1.1. Biologický materiál

##### 3.1.1.1. *Bordetella pertussis*

###### ***B. pertussis*, kmen Tohama I**

V infekčních experimentech byl nejčastěji používán kmen Tohama I, izolovaný v 50. letech minulého století v Japonsku. Byly použity i deleční varianty tohoto kmene, či mutantní kmeny trvale se vyskytující v Bvg<sup>+</sup> fázi. Jejich seznam je uveden v tabulce (Tabulka 1).

Bakterie *B. pertussis* kmene Tohama I GFP (green fluorescent protein) a mScarlet byly použity v experimentech, kde byla prováděna vizualizace fluorescenčním mikroskopem.

Deleční varianty kmene	Název / funkce deletovaného genu
<i>B. pertussis</i> Tohama I	
$\Delta BP2871$	cystein dioxygenáza
$\Delta BP3011$	cystein dioxygenáza
RisA	RisA regulátor odpovědi

Tab. 1. Přehled delečních kmenů *B. pertussis* použitých v diplomové práci. Deleční kmeny byly připravené v Laboratoři post-transkripční kontroly genové exprese MBÚ AV ČR.

###### ***B. pertussis*, kmen B1917**

Klinický izolát, izolovaný v roce 2000 v Nizozemí.

###### ***B. pertussis*, kmen 18323**

Klinický izolát, izolovaný v roce 1946 v USA.

Všechny výše zmíněné bakteriální kmeny byly dlouhodobě uchovávány v SS médiu s 20 % glycerolem při - 80 °C.

### 3.1.1.2. Lidská buněčná linie – THP-1

Lidská leukemická monocytární buněčná THP-1 linie byla získána ze sbírky ATCC (ATCC, TIB-202). THP-1 buňky byly kultivovány v RPMI 1640 médiu s 10 % fetálního telecího séra (FCS – fetal calf serum).

THP-1 buňky byly dlouhodobě uchovávány v RPMI médiu s FCS (40 %) a DMSO (10 %) při teplotě -150 °C.

### 3.1.2. Kultivační půdy

#### 3.1.2.1. Pevné půdy

Pro růst bakterií *B. pertussis* na pevné půdě byl použit BG (Bordet-Gengou) agar obohacený beraní krví nebo CHA (Charcoal) agar. Kultivační média byla rozlévána do Petriho misek (Ø 90 mm) po 20 ml a byla uchovávána při 4 °C.

#### **Bordet-Gengou (BG) agar obohacený beraní krví**

BG agar (Difco™)	30 g
Glycerol (Serva)	10 g
Berání krev (LabMediaServis s.r.o.)	15 % (v/v)
dH2O	do 1 l

Tab. 2: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu BG agaru.

#### **Charcoal (CHA) agar**

CHA agar (Oxoid)	20,4 g
dH2O	do 400 ml

Tab. 3: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu CHA agaru.

### 3.1.2.2. Komplexní kultivační médium pro růst *B. pertussis*

Pro růst *B. pertussis* v tekuté kultuře bylo použito SS (Stainer-Scholte) medium. SS médium se skládá z frakce A a frakce B. Zásobní roztoky frakce A i frakce B byly dlouhodobě uchovávány v teplotě – 25 °C.

#### Stainer-scholte (SS) médium – zásobní roztoky

Frakce A 10x koncentrovaná		Frakce B 100 x koncentrovaná	
Složení	Množství (g)	Složení	Množství (g)
Tris-HCL (VWR)	63,6	L- cystein (Sigma)	0,4
Tris-báze (VWR)	11,8	FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,1
L glutamát sodný (Sigma)	107,2	L-kyselina askorbová (Sigma)	0,2
L- prolin (Sigma)	2,4	Kyselina nikotinová (Sigma)	0,04
NaCl (Lach-Ner)	25	L-glutathion (Sigma)	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	5	ddH <sub>2</sub> O	do 1 l
KCl (Sigma)	2		
MgCL <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Sigma)	1		
CaCL <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Penta)	0,2		
ddH <sub>2</sub> O	do 1 l		

Tab. 4: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu koncentrovaných zásobních roztoků frakce A a frakce B.

### Kompletní Frakce A (1x koncentrovaná)

Frakce A (10x koncentrovaná)	50 ml
Cyklodextrin (Sigma)	0,5 g
Hydrolyzát kaseinu (BD)	2,5 g
dH <sub>2</sub> O	do 0,5 l

Tab. 5: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu kompletní frakce A.

Těsně před inokulací *B. pertussis* do kompletního SS média byla přidána frakce B (100 x koncentrovaná) v příslušném množství.

#### 3.1.2.3. Komplexní kultivační médium pro THP-1 buňky

Pro růst THP-1 buněk bylo použito RPMI 1640 médium.

#### RPMI 1640

Fetal calf sérum (Sigma, F7524)	10 % (v/v)
RPMI 1640 (Sigma,-R8758)	500 ml

Tab. 6: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu RPMI média.

Fetal calf serum (FCS) bylo nejprve tepelně inaktivováno při 56 °C po dobu 30 minut. Poté bylo dlouhodobě uchováno při teplotě – 25 °C.

RPMI 1640 médium s přidavkem FCS bylo uchováno při teplotě 4 °C po dobu 1 - 2 měsíců.

Do média používaného v tkáňových kulturách nebylo přidávané antibiotikum.

#### 3.1.3. Pufry

Deionizovaná voda (ddH<sub>2</sub>O) použitá pro přípravu pufrů byla připravena deionizací destilované vody (dH<sub>2</sub>O) systémem Ultrapur (Watrex).

### **PBS, pH = 7,4**

NaCl (Lach-Ner)	138 mM
KCl (Sigma)	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma)	12 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Lach-Ner)	2 mM

Tab. 7: Seznam chemikálií potřebných pro přípravu PBS pufru.

### **3.1.4. Chemikálie**

Většina použitých chemikálií byla od firem Sigma, Lach-Ner, Difco a Oxoid. Chemikálie pro přípravu kultivačních pūd a pufrů již byly popsány v textu.

#### **3.1.4.1. Séra**

Pro opsonizaci *B. pertussis* bylo využito lidské sérum od společnosti Sigma a první mezinárodní standardizované antisérum proti *B. pertussis* (zajišťující NIBSC – Národní institut pro biologické standardy a kontrolu). Séra byla dlouhodobě skladována při teplotě – 25 °C (Sigma) či – 80 °C (NIBSC).

#### **Lidské Sérum (Sigma, H4522)**

Sérum ze zdravých lidských jedinců. Dle námi provedené analýzy obsahuje hodnoty protilátek odpovídající patientským sérum.

#### **Lidské sérum (NIBSC, 06/140)**

Sérum z *B. pertussis* pozitivních lidských jedinců. Obsahuje následující definované množství protilátek: 335 IU IgG a 65 IU IgA anti-PT, 130 IU IgG a 65 IU IgA anti – FHA.

### **3.1.5. Technické zázemí**

#### **3.1.5.1. Sterilizace**

Sterilizace laboratorního skla a živných médií byla provedena autoklávováním po dobu 20 minut, při tlaku 0,12 MPa.

### 3.1.5.2. Měření pH

Hodnota pH byla měřena na pH metru s iontově selektivní skleněnou elektrodou. Před každým měřením byla pH metr kalibrován. Hodnota pH roztoku byla upraveno pomocí NaOH a HCl.



## 3.2. Metody

### 3.2.1. Kultivace *B. pertussis*

Kultivace bakterií *B. pertussis* na pevném médiu byla provedena na BG agaru s 15 % přídavkem beraní krve nebo na CHA agaru. Bakterie byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C pod 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou. Standardní doba růstu *B. pertussis* na pevné půdě byla 3 dny před inokulací do tekutého média a 6 dní pro hodnocení CFU.

Kultivace bakterií *B. pertussis* v tekutém médiu byla provedena v SS médiu. *B. pertussis* byly kultivovány v tekutém médiu přes noc. Množství použité biomasy na zaočkování nočního inokula odpovídalo fyziologii daného kmenu, aby druhý den dorostl do požadovaného O.D. Pro infekční experimenty bylo ideální O.D.<sub>600</sub> = 1, kdy se bakterie vyskytovaly ve střední exponenciální fázi růstu. Bakterie byly kultivovány na orbitální třepačce při teplotě 37 °C a 160 rpm.

#### 3.2.1.1. Měření růstové křivky bakteriální kultury

Paralelně byl sledován růst bakteriální kultury *B. pertussis* v závislosti na čase ve Spektrofotometru Epoch 2, který zaznamenává změnu bakteriálního zákalu s frekvencí 30 min při 600 nm. Bakterie byly ve Spektrofotometru kultivovány v 1 ml SS média ve 24 jamkové destičce, teplota byla 37 °C, počáteční O.D.<sub>600</sub> = 0,05, jako blank bylo použito SS médium. Růst bakteriální kultury byl monitorován do stacionární fáze růstu. Ve spektrofotometru byl testován růst divokých a mutantních kmenů *B. pertussis*.

#### 3.2.2. THP-1 buňky

THP-1 buňky jsou dlouhodobě uchovávány v kryozkumavce při teplotě - 150 °C. Po rozmražení byly 2 x promyty RPMI médiem a odděleny centrifugací (3 min, 1200 rpm, pokojová teplota), čímž došlo k odstranění konzervačního média. Následně byly resuspendovány ve 20 ml RPMI média a přeneseny do misky pro tkáňové kultury. THP-1 buňky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C pod 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou. Následující 2 dny bylo buňkám vyměňováno RPMI médium za nové. Doba zdvojení THP-1 buněk se pohybovala mezi 24 – 48 hodin.

### 3.2.2.2. Počítání THP-1 buněk

Množství THP-1 buněk bylo spočítáno v Bürkerově komůrce, podle úměry 4 buňky / počítací pole odpovídají 1 milionu THP-1 buněk v 1 ml. Buňky mohly být před počítáním zakoncentrované centrifugací (3 min, 1200 rpm, pokojová teplota). Počítání buněk bylo použito před diferenciací THP-1 buněk.

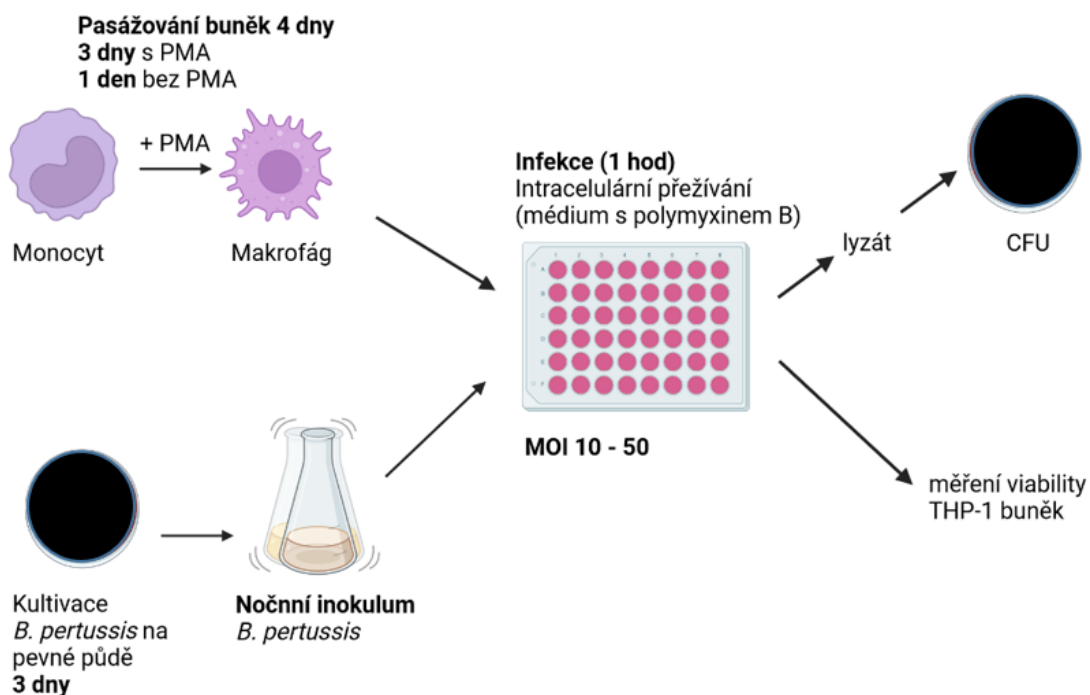
### 3.2.2.3. Diferenciace THP-1 buněk

Diferenciace THP-1 buněk začínala přidavkem PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) o výsledné koncentraci 100 nM. Jedná se o chemický stimul, který aktivuje diferenciaci monocytů THP-1 na makrofágy. Následně bylo do každé jamky kultivační destičky přidáno adekvátní množství THP-1 buněk tak, aby výsledná konfluence THP-1 makrofágů byla 80 – 90 % (např. do nejčastěji používané 48 jamkové destičky bylo přidáno 400  $\mu$ l buněčné suspenze obsahující  $4,6 \times 10^5$  THP-1 buněk). Diferenciace probíhala 4 dny, poslední den byl bez stimulace PMA. Změny v morfologii buněk během diferenciaci byly ověřovány mikroskopicky.

### 3.2.3. Infekce makrofágů THP-1 divokými kmeny a delečními mutanty *B. pertussis*

Ráno byla změřena O.D. nočního inokula *B. pertussis*. Pomocí přímé úměry, kdy  $O.D._{600} = 1$  odpovídají  $2 \times 10^9$  bakterií *B. pertussis* v 1 ml, bylo vypočítáno adekvátní množství bakteriální kultury, kterým byly infikovány THP-1 makrofágy. Bakterie byly na infekci naředěny v RPMI médiu. Počáteční infekční dávka (MOI, poměr počtu THP-1 buněk ku počtu *B. pertussis*) byla v rozmezí 1:1 – 1:50 (např. do nejčastěji používané 48 jamkové destičky bylo přidáno 400  $\mu$ l buněčné suspenze obsahující  $4,6 \times 10^6$  bakterií při použití MOI 1:10). Schéma infekčního experimentu je znázorněno na Obr. 5.

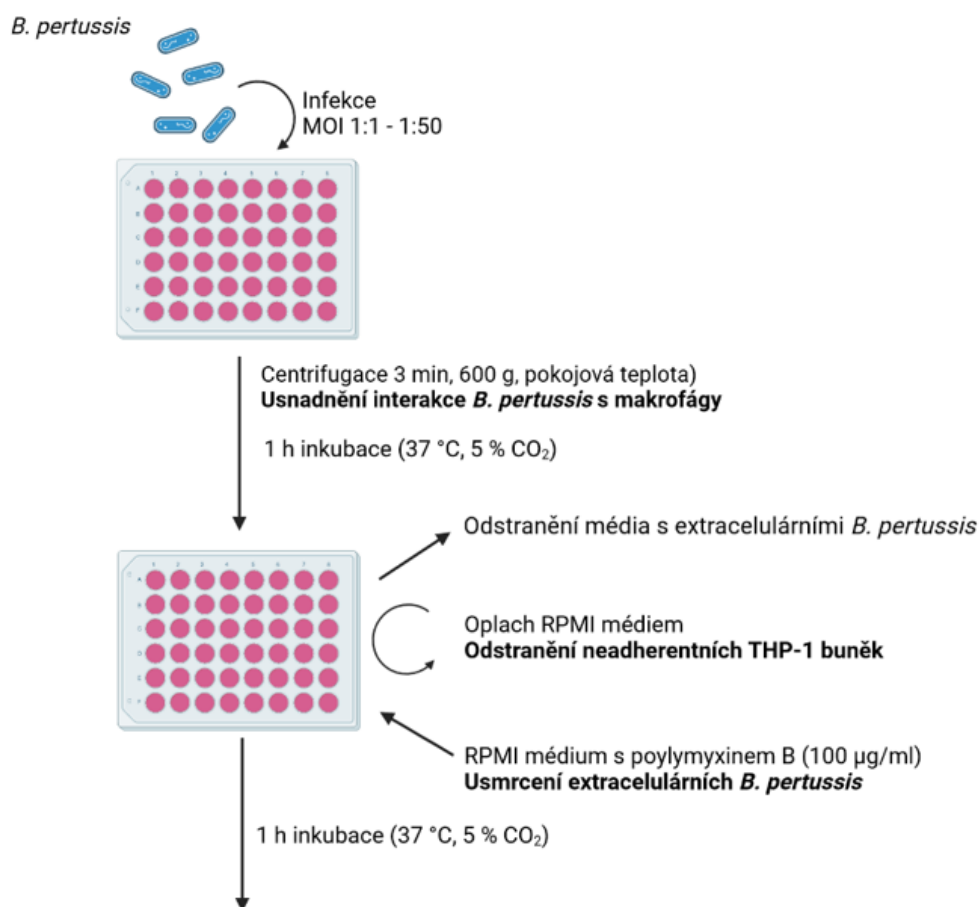
**Obr. 5: Schéma infekčního experimentu**



Nejprve se diferenciují monocyty na makrofágy po dobu 4 dnů. Mezitím se kultivuje *B. pertussis* na pevné půdě po dobu 3 dnů a následně je inokulována v SS médiu přes noc. Následující den jsou THP-1 buňky infikovány příslušným množstvím *B. pertussis* po dobu 1 h. Následně se vymění médium s bakteriemi za médium s polymyxinem B, který zabije extracelulární bakterie. Infekční experiment slouží pro zjištění počtu intracelulárních bakterií pomocí CFU, nebo vliv *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk pomocí WST-1 assay. Vytvořeno v BioRender.com.

Kultivační destička byla po přidání příslušného množství bakterií *B. pertussis* centrifugována (3 min, 600 g, pokojová teplota), aby se usnadnila interakce *B. pertussis* s makrofágy, a následně inkubována v inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 1 hodiny, během které došlo k fagocytóze *B. pertussis* THP-1 makrofágy. Následným oplachem RPMI médiem došlo k odstranění extracelulárních bakterií a neadherentních THP-1 buněk. Zbylé extracelulární bakterie byly odstraněny přidáním RPMI média s antibiotikem polymyxin B o koncentraci 100 µg/ml. Destička byla inkubována v inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 1 hodiny. Podrobnější schéma průběhu infekce je znázorněno na Obr. 6.

**Obr. 6: Schéma prvních 2 h infekce**



Po infekci THP-1 buněk *B. pertussis* je kulturační destička centrifugována, aby došlo k usnadněné interakci *B. pertussis* s makrofágy. Po 1 hodině infekce dojde k odstranění média s extracelulárními bakteriemi a oplachu, čímž jsou odstraněny neadherentní THP-1 buňky vzniklé po infekci *B. pertussis*. Následně je přidáno médium s polymyxinem B, čímž dojde k usmrcení zbylých extracelulárních bakterií. Vytvořeno v BioRender.com.

Infekční experiment byl použit pro zjištění počtu intracelulárních bakterií pomocí hodnocení CFU, nebo pro zjištění vlivu *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk pomocí WST-1 assay (Obr. 5). Průběh infekce THP-1 buněk vybranými kmeny *B. pertussis* byl pozorován také mikroskopicky.

### 3.2.3.1. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopií byl zaznamenáván průběh infekce THP-1 buněk *B. pertussis* Tohama I GFP a mScarlet v reálném čase. Infekce byla pozorována na mikroskopu Olympus CellR po dobu 1 hodiny při stonásobném / dvěstěásobném zvětšení.

### 3.2.3.2. CFU

CFU slouží pro zjištění přesného počtu bakterií *B. pertussis* ve vzorku. Pro CFU byly použity misky s CHA agarem, na které bylo zaočkováno 100  $\mu$ l bakteriální kultury zředěné do požadovaného množství. Většinou byly použity tetraplikáty na 1 vzorek. Kolonie na miskách byly spočítány po 6 dnech růstu.

Nejprve byly na misky zaočkovány *B. pertussis* použité na infekci THP-1 buněk (inokulum). Tato série vzorků byla označena jako časový bod T0 hod.

Při výsevech intracelulárních bakterií byly v určitých časových bodech jamky s THP-1 buňkami infikovanými bakteriemi *B. pertussis* 2x promyty PBS, lyzovány v dH<sub>2</sub>O a následně zaočkovány na misky.

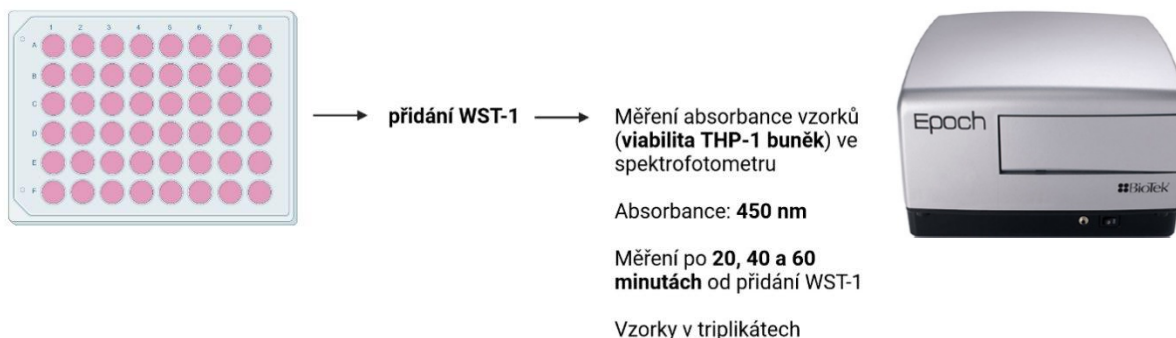
Při výsevech extracelulárních bakterií *B. pertussis* byly na misky zaočkovány bakterie vyskytující se v RPMI médiu 1 h po infekci.

*B. pertussis* byly před výsevy naředěny v SS médiu.

### 3.2.3.3. WST-1 assay

Pro zjištění vlivu *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk byla použita WST-1 assay (Obr. 7), která slouží ke kvantifikaci počtu životaschopných buněk v médiu. V určitých časových bodech byl k infikovaným THP-1 buňkám přidán Cell Proliferation Reagent WST-1. Reakce je založena na štěpení tetrazoliové soli na formazan působením mitochondriálních dehydrogenáz. Tato reakce je doprovázena barevnou změnou, která byla měřena na spektrofotometru Epoch 2, absorbance 450 nm. Barevná změna byla měřena po 20, 40 a 60 minutách od přidání kitu. Měřené vzorky byly nejčastěji v triplikátech. Jako kontrola byly použity neinfikované THP-1 buňky s přidáním Cell Proliferation Reagent WST-1, jako blank bylo použito RPMI médium a přidáním Cell Proliferation Reagent WST-1.

**Obr. 7: Schéma měření viability THP-1 buněk po infekci *B. pertussis***



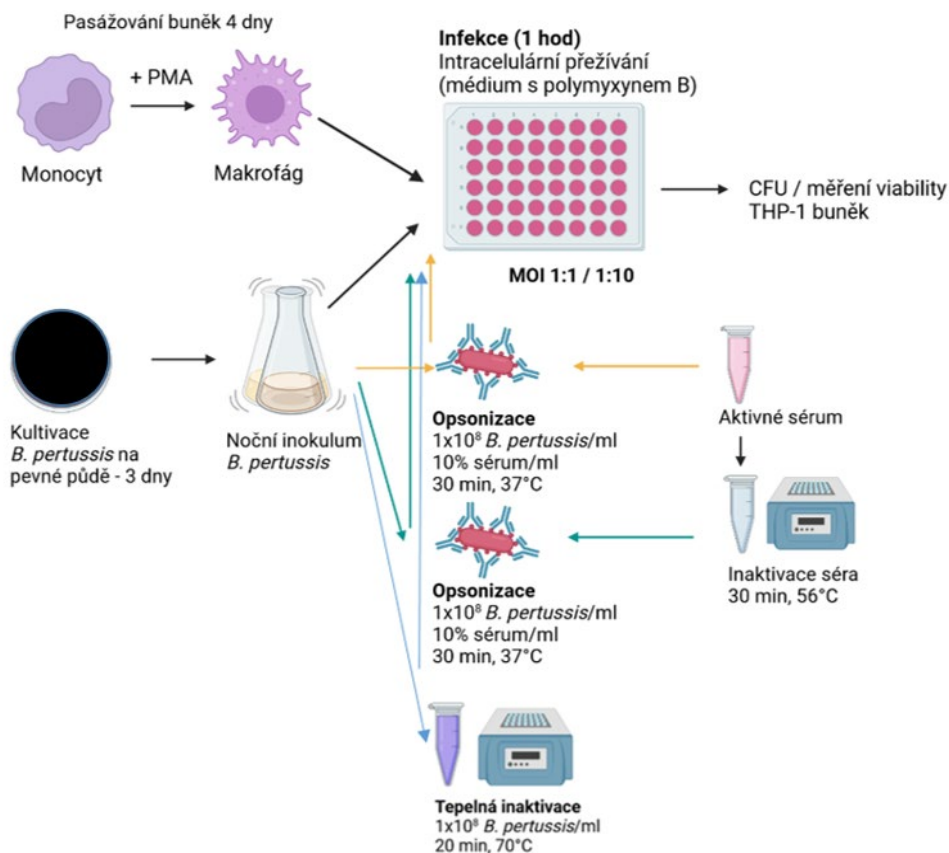
K THP-1 buňkám infikovanými *B. pertussis* se přidá WST-1. Reakce je doprovázena barevnou změnou měřenou na spektrofotometru Epoch 2 (při absorbanci 450 nm) každých 20 minut po doby 1 hodiny. Měřené vzorky jsou v triplikátech. Vytvořeno v BioRender.com.

#### 3.2.3.4. Infekce makrofágů THP-1 opsonizovanými *B. pertussis*

Diferenciace THP-1 buněk a kultivace *B. pertussis* byla identická jako při infekci THP-1 buněk divokými a mutantními kmeny *B. pertussis* (viz kapitola 3.2.3.).

Před infekcí byla nejprve inaktivována část séra (30 min, 56 °C). Následně byly bakterie *B. pertussis* v množství  $10^8$  bakterií / 1 ml inkubovány (30 min, 37 °C) s aktivním nebo inaktivovaným sérem v RPMI médiu bez přidaného FCS. Pro inkubaci bylo použito 1 – 20 % sérum / 1 ml. Současně bylo tepelně inaktivováno (20 min, 70 °C)  $10^8$  bakterií *B. pertussis* / 1 ml a následně byly inkubovány (30 min, 37 °C) v RPMI médiu s 10 % FCS. Zároveň byly inkubovány (30 min, 37 °C) živé *B. pertussis* v RPMI médiu s 10 % FCS, které sloužily jako kontrola. Následně došlo k infekci makrofágů bakteriemi. Zbýlý průběh experimentu zůstal beze změny. Schéma celého experimentu je znázorněné na Obr. 8.

**Obr. 8: Schéma infekčního experimentu**



Nejprve se diferenciuji monocyty na makrofágy po dobu 4 dní. Mezitím se kultivuje *B. pertussis* na pevné půdě po dobu 3 dnů a následně je inokulována v SS médiu přes noc. Následující den je nejprve tepelně inaktivované sérum a následně je *B. pertussis* inkubována s aktivním a inaktivovaným sérem. Současně dochází k tepelné inaktivaci *B. pertussis*. THP-1 buňky jsou infikovány příslušným množstvím *B. pertussis* po dobu 1 h. Následně se vymění médium s bakteriemi za médium s polymyxinem B, který zabije extracelulární bakterie. Infekční experiment slouží pro zjištění počtu intracelulárních bakterií pomocí CFU, nebo vliv *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk pomocí WST-1 assay. Vytvořeno v BioRender.com.

## 4. Cíle práce

Diplomová práce byla zaměřena na studium intracelulárního přežívání vybraných kmenů bakterie *Bordetella pertussis* v hostitelských buňkách makrofágů za různých podmínek.

V rámci diplomové práce byly **stanoveny následující cíle** vycházející z hypotézy, že přežívání *B. pertussis* v buňkách imunitního systému je součástí životního cyklu bakterie a umožňuje jí vyhnout se akutní imunitní odpovědi hostitele:

1. Optimalizace THP-1 infekčního modelu.
2. Ověření životaschopnosti vybraných mutantních kmenů *B. pertussis* při intracelulárním přežívání v THP-1 makrofázích.
3. Sledování vlivu protilátek a komplementu na intracelulární přežívání *B. pertussis*.



## 5. Výsledky

### 5.1. Růstová charakteristika kmenů *B. pertussis* použitých při infekčních experimentech

Dobrym základem pro infekční experimenty byla standardní a reprodukovatelná kultivace bakterií, a to jak divokého typu *Bordetella pertussis*, tak jejích mutantních forem. Snahou bylo charakterizovat vybrané kmeny *B. pertussis* a docílit tak na počátku infekčního experimentu stejného fyziologického stavu všech sledovaných kmenů *B. pertussis*.

Kultivace kmenů startovala na „charcoal“ agarrech bez krve, následována kultivací v tekutém SS médiu při 37 °C, která byla kontinuálně monitorována na spektrofotometru Epoch.

**Tab.8: Doba zdvojení divokých kmenů *B. pertussis***

Kmen <i>B. pertussis</i>	Doba zdvojení (medián (h) ± SD*)	Doba lagu (h)
Tohama I (N=18)	3,8 ± 0,1	1.5
B1917 (N=8)	6,1 ± 0,2	5
18323 (N=3)	5,6 ± 0,1	1.5

Bakteriální zákal byl měřen ve 12 jamkové destičce (objem v jamce 1 ml) na spektrofotometru při 600 nm.

\*SD = směrodatná odchylka

V experimentech byly použity 3 divoké kmeny *Bordetella pertussis*. Vzhledem k referenčnímu kmenu Tohama I měly kmeny B1917 i 18323 delší dobu zdvojení, a to u B1917 o cca 60 % a u 18323 o 45 %. Doba lagu bakterie byla výrazně delší pouze u kmene B1917 (viz Tab. 8).

**Tab. 9: Doba zdvojení mutantních kmenů *B. pertussis* Tohama I**

Kmen <i>B. pertussis</i>	Doba zdvojení (medián (h) ± SD*)	Doba lagu (h)
$\Delta(BP2871+BP3011)$ , (N=4)	5,4 ± 0,3	2
$\Delta BP2871$ (N=4)	3,9 ± 0,1	2
$\Delta BP3011$ (N=4)	4 ± 0,2	1.5
Bvg <sup>+</sup> ** (N=6)	3,7 ± 0,2	1.5
$\Delta risA$ *** (N=4)	4,8 ± 0,1	1.3

Bakteriální zákal byl měřen ve 12 jamkové destičce (objem v jamce 1 ml) na spektrofotometru Epoch 2 při 600 nm. Uvedené deleční mutanty jsou na pozadí *B. pertussis* Tohama I.

\*SD = směrodatná odchylka

\*\**bvg*<sup>+</sup> je mutantní kmen trvale se vyskytující v Bvg<sup>+</sup> fázi, resp. trvale aktivní BvgS kináza

\*\*\**risA* je mutantní kmen s deletovaným regulátorem odpovědi RisA

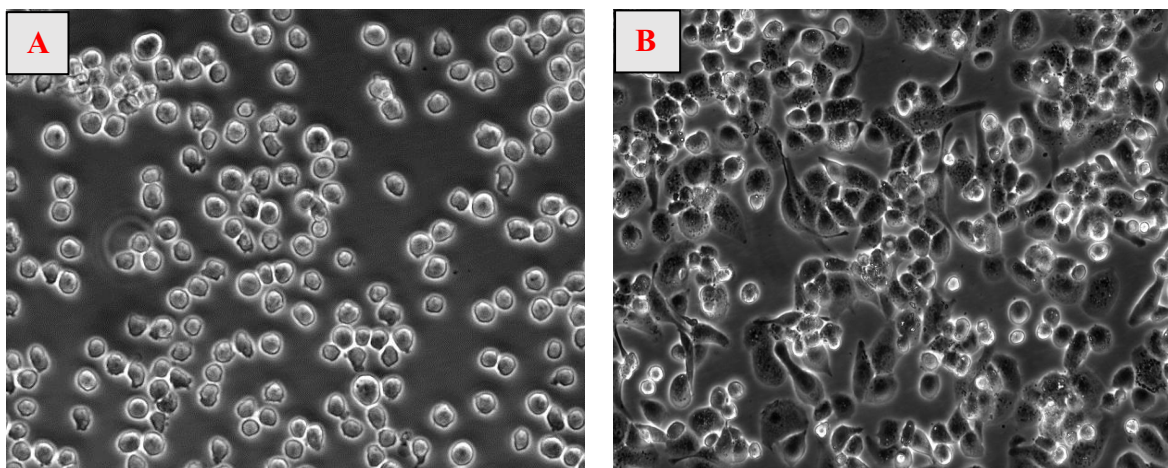
Testované deleční kmeny *B. pertussis* byly na pozadí kmene Tohama I. Kmeny s mutací v genu *BP2871*, *BP3011* a Bvg<sup>+</sup> kmen rostly s podobnou dobou zdvojení jako divoký typ. K významnému prodloužení doby zdvojení došlo až u delečního kmene ve dvou genech (*BP2871+BP3011*) a to o 40 % a u *risA* mutantního kmene o 26 %. Doba lagu byla ve sledovaných kmenech podobná s mírným prodloužením u kmene  $\Delta BP2871$  a  $\Delta(BP2871+BP3011)$ , (viz Tab. 9).

Doba zdvojení se liší nejen u mutantních kmenů, ale i u sledovaných divokých typů *B. pertussis*. Získané informace nám poslouží pro správnou synchronizaci růstu vybraných kmenů při infekčních experimentech.

## 5.2. THP-1 monocytární buněčná linie

Monocytární THP-1 buněčná linie byla diferenciována na adherentní makrofágy pomocí chemického stimulu PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Diferenciace probíhala 3 dny s jedním dnem bez stimulace PMA. Změny v morfologii buněk po diferenciaci byly ověřovány mikroskopicky.

**Obr. 9: Diferenciace THP-1 buněk**



Diferenciace THP-1 buněk ve 4. dnu po stimulaci PMA. Nestimulované THP-1 buňky – monocyty – plovoucí buňky (Obr. 9A) a stimulované – makrofágy – adherované na povrch (Obr. 9B). Kultivace probíhala na 6 jamkových destičkách v RPMI médiu při 37 °C.

Obrázky byly pořízeny na mikroskopu Olympus, typ CellR. Použité zvětšení: 100 x.

Po 4 dnech stimulace THP-1 buněk s PMA došlo ke změně morfologie buněk. THP-1 buňky, byly větší, granulované a adherovaly k povrchu kultivační destičky. Výsledná konfluence diferenciovanych makrofágů po 4 dnech diferenciace se pohybovala mezi 80 – 90 %.

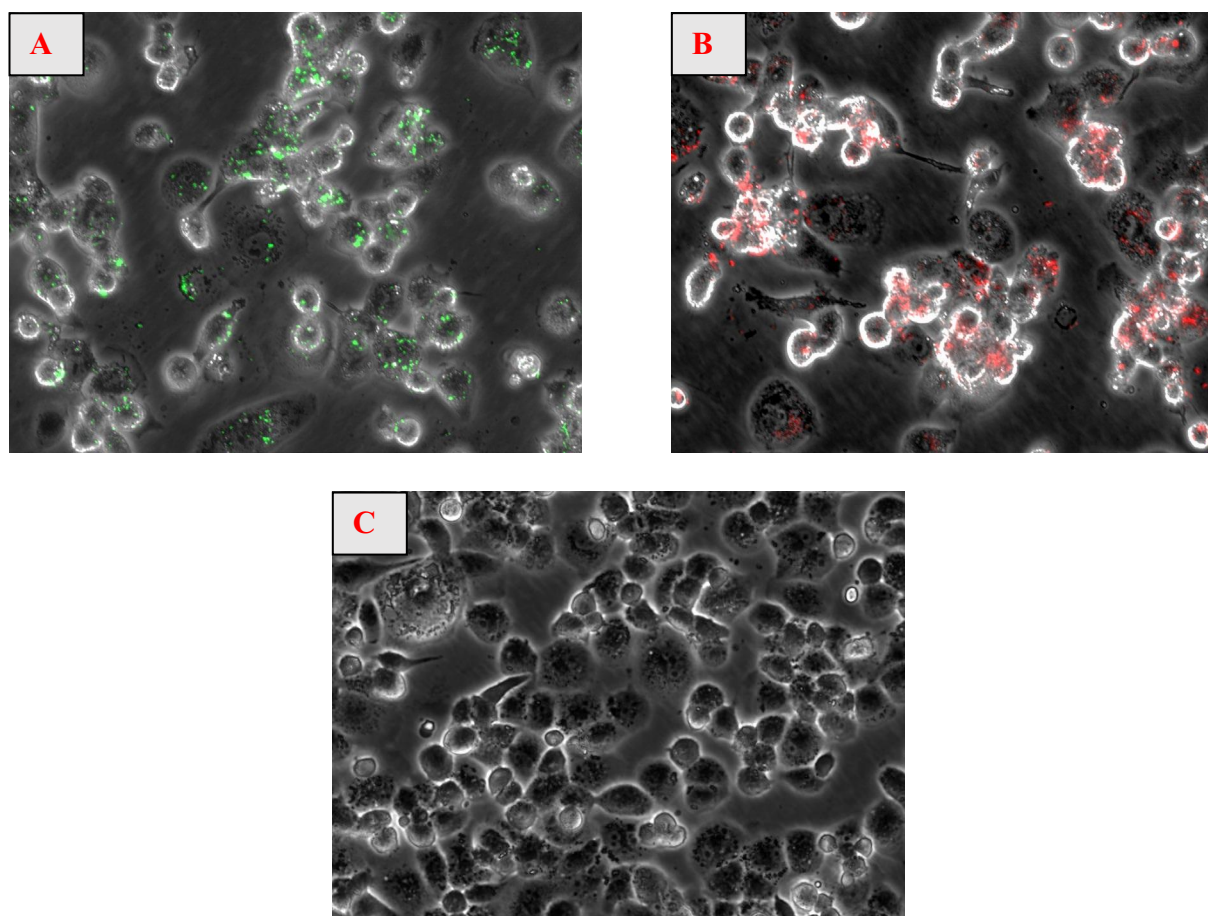
Mikroskopie sloužila ke kontrole správně diferenciovanych THP-1 buněk následně použitých na infekční experiment.

### 5.3. THP-1 infekční model

Pomocí standardizované buněčné linie THP-1 se zkoumal vliv bakterie *B. pertussis* a jejich mutantních kmenů na viabilitu THP-1 buněk a počet přeživších intracelulárně lokalizovaných *B. pertussis* uvnitř makrofágů (CFU).

Po diferenciaci byly THP-1 buňky infikované vybranými kmeny *B. pertussis*. Na infekční experimenty byly použity počáteční hodnoty MOI od 1 do 50 dle typu experimentu. Po 1 h inkubace byly extracelulární bakterie usmrceny přidáním polymyxinu B o koncentraci 100 µg/ml. Průběh infekce byl u vybraných experimentů sledován i mikroskopicky při použití GFP nebo mScarlet produkujícího kmene *B. pertussis* (Obr. 10).

**Obr. 10: THP-1 makrofágy infikované kmeny *B. pertussis* Tohama I GFP a mScarlet**



THP-1 makrofágy infikované kmeny *B. pertussis* Tohama I GFP (Obr. 10A), mScarlet (Obr. 10B) a kontrolní neinfikované makrofágy (Obr. 10C). Obrázky byly pořízeny 2 h po infekci. Infekce probíhala v 6 jamkových destičkách v RPMI médiu při 37 °C za použitého MOI 1:10.

Obrázky byly pořízeny na mikroskopu Olympus, typ CellR. Použité zvětšení: 200 x (Obr. 10A a B), 100 x (Obr. 10C).

Pro vizualizaci infekčního procesu, byly použity bakterie *B. pertussis* produkující fluorescenční signál. Makrofágy byly infikovány kmeny *B. pertussis* Tohama I GFP či mScarlet (viz Obr. 10A a B). Oba modely byly vhodné pro kontrolu infekce. Po infekci THP-1 makrofágů *B. pertussis* byla pozorována nižší konfluence THP-1 buněk než u kontrolních neinfikovaných makrofágů (Obr. 10C) a byly detekovatelné oba typy značených bakterií (Obr. 10A a B). Paralelní výsevy na pevnou půdu potvrdily životaschopnost bakterií uvnitř makrofágů a tvořily přibližně 10 % z původního počtu (data nejsou prezentována).

Infekce THP-1 makrofágů *B. pertussis* probíhala podle našich předpokladů. Tento modelový systém byl pak použit i pro následující infekční experimenty, kde už nebyly použity bakterie s fluorescenčním signálem.

## 5.4. Přežívání bakterie *Bordetella pertussis* v THP-1 buňkách

Infekční experiment v sobě zahrnoval synchronizaci jak eukaryotické části experimentu, tak fyziologického růstu *B. pertussis*. Bylo potřeba optimalizovat infekční experiment tak, abychom dosáhli reprodukovatelných výsledků. V počátcích se ukázalo, jak velký vliv mají vstupní parametry pokusu jako O.D. inokulační bakteriální kultury, či míra infekční dávky (MOI).

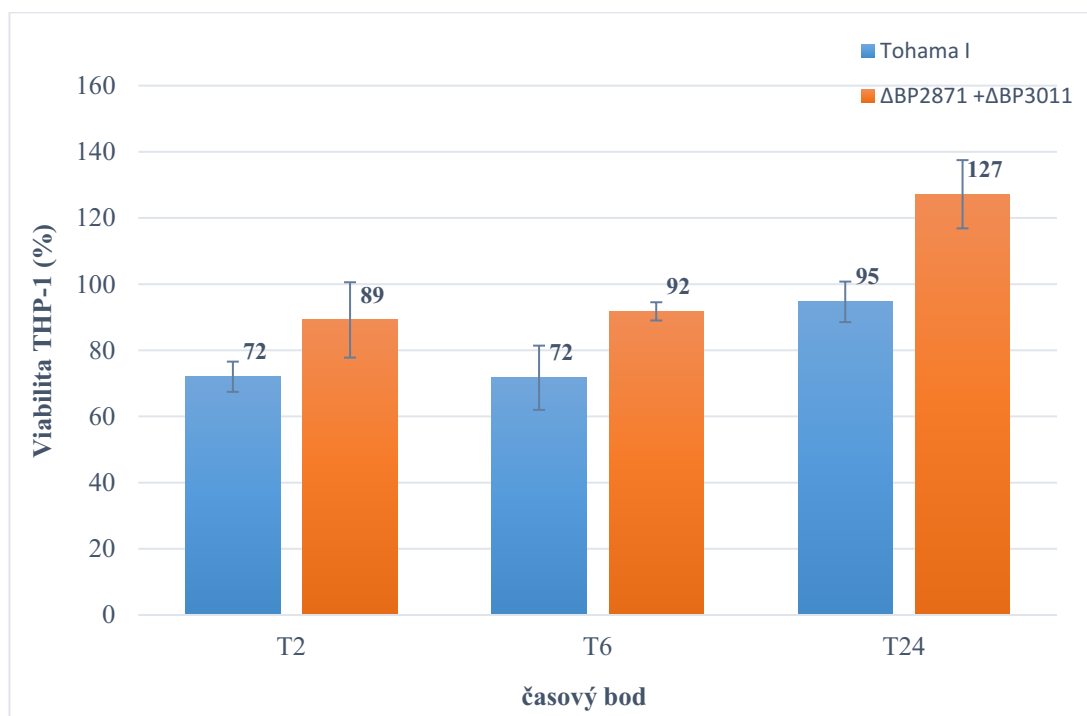
Testované kmeny *B. pertussis* byly vybrány na základě předchozí transkriptomické studie intracelulárně lokalizovaných bakterií, která ukázala po infekci významnou modulaci části bakteriálních genů (Farman *et al.* 2022). Pro testování byly vybrány geny pro cystein dioxygenázu či regulační geny zapojené v regulaci virulence bakterie a byl zkoumán vliv této deleční mutace při interakci s hostitelem.

Schopnost přežívání *B. pertussis* v THP-1 makrofázích byla hodnocena jak pomocí množství intracelulárně lokalizovaných bakterií pomocí výsevů na plotny (CFU), tak současně byl testován cytotoxický vliv bakterií na viabilitu hostitelských THP-1 buněk.

V rámci práce jsme se zaměřili na časovou fázi infekce, tj. v rozmezí 1-24 hod, s důrazem na časový bod T2 hod. Celkový průběh infekce je znázorněn na Obr. 5 kap. 3.2.3. Z výsledků bylo patrné, že v časovém bodě T2 hod a T6 hod byl vliv na makrofágy srovnatelný, a to jak u referenčního kmene (72 %), tak u kmene s dvojitou delecí genů pro cystein dioxygenázu (90 %). Po 24 hodinách došlo k zvýšení viability infikovaných THP-1 buněk na 95 % u kmene Tohama I a 127 % u kmene  $\Delta(BP2871+BP3011)$ , (Obr. 11).

Cytotoxické změny na makrofágy jsou dobře porovnatelné už T2 hod, na kterou jsme se v následujících experimentech zaměřili. V časovém bodě T24 hod naopak docházelo ke změnám i u diferencovaných makrofágů, tak už se na standardní testování mutantních kmenů bakterie *B. pertussis* tolik nehodila.

**Obr. 11: Cytotoxický vliv *B. pertussis* na THP-1 buňky v časné fázi infekce**



Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod, T6 hod a T24 hod v procentech byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem ze dvou biologických replikátů. Infekční dávka byla v tomto případě 1:10.

#### 5.4.1. Vliv fyziologického stavu bakterie před infekcí na průběh přežívání v hostiteli

Při infekčních experimentech se postupně ukázalo, jak důležitý vliv má fyziologický stav bakterie *B. pertussis* před infekcí. Pro standardizaci následujících experimentů bylo nutné otestovat vliv O.D. nočního inokula bakteriální kultury na následný infekční pokus a vybrat vhodnou fázi růstu, aby další infekční experimenty byly mezi sebou srovnatelné.

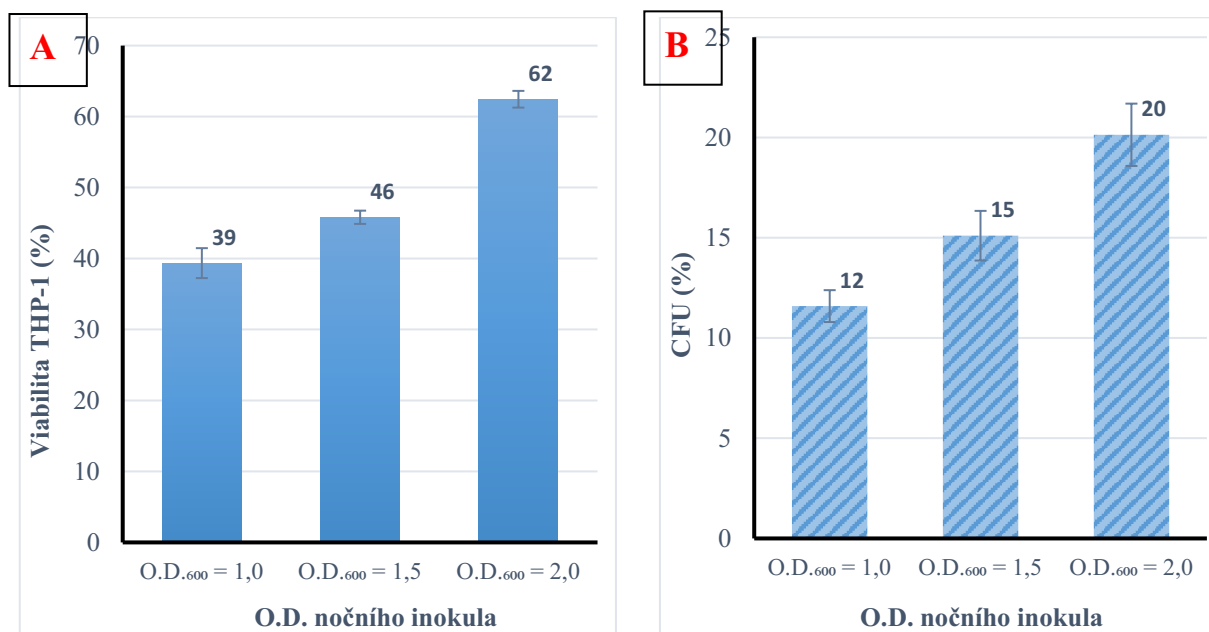
THP-1 makrofágy byly infikovány bakteriální kulturou, která v ranních hodinách dorostla na O.D.<sub>600nm</sub> 1,0; 1,5 a 2,0. V tomto experimentu se testoval referenční kmen Tohama I a ukázalo se, že se zvyšující se hodnotou O.D. se zvyšovala v čase T2 hod viabilita makrofágů (Obr. 12A). Tedy bakterie ztrácely svoji cytotoxicitu k hostitelským buňkám. Viabilita THP-1 buněk byla pro O.D. 1 a 1,5 kolem 40 % až 45 %. Při O.D. 2,0 dosahovala 60 %.

V následujících experimentech jsme se snažili vycházet z O.D. = 1, aby byly lépe vidět rozdíly v cytotoxicitě mezi srovnávanými kmeny.

Společně s tímto experimentem se testovalo i přežívání *B. pertussis* v makrofázích (Obr. 12B). Bylo hodnoceno, jaké množství bakterií přežívá v daný časový bod v makrofázích.

Ukázalo se, že se zvyšující se hodnotou O.D. nočního inokula se zvyšovala schopnost *B. pertussis* intracelulárně přežít v THP-1 makrofázích (Obr. 12B). Množství intracelulárních bakterií kmene Tohama I (ranní hodnota O.D.<sub>600 nm</sub> nočního inokula byla 1,0; 1,5 a 2,0) v T2 hod poklesla na 10 %, 15 %, resp. 20 % (vztaženo k danému inokulu).

**Obr. 12: Vliv fyziologického stavu nočního inokula *B. pertussis* (hodnota ranního odečtu O.D.<sub>600nm</sub>) na viabilitu THP-1 buněk a přežívání *B. pertussis* v makrofázích**



**Viability infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod (Obr. 12A)** v procentech byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem ze tří technických replikátů. Infekční dávka byla v tomto případě 1:20.

**Intracelulární přežívání *B. pertussis* (%) v makrofázích v T2hod (Obr. 12B)** bylo stanoveno poměrem CFU v T2 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem ze čtyř technických replikátů. Infekční dávka v tomto případě byla 1:20.

Popsaná situace nicméně ukazuje na provázanost systému. Tedy, že při nižší cytotoxicitě bakterií více makrofágů přežívá a při následném výsevu bakterií můžeme tak uměle navyšovat i počet intracelulárně lokalizovaných přeživších *B. pertussis*. Vyšší přežívání *B. pertussis* při O.D. = 2 může být tak částečně způsobeno větším množstvím THP-1 buněk ve vzorku. Mezi viabilitou makrofágů a intracelulárními bakteriemi není ideální přímá úměra.

Nicméně k daným okolnostem se ukazuje, že O.D. nočního inokula má vliv na intracelulární přežívání *B. pertussis* v makrofázích v průběhu infekce.

#### 5.4.2. Míra přežívání divokých kmenů *B. pertussis* v THP-1 buňkách

Referenčním kmenem pro *Bordetella pertussis* je kmen Tohama I, který je nejvíce studován a laboratorně používán. Přesto se může v některých parametrech od jiných divokých typů či klinických izolátů lišit, proto jsme vybrané infekční experimenty prováděli i s kmeny B1917 a 18323.

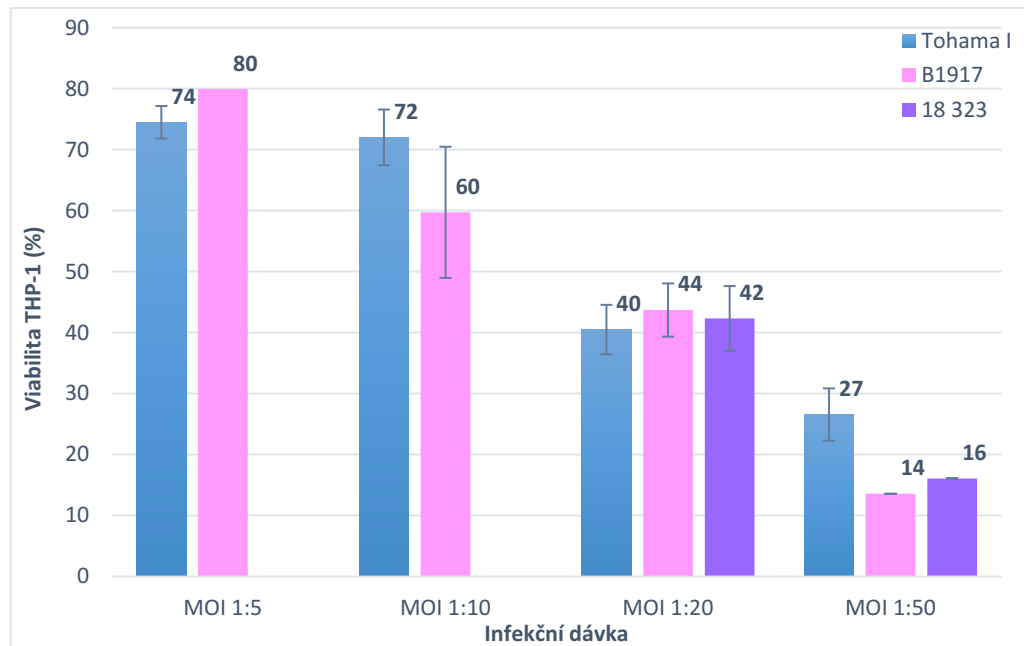
V infekčních experimentech se ukázalo, že na průběh má vliv i míra počáteční infekční dávky (MOI, resp. počet bakterií na jednu hostitelskou buňku). Z tohoto důvodu se testovaly kmeny při více MOI, pokud by se cytotoxický efekt kmene projevil pouze při určité infekční dávce.

THP-1 makrofágy byly infikovány kmeny *B. pertussis* o počáteční infekční dávce 1:5, 1:10, 1:20 a 1:50. Ukázalo se, že se zvyšující se infekční dávkou na začátku infekce se snižovala viabilita THP-1 makrofágů po infekci všemi divokými kmeny *B. pertussis* (Obr. 13). Při použití infekční dávky 1:5 a 1:10 (netestovalo se u kmene 18323) byla viabilita THP-1 buněk u všech kmenů cca 70 % v porovnání s neinfikovanými buňkami. Po infekci infekční dávkou 1:20 došlo k výraznému poklesu viability THP-1 buněk na cca na 40 %. Pokles viability THP-1 buněk byl nejvýraznější po použití MOI 1:50 – došlo k poklesu na cca 15 % po infekci kmeny B1917 a 18323 a 25 % po infekci kmenem Tohama I.

V následujících experimentech zaměřených na vlivu mutantních kmenů na viabilitu THP-1 buněk jsme se snažili testovat různá MOI, aby byl co nejlépe zmapován cytotoxický účinek vybraných kmenů.



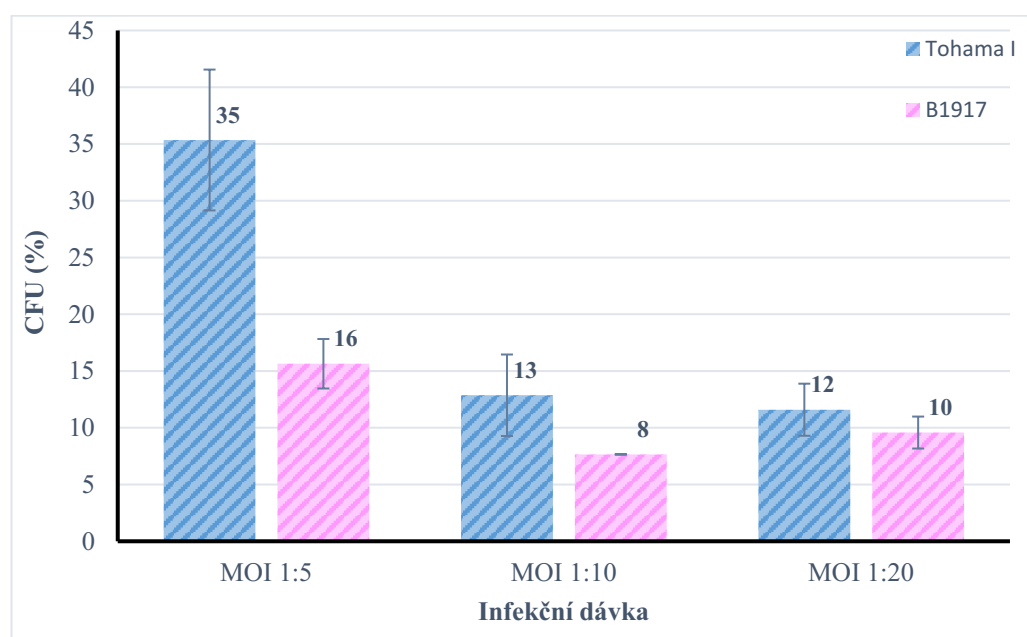
**Obr. 13: Vliv počáteční MOI na viabilitu THP-1 buněk a intracelulární přežívání laboratorních a divokých kmenů *B. pertussis***



**Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod** byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 4 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze triplikátu naměřených hodnot.

Společně s viabilitou THP-1 buněk se testovalo i přežívání divokých kmenů *B. pertussis* v makrofázích (Obr. 14) - CFU. Ukázalo se, že při použití nižší infekční dávky – MOI 1:5 bakterie lépe přežívaly uvnitř makrofágů. U kmene Tohama I bylo intracelulárně lokalizováno 35 % původního počtu bakterií (infekčního inokula), u kmene B1917 pouze 16 %. Při zvýšení infekční dávky na 1:10 klesl počet intracelulárně lokalizovaných bakterií na 10 % u obou testovaných kmenů (netestovalo se u kmene 18323). Počet intracelulárních bakterií se při zvýšení počáteční infekční dávky na 1:20 již dále neměnil.

**Obr. 14: Intracelulární přežívání laboratorního a divokého kmene *B. pertussis***



**Intracelulární přežívání *B. pertussis* (%) v makrofázích v T2 hod** bylo stanoveno poměrem CFU v čase T2 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 4 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze tetraplikátu naměřených hodnot.

### 5.4.3. Míra přežívání mutantních kmenů *B. pertussis* v hostiteli

Následně byl testován vliv mutace genů potenciálně zapojených v intracelulárním přežívání *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk a přežívání bakterií uvnitř makrofágů.

#### 5.4.3.1. Mutace v genech regulujících virulenci bakterie *B. pertussis* – bvg regulon a RisAK dvoukomponentový systém

Na základě výsledků z předešlé transkriptomické analýzy přežívání bakterií uvnitř THP-1 makrofágů se ukázalo, že *B. pertussis* zřejmě přechází do Bvg<sup>-</sup> fáze a zároveň dochází k aktivaci RisAK dvoukomponentového systému. Z tohoto důvodu byla testována jak míra přežívání, tak viabilita THP-1 buněk 2 hod po infekci těmito mutantními kmeny *B. pertussis*.

V průběhu infekčního experimentu jsme se snažili opět respektovat fyziologický stav bakterie a mít počáteční O.D. kultury kolem 1,0. U kmene *ΔrisA* docházelo ovšem k nerovnoměrnému poměru mezi O.D. kultury a výsledným MOI. Celková infekční dávka se pohybovala místo požadovaných MOI 1:20 pouze MOI 1:10. U tohoto kmene korelace mezi O.D. a množstvím životaschopných buněk použitých pro infekci nefungovala. Zřejmě byl velký podíl i mrtvých buněk v médiu, které ovšem mohou mít i vliv na sledované parametry, proto

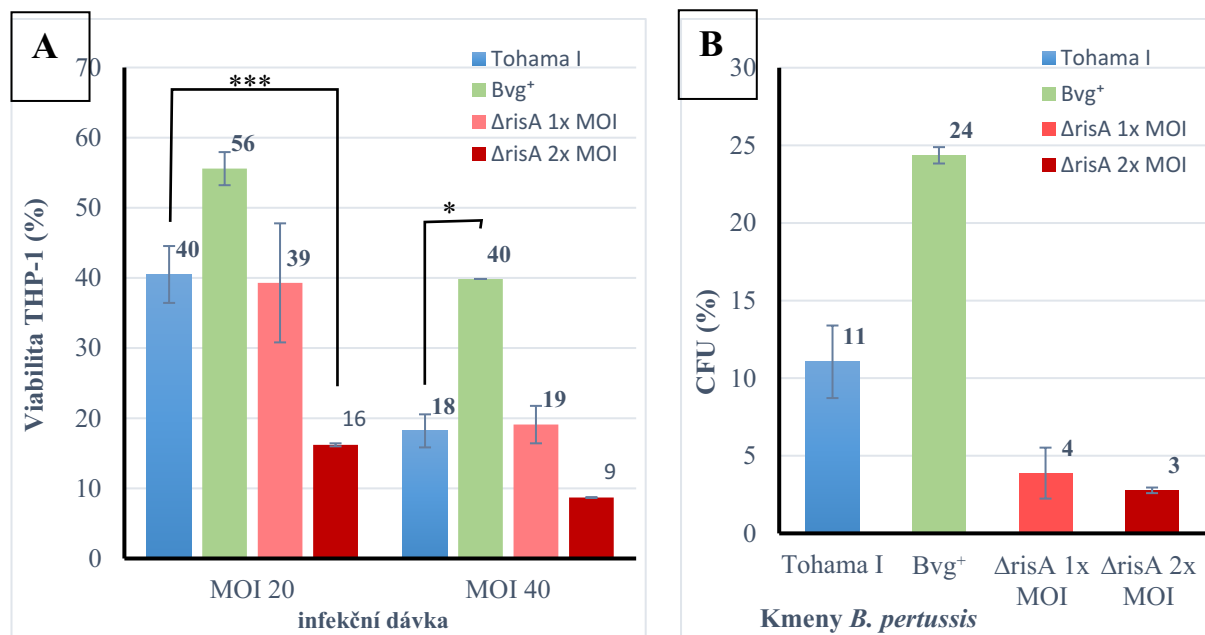
jsme zvolili při testování i dvojnásobnou MOI, abychom tak uměle dorovnali množství životaschopných bakterií při infekci.

THP-1 buňky byly infikovány kmeny Tohama I, Bvg<sup>+</sup> a *ΔrisA* infekční dávkou 1:20 a 1:40. Při infekční dávce 1:20 byla viabilita THP-1 buněk infikovaných referenčním kmenem a kmenem *ΔrisA* MOI 1:20 snížena na 40 % vzhledem k neinfikovaným THP-1 buňkám. Viabilita makrofágů byla vyšší, pokud byl použitý kmen alokovaný v Bvg<sup>+</sup> fázi, a to skoro na 60 %. Nejvíce cytotoxický a signifikantní efekt měl kmen *ΔrisA* ve dvojnásobné infekční dávce, kdy viabilita THP-1 klesla na 16 %. Stejný trend byl pozorován i při použití MOI 1:40 (Obr. 15A).

Pro porovnání bylo použito i statistického hodnocení ANOVA, ze kterého vyplynulo, že signifikantní vliv na viabilitu makrofágů má kmen Bvg<sup>+</sup> a to pouze při zvýšené infekční dávce MOI 1:40, při MOI 1:20 se to rozdíl také potvrdil, ale s vyšší pV = 0,095.

Současně bylo testováno i přežívání mutantních kmenů *B. pertussis* v makrofázích. Z výsledků vyplývá, že mutantní kmen Bvg<sup>+</sup> přežíval lépe a kmeny s deletovaným *RisA* regulátorem naopak hůře než kontrolní kmen Tohama I. Rozdíly mezi kmeny byly signifikantní (Obr. 15B). Bvg<sup>+</sup> kmen byl zároveň testován na hemolýzu krve výsevy na kultivační BG misky s beraní krví, čímž došlo k potvrzení Bvg<sup>+</sup> fenotypu i po intracelulární lokalizaci bakterie.

**Obr. 15: Působení genů regulujících virulenci *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk a intracelulární přežívání *B. pertussis***



**Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod (Obr. 15A)** byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 6 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze triplicátu naměřených hodnot. Infekční dávka byla v tomto případě 1:20 a 1:40. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti  $p$  (graficky znázorněno pomocí hvězdiček, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ), při  $p \geq 0,05$  byl rozdíl nesignifikantní (ns) – v grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

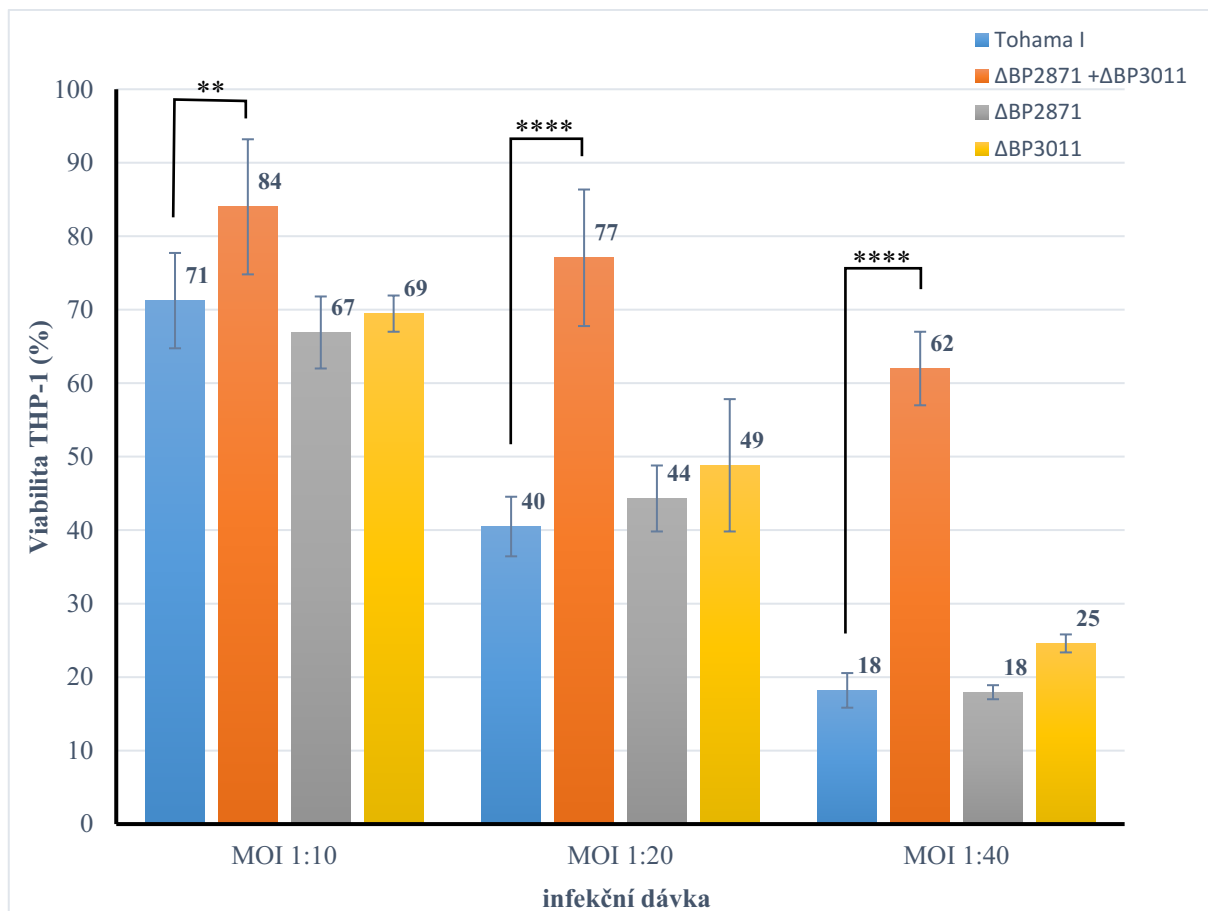
**Intracelulární přežívání *B. pertussis* (%) v makrofázích v T2 hod (Obr. 15B)** bylo stanoveno poměrem CFU v čase T2 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 5 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze tetraplikátu naměřených hodnot. Infekční dávka byla v tomto případě 1:20.

#### 5.4.3.2. Mutace v genech pro cystein dioxygenázu u *B. pertussis* ( $\Delta BP2871$ , $\Delta BP3011$ )

Transkriptomická analýza intracelulárně přežívajících bakterií *B. pertussis* ukázala významně zvýšenou expresi genů pro cystein dioxygenázu (*BP2871* a *BP3011*), proto bylo velmi zajímavé otestovat účinek těchto genů na přežívání bakterie v makrofázích či jejich viabilitu. Byly vytvořeny mutantní kmeny v těchto dvou genech, případně delece obou a jejich vliv testován na THP-1 buňkách.

Při použití MOI 1:10, resp. 1:20 či 1:40 dosahovala viabilita makrofágů pro kmen Tohama I 70 %, resp. 40 % či 18 %. Pokud byla infekce provedena s delečními kmeny pouze v jednom genu pro cystein dioxygenázu, byla viabilita makrofágů po infekci srovnatelná s infekcí referenčním kmenem. Signifikantně snížená cytotoxicita na THP-1 buňky byla pozorována pouze u dvojitého mutantního kmene a viabilita THP-1 buněk dosahovala 84 % pro MOI 1:10, 77 % pro MOI 1:20 a 62 % pro MOI 1:40. (Obr. 16).

**Obr. 16: Vliv mutace v genu pro cystein dioxygenázu *B. pertussis* na viabilitu THP-1 buněk**



Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 6 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze triplikátu naměřených hodnot. Infekční dávka byla v tomto případě 1:10, 1:20 a 1:40. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti  $p$  (graficky znázorněno pomocí hvězdiček, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ), při  $p \geq 0,05$  byl rozdíl nesignifikantní (ns) – v grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

Z výsledků vyplývá, že mutantní kmeny s delecí pouze v jednom z genů pro cystein dioxygenázu ( $\Delta BP2871$  či  $\Delta BP3011$ ) nevykazovaly signifikantní rozdíl v cytotoxicitě na makrofágy ve srovnání s kmenem Tohama I. Výrazně nižší míru cytotoxicity k THP-1 buňkám vykazoval pouze dvojitě mutantní kmen  $\Delta(BP2871 + BP3011)$  ve všech testovaných MOI.

#### 5.4.4. Vliv opsonizace a komplementu na přežívání *B. pertussis* v THP-1 buňkách

V následujících experimentech bylo snahou se přiblížit reálnému systému a otestovat vliv séra na bakterii *B. pertussis*, která bude použita při infekčních experimentech. V experimentech jsme se soustředili na testování referenčního kmene Tohama I a to jak v přítomnosti normálního séra, tak séra inaktivovaného teplem. Tímto způsobem bylo možné testovat nejen vliv komplementu, ale i vliv protilátek.

Testovalo se, jak lidské sérum od zdravých dárců (sérum z více dárců od firmy Sigma), tak sérum NIBSC, kde je přesně definované množství protilátek proti *B. pertussis*.

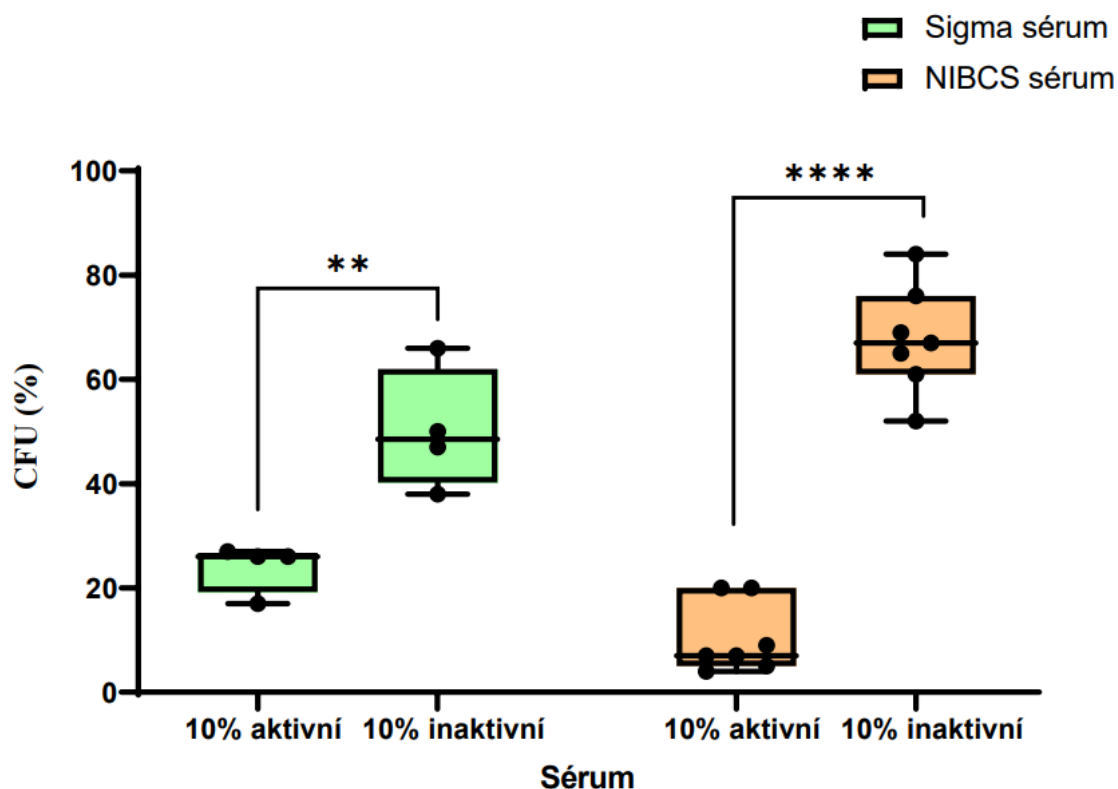
##### 5.4.4.1. Testování vlivu séra na životaschopnost *B. pertussis*

Před vlastními infekčními experimenty spojenými s THP-1 buňkami jsme chtěli otestovat samotný vliv séra na životaschopnost bakterie (CFU). Testovala se 30 min inkubace s lidským sérem od firmy Sigma a NIBSC sérem. Kontrolou nám byla kultivace *B. pertussis* v RPMI médiu s FCS sérem. Byl sledován vliv jak aktivního, tak inaktivovaného séra (inaktivace komplementu).

Srovnání proběhlo na referenčním kmenu *B. pertussis* Tohama I. Z výsledků vyplývá, že signifikantní rozdíl je mezi sérem aktivním a inaktivovaným, a to u obou sledovaných sér. Samotný vliv komplementu má za následek masivní snížení životaschopnosti bakterie. U aktivního séra od firmy Sigma došlo k poklesu na 25 %, vzhledem ke kontrole, a na 5 % u NIBCS séra. U inaktivovaných sér bylo přežívání podstatně vyšší a to 45 % u Sigma séra a 60 % u NIBCS a bez signifikantního rozdílu (Obr. 17).

Výsledky naznačují významné zapojení komplementu při likvidaci patogena v prostředí a získaná data byla využita při nastavení parametrů infekčního experimentu, resp. stanovení vhodné počáteční MOI.

Obr. 17: Vliv působení 10 % séra na životaschopnost *B. pertussis* Tohama I



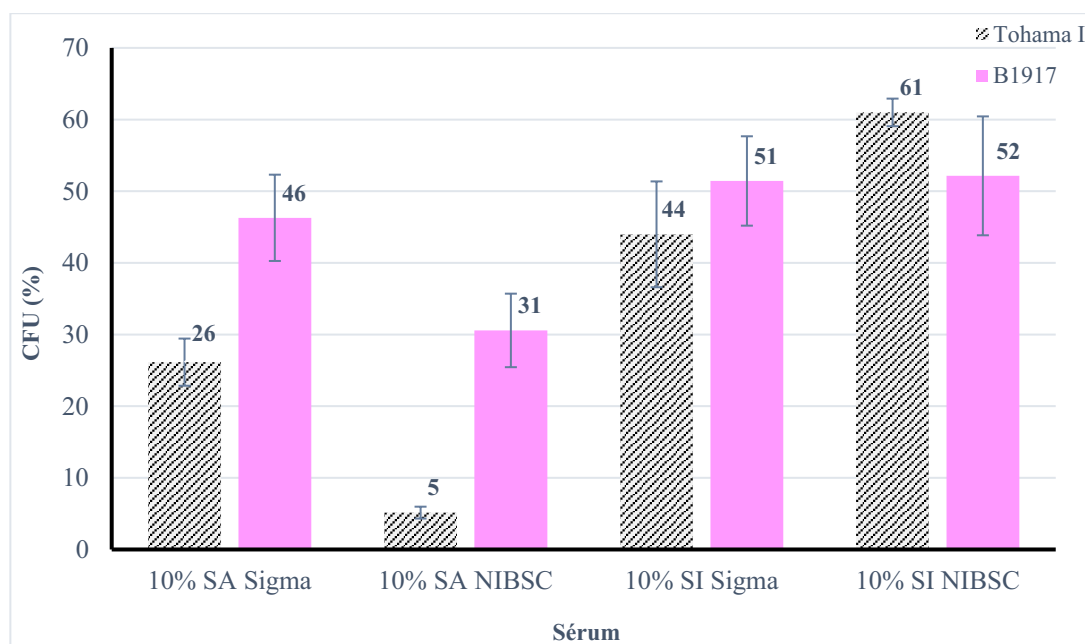
Vliv působení 10 % séra na životaschopnost *B. pertussis* byl stanoven poměrem CFU *B. pertussis* inkubovaných se sérem k bakteriím inkubovaným bez lidského séra. *B. pertussis* byla inkubována s lidským sérem od společnosti Sigma a se sérem NIBSC s garantovaným množstvím specifických protilátek. Získané hodnoty jsou mediánem z minimálně 4 až 7 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází z technického tetraplikátu hodnot. Statistické rozdíly byly stanoveny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti p (graficky znázorněno pomocí hvězdiček; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001, při p ≥ 0,05 byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

Vliv séra jsme netestovali pouze na referenčním kmeni Tohama I, ale i divokém kmeni *B. pertussis*. Pro ověření jsme si vybrali kmen B1917, který byl izolovaný až v roce 2000 a není tolik zatížen dlouhodobým pasážováním v laboratořích.

Působení 10 % aktivního Sigma séra na *B. pertussis* Tohama I vedlo k výraznému poklesu počtu životaschopných bakterií na 25 % vzhledem ke kontrole, u kmene B1917 byl pokles pouze na 45 % vzhledem ke kontrole. Podobný trend s výraznějšími rozdíly mezi kmeny byl pozorován i vlivem 10 % aktivního NIBSC séra. Po inkubaci *B. pertussis* s inaktivovaným sérem klesl počet bakterií u obou testovaných kmenů o přibližně 50 % - shodné pro obě použítá séra (Obr. 18).

Celkově výsledky ukazují, že kmen *B. pertussis* B1917 je odolnější proti působení aktivního séra než kmen Tohama I.

**Obr. 18: Vliv působení 10 % séra na životaschopnost *B. pertussis* Tohama I a B1917**



Vliv séra *B. pertussis* Tohama I (data shodná s Obr. 17) a B1917. Vliv 10 % aktivního séra (SA) a inaktivního séra (SI) na životaschopnost bakterií Tohama I a B1917. Hodnoty vycházejí z poměru CFU *B. pertussis* inkubovaných se sérem k bakteriím inkubovaným bez séra. *B. pertussis* byla inkubována s lidským sérem od společnosti Sigma a se sérem NIBSC s garantovaným množstvím specifických protilátek. Získané hodnoty jsou mediánem ze 3 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází z technického tetraplikátu hodnot.

#### 5.4.4.2. Vliv opsonizace bakterií na míru přežívání v makrofázích THP-1 a jejich cytotoxický účinek na hostitele

Po testovacích experimentech s bakteriemi ovlivněnými sérem, byly tyto opsonizované *B. pertussis* Tohama I použity pro infekční experimenty. Sledoval se vliv opsonizace na cytotoxický účinek bakterií na THP-1 buňky a míru intracelulárního přežívání bakterií v makrofázích.

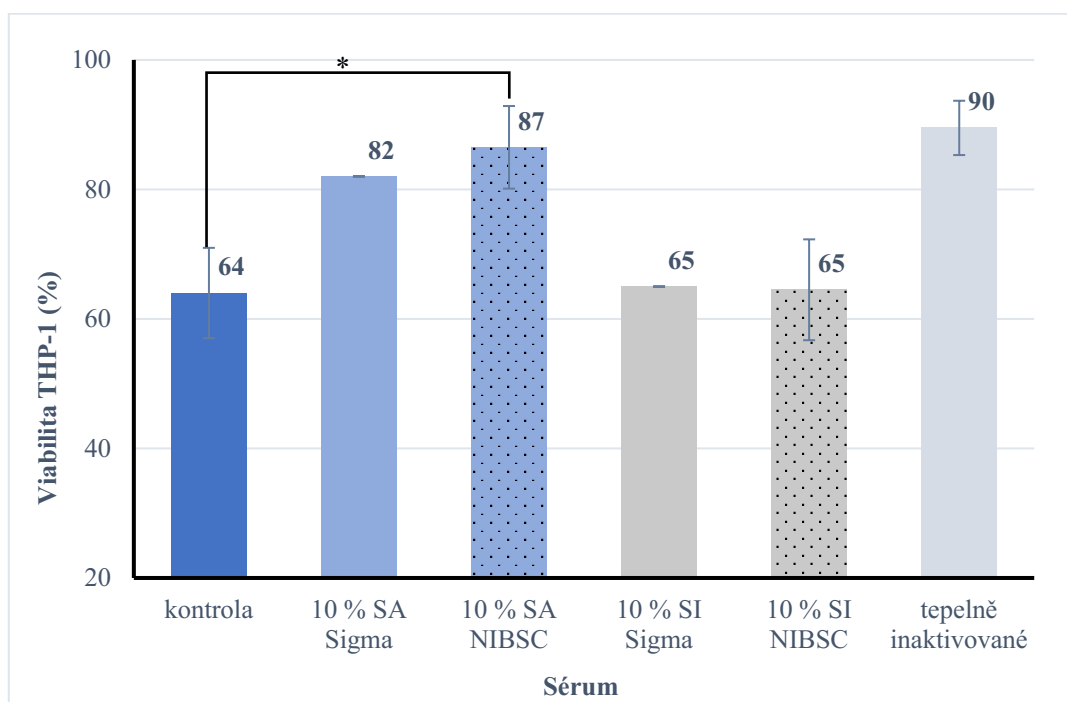
Nejprve se testoval vliv séra při infekční dávce MOI 1:10. Vlivem působení séra došlo k výraznému úbytku bakterií ve vzorku, což bylo patrné už z předcházejících experimentů. Následně bylo těžké odlišit míru vlivu opsonizovaných bakterií na makrofágy, protože se lišila počáteční infekční MOI (testování pomocí výsevu inokulační kultury – kap. 5.4.4.1.). Po opsonizaci inaktivovaným sérem byla počáteční infekční dávka snížena o cca 50 % u obou typů sér. Po opsonizaci aktivním Sigma sérem byla počáteční MOI zhruba 4 x nižší a po opsonizaci aktivním NIBSC sérem dokonce 20 x nižší než u kontrolního vzorku.

Výsledky ukázaly, že v kontrolních podmínkách (kultivace bakterie v médiu bez lidského séra) se pohybovala viabilita THP-1 buněk v T2 hod po infekci kolem 64 %. Po působení obou



typů inaktivovaných sér byla míra viability THP-1 buněk podobná kontrole. Naopak u bakterií vystavených aktivnímu lidskému séru (Sigma i NIBSC) se cytotoxicita na THP-1 buňky snížila a viabilita dosahovala mezi 80 – 90 %. Kolem 90 % se pohybovala i míra viability hostitelských buněk infikovaných mrtvými, tepelně inaktivovanými, bakteriemi. (Obr. 19).

**Obr. 19: Vliv inkubace *B. pertussis* s 10 % sérem na viabilitu THP-1 buněk při MOI 1:10**



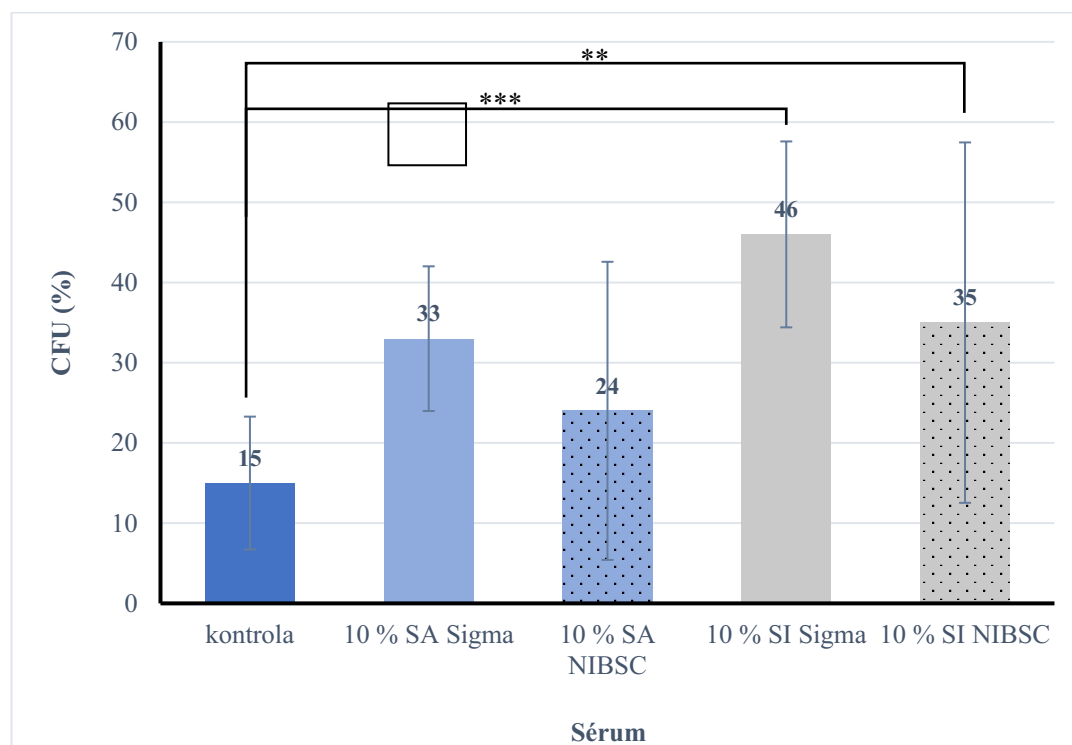
**Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod** byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem z min 2 až 4 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze triplicátu naměřených hodnot. Teoretická infekční dávka byla v tomto případě 1:10. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti p (graficky znázorněno pomocí hvězdiček, \*\* p < 0,01, při p ≥ 0,05 byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

Získané výsledky cytotoxického působení *B. pertussis* byly statisticky hodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) a ukázalo se, že díky velkým rozdílům mezi jednotlivými biologickými replikáty je signifikantní změna pouze u aktivních sér. Tedy pokud nedochází k inaktivaci komplementu a významně se sníží infekční dávka ještě před vlastní infekcí. U séra NIBCS je rozdíl výrazný, u séra od firmy Sigma je hladina p vyšší (0,1034), protože byl menší počet biologických replikátů.

Nicméně z námi získaných výsledků nemůžeme s jistotou určit, zda je pozorovaný rozdíl způsoben působením séra či i rozdílnou počáteční MOI.

Současně se testoval i vliv opsonizace *B. pertussis* na intracelulární přežívání pomocí výsevů bakterií v T2 hodině infekce na kultivační plotny (Obr. 20). Výsledky z experimentů jsou pravděpodobně opět zatíženy chybou – rozdílnou počáteční MOI, jelikož při nižší počáteční infekční dávce bakterie lépe přežívají uvnitř makrofágů.

**Obr. 20: Vliv inkubace *B. pertussis* Tohama I s 10 % sérem na intracelulární přežívání v makrofázích při MOI 1:10**



**Intracelulární přežívání *B. pertussis* v makrofázích v T2 hod** bylo stanoveno poměrem CFU v čase T2 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem z min 3 až 4 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze tetraplikátu naměřených hodnot. Teoretická infekční dávka byla v tomto případě 1:10. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti p (graficky znázorněno pomocí hvězdiček \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001, při p ≥ 0,05 byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

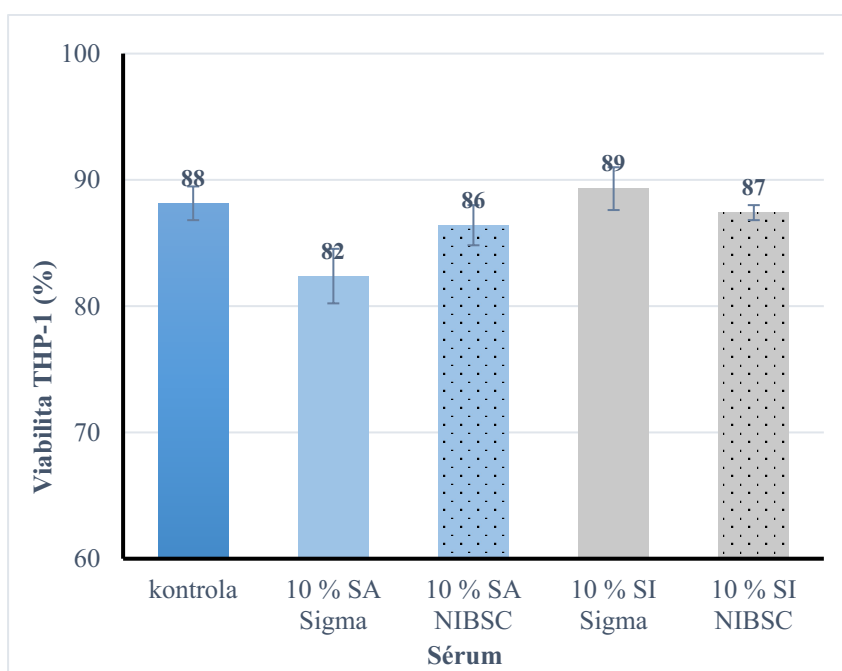
Výsledky ukazují, že 2 hod po infekci klesl počet intracelulárních *B. pertussis* inkubovaných bez lidského séra na cca 15 %. Inkubací s aktivními séry se počet intracelulárních *B. pertussis* pohyboval mezi 24 % až 33 % s velkými směrodatnými odchylkami. Po inkubaci s inaktivovanými séry signifikantně vzrostl počet intracelulárních bakterií – na cca 46 % po inkubaci se Sigma sérem a 35 % po inkubaci s NIBSC sérem (Obr.20).

Testoval se také vliv 20 % séra od firmy Sigma na viabilitu THP-1 buněk i míru intracelulárního přežívání. V obou případech vykazoval srovnatelné výsledky, které byly pozorované u 10 % séra (data nejsou publikována).

Z důvodu rozdílné počáteční MOI jsme se v navazujícím experimentu snažili vyrovnat rozdíly mezi různou počáteční dávkou bakterií. Pro lepší dorovnání rozdílu jsme zvolili MOI 1:1. Upravili jsme počáteční infekční dávku po opsonizaci následujícím způsobem. Bakterie inkubované s aktivním sérem od firmy Sigma jsme oproti kontrole navýšili 4 x před začátkem infekčního experimentu, aktivním NIBSC sérem 10 x a oběma typy inaktivovaných sér 2 x.

Následně jsme testovali působení séra na viabilitu THP-1 buněk (Obr. 21) a intracelulární přežívání *B. pertussis* (Obr. 22) při počáteční infekční dávce 1:1, která se opět více blíží reálné situaci.

**Obr. 21: Vliv inkubace *B. pertussis* Tohama I s 10 % sérem na viabilitu THP-1 při MOI 1:1**



**Viabilita infikovaných THP-1 makrofágů v T2 hod** byla měřena pomocí WST-1 kitu při 450 nm. Doba inkubace s reagentem byla 40 min. Získané hodnoty jsou mediánem z 2 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze triplicátu naměřených hodnot. Teoretická infekční dávka byla v tomto případě 1:1. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti  $p < 0,05$ . Nebyly zde zaznamenány žádné signifikantní změny – nesignifikantní změny nejsou v grafu vyznačeny.

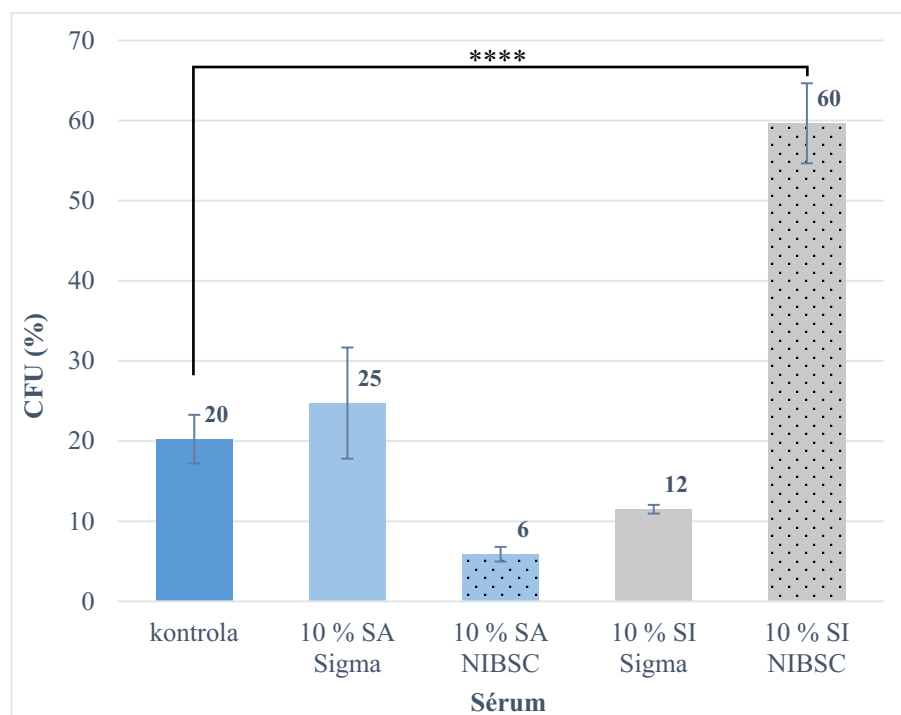
Výsledky ukázaly, že viabilita THP-1 makrofágů 2 hod po infekci se pohybovala v rozmezí 80 – 90 % bez signifikantních rozdílů mezi kontrolou a opsonizovanými vzorky. (Obr. 21).

Tedy vyrovnané množství bakterií při infekci nevedlo ke změnám v cytotoxicitě na THP-1 buňky. Podařilo se nám tak dosáhnout vyrovnaného počtu makrofágů, ze kterých jsme stanovili množství intracelulárních bakterií.

Výsledky CFU ukázaly signifikantní rozdíl pouze mezi kontrolními podmínkami a inaktivovaným NIBCS sérem, kde 60 % bakterií v T2 hodině v makrofázích přežilo oproti kontrole, kde to bylo 20 %. V dalších podmínkách bylo přežívání podstatně nižší a blížilo se buď kontrole – aktivní sérum Sigma (25 %), nebo méně než v kontrole, jako u aktivního NIBCS séra (6 % s  $pV = 0,103$ ) či 12 % u inaktivovaného Sigma séra.

I přes některé nedostatky, např. tento experiment byl pilotní a dělali se pouze technické replikáty, se ukázal pozitivní vliv protilátek na efektivitu fagocytózy (NIBCS, SI). Některé nepřesnosti mohly být nicméně dány i teoretickými výpočty reálné infekční dávky, která se pohybovala u kontroly a inaktivovaných sér místo MOI 1:1, tak byla 1:1,5, či u aktivního séra od firmy Sigma byla MOI 1:2 (tedy 2 x tolik) a naopak u aktivního NIBCS séra bylo počáteční MOI 1:1.

**Obr. 22: Vliv inkubace *B. pertussis* Tohama I s 10 % sérem na intracelulární přežívání *B. pertussis* při MOI 1:1**



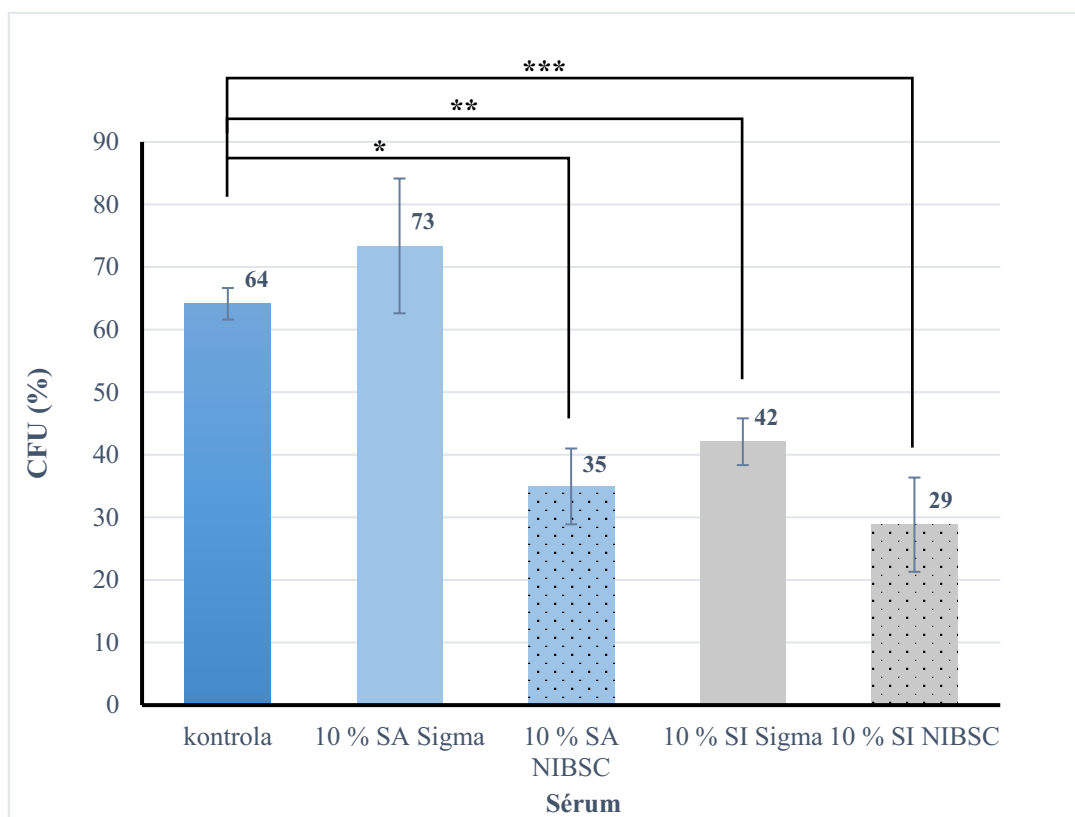
**Intracelulární přežívání *B. pertussis* v makrofázích v T2 hod** bylo stanoveno poměrem CFU v čase T2 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem ze 4 technických replikátů. Teoretická infekční dávka byla v tomto případě 1:1. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti  $p$  (graficky znázorněno pomocí hvězdiček; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , při  $p \geq 0,05$  byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

#### 5.4.4.2. Vliv opsonizace bakterií na efektivitu fagocytózy THP-1 buněk

Jak už předchozí experimenty naznačovaly, vliv séra nemusí být pouze přímý, působení na životaschopnost bakterií (resp. počáteční MOI), ale i nepřímý, kdy např. dojde k zefektivnění fagocytózy hostitelských buněk. Dřívější studie ukázaly, že přítomností specifických protilátek proti černému kašli dochází ke zvýšení fagocytózy opsonizovaných bakterií (Gorgojo *et al.* 2014), proto jsme se na vliv opsonizace na množství extracelulárních bakterií v médiu také soustředili.

Vliv inkubace se sérem se nejprve testoval při teoretické počáteční infekční dávce 1:10 (Obr. 23).

**Obr. 23: Vliv inkubace *B. pertussis* Tohama I s 10 % sérem na počet extracelulárních *B. pertussis* při MOI 1:10**



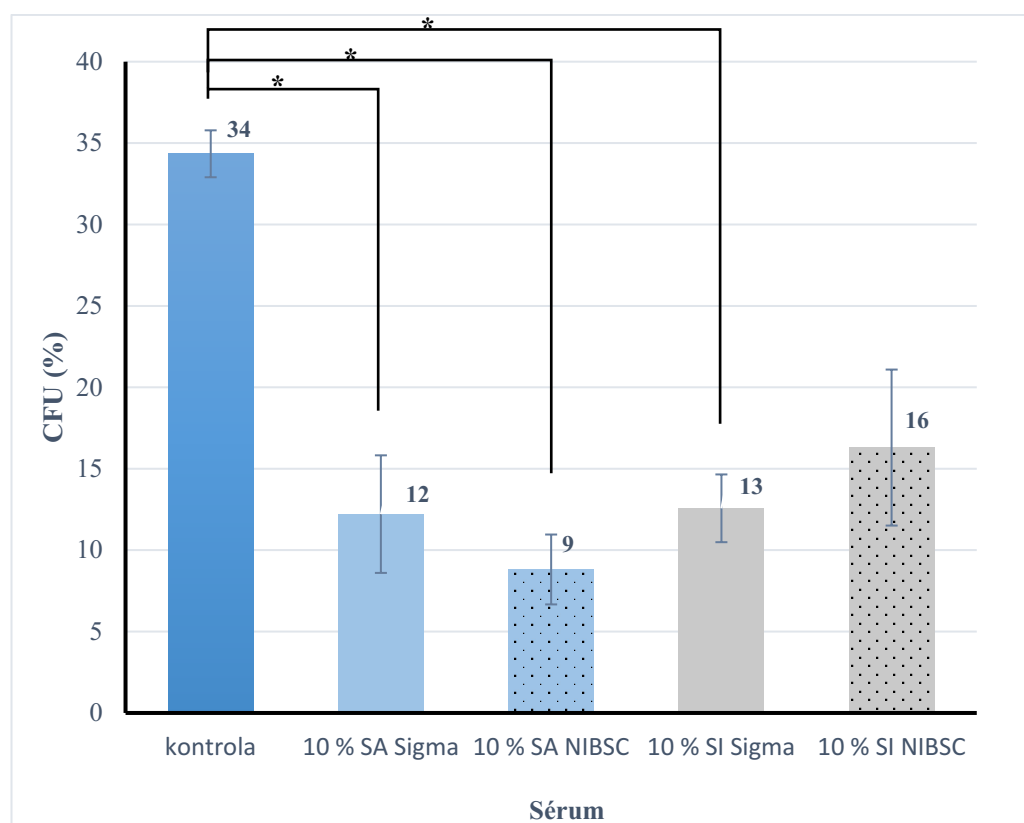
**Počet extracelulární bakterií *B. pertussis* v médiu v T1 hod** byl stanoven poměrem CFU v čase T1 hod k počáteční infekční dávce inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem ze 3 technických replikátů. Infekční dávka byla v tomto případě 1:10. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti p (graficky znázorněno pomocí hvězdiček, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001), při p ≥ 0,05 byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

Výsledky ukázaly, že v T1 h po infekci klesl počet extracelulárních bakterií *B. pertussis* kultivovaných bez lidského séra na 64 %. Po opsonizaci aktivním Sigma sérem mírně vzrostla viabilita THP-1 na cca 70 % při porovnání s kontrolním vzorkem, zde však nebyl signifikantní rozdíl. Naopak po inkubaci *B. pertussis* s aktivním NIBSC sérem a oběma typy inaktivovaných sér došlo k signifikantnímu poklesu extracelulárních bakterií na 30 – 40 % (Obr. 23).

Následně jsme zkoumali vliv 10 % séra (po vyrovnání počáteční infekční dávky) při teoretické MOI 1:1 (Obr. 24).

V kontrolních podmínkách došlo k poklesu počtu extracelulárních bakterií 1 hod po infekci na 34 %. Po opsonizaci *B. pertussis* s aktivními séry a inaktivovaným Sigma sérem signifikantně klesl počet extracelulárních bakterií na 9 – 13 %. Po inkubaci *B. pertussis* s inaktivovaným NIBSC sérem klesl počet bakterií na 16 %, rozdíl však nebyl signifikantní z důvodu vysoké pV = 0,1822 (Obr. 24).

**Obr. 24: Vliv inkubace *B. pertussis* Tohama I s 10 % sérem na počet extracelulárních *B. pertussis* při MOI 1:1**



Počet extracelulární bakterií *B. pertussis* v médiu v T1 hod byl stanoven poměrem CFU v čase T1 hod k inokulu. Získané hodnoty jsou mediánem ze 2 biologických replikátů. Každý biologický replikát vychází ze tetraplikátu naměřených hodnot. Teoretická infekční dávka byla v tomto případě 1:1. Statistické rozdíly byly provedeny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) – hladina statistické významnosti p (graficky znázorněno pomocí hvězdiček, \* p < 0,1, při p ≥ 0,1 byl rozdíl nesignifikantní (ns)). V grafu vyznačeny pouze signifikantní změny.

Výsledky u obou testovaných MOI naznačují vliv lidského séra na zvýšenou efektivitu fagocytózy bakterií makrofágy, resp. snížený počet extracelulárních bakterií v T1 hod po infekci.

## 6. Diskuze

*B. pertussis* je striktně lidský patogen, který osidluje řasinkový epitel horních dýchacích cest a způsobuje onemocnění zvané černý kašel. Tato bakterie je epidemickým klonem, který se před méně než 100 000 lety vyvinul z bakterie *B. bronchiseptica*, která má svůj životní cyklus spojený s intracelulárním přežíváním uvnitř parazitických améb (Dewan a Harvill, 2019). *B. pertussis* byla dlouhou dobu považována za extracelulárního patogena. Později se zjistilo, že i tato bakterie je schopná dlouhodobě přežít v časných endozomech hostitelských buněk včetně profesionálních fagocytů (Crawford a Fishel 1959; Friedman *et al.* 1992; Lamberti *et al.* 2010). Tato životní fáze *B. pertussis* by mohla přispívat k úniku bakterií před imunitním systémem hostitele a k rozvoji infekce (Rivera *et al.* 2020).

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na studium průběhu intracelulárního přežívání *B. pertussis* v THP-1 buňkách, a mohla by přispět k využití infekčního modelu při studiu genů odpovědných při intracelulárním přežívání *B. pertussis* a k rozšíření znalostí, jak tato interakce mezi hostitelem a patogenem probíhá.

Prvním z cílů práce bylo optimalizovat infekční model na lidské monocytární buněčné linii THP-1 pro sledování cytotoxických účinků bakterie na makrofágy a současně i pro studium míry intracelulárního přežívání bakterie v hostitelské buňce.

Infekční experiment byl nastaven tak, že k makrofágům diferencovaným pomocí chemického stimulu PMA byly přidány bakterie *B. pertussis* po dobu 1 hodiny. V publikacích se doba infekce pohybuje v rozmezí od 20 minut (Valdez *et al.* 2016; Lamberti *et al.* 2010) do 2 hodin (Fedele *et al.* 2005; Lamberti *et al.* 2016). V našem případě jsme testovali i kratší časový úsek (30 min), kde ale účinnost infekce byla snížena. Proto jsme při standardních experimentech zvolili jednohodinovou inkubaci s bakteriemi a následně THP-1 buňky ošetřili antibiotikem polymyxinem B, které spolehlivě usmrtí extracelulárně se vyskytující bakterie (data nejsou prezentována). Polymyxin B se hojně využívá v infekčních experimentech k usmrcení extracelulárních bakterií (Fedele *et al.* 2005; Lamberti *et al.* 2016; Valdez *et al.* 2016; Lamberti *et al.* 2010). Vhodnou alternativou je i gentamicin (Rivera *et al.* 2019; Gestal *et al.* 2019), které se nám při pilotním pokusu zdálo méně účinné (data nejsou prezentována).

V našich experimentech v tomto uspořádání při MOI 1:10 bylo fagocytováno 50 % bakterií, což je v souladu s pozorováním Gorgojo *et al.* (2014) na *B. parapertussis*, kteří pozorovali fagocytózu u cca 59 % bakterií při MOI 1:30 pomocí fluorescenční mikroskopie. Dalším a velmi důležitým parametrem infekce bylo přežívání, tj. množství bakterií, které po fagocytóze v makrofázích přežívá. Autoři Lamberti a kol. (2010) publikovali, že při infekční dávce MOI



1:50 je 70 % fagocytovaných bakterií zabito v kyselých kompartmentech makrofágů do 2 hodin po infekci. Zbýlých 30 % bakterií zůstává lokalizovaných v časných endozomech makrofágů, ve kterých jsou bakterie schopné se i replikovat. V našich experimentech se ukázalo, že v THP-1 makrofázích 2 hodiny po infekci při počátečním MOI 1:10 a vyšším přežívá pouze 10 % bakterií a 1 % původního počtu po 24 hodinách po infekci. Také oproti pozorování argentinské skupiny (Lamberti *et al.* 2010; Lamberti *et al.* 2016; Valdez *et al.* 2016), jsme nepozorovali zvyšování počtu intracelulárních bakterií v pozdějších hodinách infekce (data nejsou publikována). Tento rozdíl v přežívání a schopnosti další replikace bakterií by mohl být způsoben odlišnými kmeny či drobnými odlišnostmi v průběhu infekčního experimentu. Argentinská skupina používala kmen B213 (variantu kmene Tohama I rezistentní ke streptomycinu), v mé práci byl používán standardní laboratorní kmen Tohama I.

V této práci jsme se zaměřili na časovou fázi infekce, s důrazem na časový úsek 2 hodiny po infekci, kdy už byly pozorovány velké změny v cytotoxickém působení *B. pertussis* na THP-1 buňky. Zároveň byl tento časový bod vybrán z důvodu plně diferencovaného stavu THP-1 buněk Stimulace diferenciací pomocí chemické látky PMA je pouze krátkodobé (v rádech dnů), následně dochází postupně dediferenciaci buněk spojené se změnami v adhezenci k povrchu (Lund *et al.* 2016). Pro dlouhodobější studie simulující přirozenější stav by byly výhodnější primární makrofágy z lidských dárců, které vydrží v diferencovaném stavu podstatně déle a byly v nich detekovány intracelulární bakterie i 14 dní po infekci (Novák *et al.* 2020), nicméně mají zase jiné nedostatky jako reprodukovatelnost či množství buněk získané z jednotlivých dárců.

Po intracelulární lokalizaci se *B. pertussis* aktivně přizpůsobuje cizímu, stresujícímu, prostředí v hostitelských buňkách. K lepšímu porozumění intracelulárního přežívání *B. pertussis* byly provedeny v naší laboratoři transkriptomické studie intracelulárně lokalizovaných bakterií, které odhalily velké množství modulovaných genů, mezi které patří např. geny pro biosyntézu a metabolismus aminokyselin, metabolismu síry, komponenty dýchacího řetězce, faktory virulence, transportu, regulace transkripce či opravě DNA (Lamberti *et al.* 2016; Petráčková *et al.* 2020; Farman *et al.* 2022).

V prvních fázích práce jsme se zaměřili na fyziologický stav bakterie a jeho vliv na průběh infekčního experimentu. Při infekčních experimentech jsme vycházeli z bakteriální kultury, která dosahovala v ranních hodinách hodnot O.D. kolem 1,0. Ukázalo se, že při vyšších ranních hodnotách O.D. nočního inokula (např. O.D. = 2,0) se snižuje cytotoxicita vůči THP-1 buňkám, což může být způsobeno vyšším počtem mrtvých buněk v suspenzi a s následným ztíženým srovnáním jednotlivých infekčních experimentů. Navíc při O.D. = 1, kdy se bakterie nachází se

střední exponenciální fázi, jsou více cytotoxické k THP-1 buňkám a lépe se pak projeví rozdíly v cytotoxicitě mezi různými kmeny *B. pertussis*.

Při studiu cytotoxického působení mutantních kmenů *B. pertussis* na THP-1 buňky byly použity především vyšší počáteční infekční dávky (MOI 20 či MOI 40), kdy je kontrolní kmen Tohama I více cytotoxický k makrofágům a opět se mohou lépe projevit rozdíly mezi studovanými kmeny.

V první etapě této práci jsme se zaměřili na míru intracelulárního přežívání bakterie a současně cytotoxický efekt u mutantního kmene *B. pertussis*, který má ovlivněné *bvg* geny a trvale se vyskytuje v Bvg<sup>+</sup> fázi. Blízce příbuzná *B. bronchiseptica* se v Bvg<sup>+</sup> fázi vyskytuje např. v teplokrevném hostiteli, naproti tomu při intracelulární lokalizaci v parazitických amébách se vyskytuje v Bvg<sup>-</sup> fázi (Taylor-Mulneix *et al.* 2017). Přejít *B. bronchiseptica* do Bvg<sup>-</sup> fáze byl pozorován i v dendritických buňkách myši (Guzman *et al.* 1994). Nedávné studie naznačují přechod do Bvg<sup>-</sup> fáze během intracelulární lokalizace bakterie také u *B. pertussis* (Petráčková *et al.* 2020; Rivera *et al.* 2020).

Studovala jsem vliv kmene alokovaného v Bvg<sup>+</sup> fázi na míru cytotoxicity na THP-1 buněk a míru intracelulární přežívání bakterií. Náš předpoklad, že tento kmen bude více cytotoxický k makrofágům, což bylo pozorováno u *B. bronchiseptica* (Brockmeier a Register, 2000), se nepotvrdil. Naopak kmen Bvg<sup>+</sup> působil 2 x méně cytotoxicky na THP-1 buňky při MOI 1:40. Ukazuje se, že v intracelulárním adaptomu *B. pertussis* jsou zapojeny obě sady genů, jak z Bvg<sup>-</sup> tak Bvg<sup>+</sup> fáze (Farman *et al.* 2022). Jelikož se jedná o velmi komplexní systém, skládající se z fáze přichycení a fagocytózy do buňky, ale také fáze přežívání v buňkách makrofága, mohla by mít alokace pouze v jedné fázi vliv na sníženou toxicitu bakterie. Případně zde mohou být aktivovány další regulační dráhy, které mohou vést k útlumu produkce některých faktorů virulence. Zároveň kmen Bvg<sup>+</sup> signifikantně lépe přežíval v THP-1 buňkách 2 hodiny po infekci. Lepší přežívání v makrofázích by mohlo být způsobeno právě jeho nižší cytotoxicitou k THP-1 buňkám, jelikož získáme více bakterií z více makrofágů. Po korekci na stejný počet makrofágů po 2 hodinách infekce přežívalo u kontrolního kmene 16 % bakterií a u kmene Bvg<sup>+</sup> 24 %, rozdíl se nám snížil z 13 % na 8 % po korekci.

Dalším mutantním kmenem ovlivňujícím virulenci bakterie, který byl v této diplomové práci studován, byl kmen s delecí v genu *risA*. Protein RisA je regulátorem dvoukomponentového systému RisAK. Tento systém je důležitý pro produkci *vrg* genů v Bvg<sup>-</sup> fázi, jelikož naším předpokladem bylo, že *B. pertussis* se v této fázi nachází během intracelulárního přežívání, zkoumali jsme vliv i této mutace. Během noční kultivace v SS médiu měl tento kmen jinou fyziologii růstu než kontrolní kmen. Standardně jsme očekávali, že kmen při O.D. = 1 obsahuje

$2 \times 10^9$  bakterií. U kmene *ΔrisA* jsme však nezískali při dané O.D. daný počet bakterií a výsledná kalkulovaná počáteční MOI byla pak jiná. Výsledná infekční dávka byla v tomto případě o polovinu nižší. Usuzovali jsme, že životaschopnost bakterií je o polovinu nižší. Z tohoto důvodu jsme navíc zkoušeli dvojnásobné počáteční MOI. Při stejné kalkulované počáteční MOI, ale 2 x nižší skutečné infekční dávce, byl kmen *ΔrisA* stejně cytotoxický k THP-1 buňkám jako kontrola. Při dvojnásobném počátečním MOI byl kmen *ΔrisA* více cytotoxický k THP-1 buňkám (viabilita pouze 16 %). Tento rozdíl v cytotoxicitě mohl být částečně způsobený také velkým množstvím mrtvých bakterií ve vzorku, které působí na THP-1 buňky cytotoxicky, převážně přítomností LPS na bakteriálním povrchu (Starr *et al.* 2018). Z důvodu jiné fyziologie růstu kmene *ΔrisA* nelze jednoznačně hodnotit, zda tato mutace skutečně vedla ke snížení cytotoxicity kmene a jak velké. Kmen *ΔrisA* také hůře přežíval v THP-1 buňkách, což ukazuje na důležitost funkčního RisAK systému během intracelulárního přežívání *B. pertussis*. Význam dvoukomponentového systému RisAK při přežívání se ukazuje i v literatuře. Studoval se u *B. bronchiseptica*, kde se zjistilo, že zpomaluje acidifikaci endozomů a je zásadní pro intracelulární přežívání *B. bronchiseptica* v hostitelských buňkách (Zimna *et al.* 2001; Jungnitz *et al.* 1998), což je v souladu s naším pozorováním. Nicméně snížené přežívání *ΔrisA* kmene by mohlo být opět částečně způsobené i sníženou životaschopností bakterií spojenou s touto delecí.

Kromě studia regulačních genů pro virulenci jsme se zaměřili i na geny pro cystein dioxygenázu, které byly u *B. pertussis* v transkriptomické analýze objeveny a, jejichž exprese byla v průběhu intracelulárního přežívání signifikantně zvýšena. Prvním z nich je gen *BP2871* ( $\log_2FC = 7$ ) a druhým gen *BP3011*, jehož exprese byla jen mírně zvýšena ( $\log_2FC = 2$ ), jak ve své studii uvádí Farman (Farman *et al.* 2022). Cystein dioxygenáza hraje důležitou roli v regulaci cysteinu, esenciální aminokyseliny, potřebné k celé řadě buněčných procesů. Cystein však obsahuje vysoce reaktivní thiolovou skupinu, která je při zvýšené hladině cysteinu v buňce toxická (Park a Imlay 2003). Domníváme se, že intracelulární prostředí makrofága je velmi bohaté na cystein, který se rychle dostává do bakteriální buňky. Bakterie se tedy snaží eliminovat cystein zvýšenou expresí genu/ů pro efluxní pumpy pro cystein, či zvýšenou expresí genů pro cystein dioxygenázu, která přeměňuje toxický cystein na pyruvát. Cílená delece pouze jednoho genu pro cystein dioxygenázu, a to jak genu *BP2871*, tak genu *BP3011* nevedla ke snížení cytotoxicity kmene na THP-1 buňky. Teprve až mutace obou genů pro cystein dioxygenázu současně vedla k výraznému snížení cytotoxického působení *B. pertussis* na THP-1 buňky, a to až o 3,4 x při MOI 1:40, u kterého byly rozdíly mezi kmeny nejvyšší. Z těchto pozorování můžeme usuzovat, že homeostáza cysteinu je pro adaptaci na intracelulární

přežívání velmi důležitá a proto jištěna, že i při výpadku jednoho z genů pro cystein dioxygenázu, může být jeho funkce částečně nahrazena i dalším genem.

Posledním cílem mé diplomové práce bylo sledování vlivu protilátek a komplementu na interakci *B. pertussis* s THP-1 buňkami. Složky séra mají zásadní vliv na eliminaci bakterie z hostitele, ovlivňují přichycení a fagocytózu modulací funkcí vybraných faktorů virulence (Hazenbos *et al.* 1994), proto studium vlivu séra na přežívání *B. pertussis* po opsonizaci bylo důležitou částí této práce.

Zajímalo nás, jak na interakci *B. pertussis* působí jednotlivé složky séra. Zkoumali jsme vliv jak aktivního séra obsahujícího komplement a specifické protilátky proti *B. pertussis*, tak i tepelně inaktivovaného séra, kde je vliv komplementu eliminován. Opsonizační experimenty jsme se snažili optimalizovat na naše podmínky, aby došlo k aktivaci pouze specifických drah a nikoliv eliminaci bakterií před vlastním pokusem. Vycházeli jsme z dostupných zdrojů (Fernandez a Weiss 1994; Stafanelli *et al.* 2001) a předcházejících studií prováděných na našem pracovišti (Štipl 2020) a zvolili jsme vyšší počáteční dávky bakterií ( $10^8$  bakterií na 1 ml) inkubovaných se sérem 30 min a následně 10 x ředění médiem před vlastní infekcí, aby přítomné sérum nemělo už podstatný vliv na infekci.

V infekčních experimentech jsme testovali vliv lidského séra od zdravých dárců (sérum z více dárců od firmy Sigma) a séra NIBSC s přesně definovaným množstvím protilátek proti *B. pertussis* (335 IU IgG a 65 IU IgA anti-PT, 130 IU IgG a 65 IU IgA anti – FHA).

V počátečních experimentech jsme studovali samotný vliv séra na životaschopnost *B. pertussis* (CFU). Z výsledků vyplynulo, že po opsonizaci *B. pertussis* 10 % inaktivovaným sérem klesne počet bakterií zhruba na polovinu. Po opsonizaci s aktivním sérem klesne počet bakterií podstatněji na cca 5 – 25 % původního počtu. Obecně k většímu poklesu dochází u NIBSC séra, zřejmě, z důvodu vyššího množství specifických protilátek, které jsou důležité pro aktivaci klasické cesty komplementu (Dunkelberger a Song 2010). V této části experimentu jsme prokázali signifikantní rozdíl v cytotoxicitě mezi aktivním a inaktivovaným sérem bez ohledu na typ použitého séra.

Vliv séra na životaschopnost bakterií jsme testovali nejen na referenčním kmeni Tohama I, ale i na kmeni B1917 a ukázalo se, že kmen B1917 je odolnější proti působení aktivního séra než kontrolní kmen. Působení obou typů inaktivovaných sér na životaschopnost bakterií bylo srovnatelné u obou hodnocených kmenů. Tyto výsledky naznačily, že kmen Tohama I se pravděpodobně po dlouhodobé pasáži v laboratořích již liší od kmenů *B. pertussis* vyskytujících se volně v přírodě. Z tohoto důvodu se zdá být do budoucna kmen B1917 vhodnějším

referenčním kmenem podobným současným klinickým izolátům, které jsou přibližně 4 x odolnější vůči séru než kmen Tohama I (Bart *et al.* 2014; Štipl 2020).

Následující experimenty již byly zaměřeny na vliv séra na *B. pertussis* při interakci s THP-1 makrofágy a na intracelulární přežívání bakterií. Tento systém byl o poznání komplikovanější. Navíc v počátcích byly experimenty zatížené chybou spojenou s nerovnoměrným MOI na počátku experimentu. Při standardních infekčních experimentech byla počáteční infekční dávka jasně definovaná. Při opsonizačních experimentech byl ale původní počet bakterií v médiu redukován vlivem použitého séra a do vlastního infekčního pokusu šlo různé množství bakterií dle typu použitého séra. Tento fakt pak měl vliv na viabilitu THP-1 buněk i množství intracelulárně přežívajících bakterií. Velký vliv na životaschopnost bakterií mělo zejména aktivní sérum a bylo potřeba tuto skutečnost promítnout do plánování pokusu a dle předešlých výsledků „uměle“ navýšit počet bakterií, které jsou použity v experimentu. U inaktivních sér došlo ke dvojnásobnému navýšení, u aktivního Sigma séra ke čtyřnásobnému a u NIBCS séra k desetinásobnému navýšení počtu bakterií. Z toho důvodu byla ponížena počáteční infekční dávka na MOI 1:1, aby bylo možné experiment provést v daném schématu.

Vliv séra na intracelulární přežívání úzce souvisí i s problematikou fagocytózy. Mnoho studií spojuje vliv opsonizace *B. pertussis* specifickými protilátkami se zvýšenou mírou fagocytózy hostitelskými buňkami (Lamberti *et al.* 2010; Rodriguez *et al.* 2001; Hazenbos *et al.* 1994). Obdobně toto bylo pozorováno také u blízkce příbuzné *B. parapertussis* (Gorgojo *et al.* 2014). Existují nicméně i studie, kde nepozorovali vliv na fagocytózu bakterií po opsonizaci od neopsonizovaných bakterií, či bakterií inkubovaných se sérem neobsahující protilátky (Stefanelli *et al.* 2001). Naše výsledky zvýšenou fagocytózu podpořily, protože po inkubaci *B. pertussis* s 10 % aktivním či inaktivovaným sérem se 2x až 4x zvýšil počet intracelulárně lokalizovaných bakterií při MOI 1:1. Pokud bylo MOI vyšší (1:10) míra fagocytózy se zvýšila 2x. Tyto výsledky mohou být zatíženy nerovnoměrnou infekční dávkou na začátku experimentu. MOI 1:10 byla nastavena před opsonizací nikoliv před infekcí.

Výsledky z experimentů zaměřených na intracelulární přežívání *B. pertussis* při MOI 1:10 ukázaly signifikantně lepší přežívání u inaktivovaných sér, což může být v rozporu s publikovanými daty, kdy naopak vlivem opsonizace dochází k vyšší míře usmrcení bakterií uvnitř hostitelských buněk (Lamberti *et al.* 2010; Gorgojo *et al.* 2014). U aktivních sér došlo pouze k mírně zvýšené míře přežívání a při korekci na počet makrofágů je rozdíl nepatrný. Testovali jsme také počáteční MOI 1:1 s korekcí na vliv opsonizace, ale kromě lepšího přežívání v přítomnosti inaktivního NIBCS séra, jsme rozdíl neprokázali. Při srovnání je třeba

brát také v úvahu, že v uvedených studiích používali k opsonizaci pouze specifické protilátky proti *B. pertussis*. Vzhledem k nejasnostem, složitosti provedeného experimentu a vysokému rozptylu mezi měřeními bude nutné tyto data verifikovat, případně optimalizovat lepší schéma navrženého experimentu.

Sledoval se také vliv opsonizovaných bakterií na viabilitu THP-1 makrofágů. Studie z roku 2018 ukázala, že *B. pertussis* po inkubaci s aktivním sérem výrazně zvýšila expresi faktorů virulence a svou cytotoxicitu k hostitelským buňkám (Gestal *et al.* 2018). Naopak naše výsledky naznačují, že po inkubaci s aktivním sérem při MOI 1:10 se snižuje cytotoxicita opsonizovaných bakterií k makrofágům. Toto pozorování zřejmě bylo ovlivněno různou počáteční infekční dávkou na začátku infekčního experimentu díky opsonizaci. Po našem vyrovnání infekční dávky na MOI 1:1 nebyly již signifikantní rozdíly mezi vzorky pozorovány. Nelze však vyloučit fakt, že kvůli malé počáteční infekční dávce byly rozdíly mezi kmeny velmi malé.

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium přežívání *B. pertussis* v THP-1 buňkách v časně fázi infekce. THP-1 infekční model se pro tyto experimenty osvědčil jako rychlá a reprodukovatelná metoda pro testování více mutantních kmenů najednou. Testoval se i vliv opsonizace, která má nemalý vliv na intracelulární přežívání *B. pertussis* a je tak bližší reálné situaci. Obecně si intracelulární přežívání *B. pertussis* v lidských imunitních buňkách zaslouží naši pozornost, neboť makrofágy mohou sloužit jako rezervoár bakterií pro reinfekce, či přispívat k migraci v hostiteli.

## 7. Souhrn

- Byla charakterizována **růstová rychlost** vybraných kmenů *B. pertussis*. Doba zdvojení kontrolního kmene Tohama I byla  $3,8 \text{ h} \pm 0,1 \text{ h}$ . Podobná růstová rychlost byla naměřena i u mutantních kmenů Bvg<sup>+</sup>,  $\Delta BP2871$  a  $\Delta BP3011$ . U divokých kmenů B1917 a 18323 a mutantních kmenů  $\Delta risA$  a  $\Delta(BP2871 + BP3011)$  byla doba zdvojení v rozmezí 5 až 6 hod.
- Byl optimalizován infekční model na THP-1 makrofázích pro srovnávací testování mutantních kmenů *B. pertussis*. Byly sledovány 2 hlavní parametry – **cytotoxicita** bakterie k makrofágům (WST-1) a míra **přežívání** bakterie v makrofázích (CFU).
- Kmen *B. pertussis* trvale se vyskytující v Bvg<sup>+</sup> fázi vykazoval nižší míru **cytotoxicity** k makrofágům než kontrolní kmen Tohama I. Tento signifikantní rozdíl byl naměřen při použití počátečního MOI 1:40. Viabilita makrofágů po infekci kontrolním kmenem byla pouze 18 % a po infekci kmenem Bvg<sup>+</sup> byla 40 %. Míra **přežívání** mutantního kmene Bvg<sup>+</sup> v makrofázích se také lišila: u kmene Bvg<sup>+</sup> byla 24 % a u kontrolního kmene byla 11 %.
- Mutace v regulátorové doméně dvoukomponentového systému **RisA** vedla ke sníženému **přežívání** *B. pertussis* uvnitř THP-1 buněk pozorované při stejné i dvojnásobné počáteční infekční dávce, a to na 3–4 %, vzhledem ke kontrole (11 %).
- Bylo prokázáno, že dvojitá mutace v genu pro **cystein dioxygenázu** má vliv na intracelulární přežívání *B. pertussis* v THP-1 buňkách. Tato mutace  $\Delta(BP2871 + BP3011)$  vede k výraznému snížení **cytotoxického** působení bakterie. Největší rozdíly byly zaznamenány při použití počátečního MOI 1:40. Viabilita THP-1 buněk po infekci kontrolním kmenem byla 18 %, zatímco viabilita THP-1 buněk po infekci mutantním kmenem  $\Delta(BP2871 + BP3011)$  byla 62 %. Mutace pouze v jednom genu pro cystein dioxygenázu neměla vliv a dosahovala přibližně stejných hodnot jako kontrolní kmen – viabilita THP-1 buněk po infekci  $\Delta BP2871$  byla 18 % a po infekci  $\Delta BP3011$  25 %.
- Naše pozorování zaměřené na **vliv 10% séra** na přežívání bakterie ukázala, že působením inaktivovaného séra na *B. pertussis* Tohama I dochází k redukci počtu bakterií na 44 % u séra od firmy Sigma a na 61 % u NIBSC séra oproti kontrolnímu vzorku, tj. bakterie *B. pertussis* inkubovaná bez lidského séra. Po působení aktivního séra na bakterii se počet životaschopných bakterií zredukoval na 26 % u séra od firmy Sigma a 5 % u NIBSC séra.

- Srovnání kmene **B1917** s Tohama I se ukázalo, že kmen B1917 byl více odolný proti působení aktivního séra než kmen Tohama I. Po 30 min inkubaci s aktivním sérem od firmy Sigma se počet bakterií zredukoval pouze na 46 % a 31 % u NIBSC séra. Vliv inaktivovaného séra nebyl tak významný – počet bakterií zredukoval na 51 % u séra od firmy Sigma a 52 % u NIBSC séra.
- Dalším testovaným parametrem byla i míra **fagocytózy**. Při infekčním experimentu se ukázalo, že inkubace *B. pertussis* s 10 % sérem se nejvíce projevilo na zvýšené míře fagocytózy THP-1 buňkami – při počáteční **MOI 1:1** se extracelulárně nacházelo 34 % u kontrolního kmene a mezi 9 – 16 % u *B. pertussis* inkubovaných s oběma typy aktivních i inaktivovaných sér. Vyšší míra fagocytózy byla pozorovaná i při počáteční **MOI 1:10**, kdy se u kontroly extracelulárně nacházelo 64 % bakterií a po inkubaci bakterií se séry pouze 29 – 42 % - vyjma aktivního Sigma séra, kdy byl počet extracelulárních bakterií 73 %.
- Testoval se také vliv působení **10 % séra** na míru **cytotoxicity** k THP-1 buňkám. Při použití počátečního **MOI 1:1** se viabilita makrofágů v T2 hod po infekci kontrolním kmenem a bakteriemi inkubovanými s lidským sérem pohybovala mezi 80 – 90 % bez signifikantních rozdílů. Pokud se na začátku infekce použilo **MOI 1:10** byla viabilita buněk po infekci kontrolním vzorkem a *B. pertussis* inkubovanými s inaktivovanými séry cca 65 %. Naopak po infekci *B. pertussis* inkubovanými s aktivními séry byla viabilita THP-1 buněk v rozmezí 82 – 87 %. Pozorované výsledky při použití MOI 1:10 však mohou být zatíženy rozdílnou počáteční MOI z důvodu úbytku bakterií po působení séra.
- Naše výsledky také naznačují vliv působení **10 % séra** na intracelulární **přežívání** v THP-1 buňkách. Při **infekční dávce MOI 1:10** signifikantně lépe přežívali bakterie opsonizované inaktivovanými séry (NIBSC: 46 %, Sigma: 35 %) oproti kontrole (15 %). Při **infekční dávce MOI 1:1** byl signifikantní rozdíl v přežívání pouze po opsonizaci NIBSC sérem (60 %) oproti kontrole (20 %).



## 8. Seznam použité literatury

**ABRAMSON, Tzvia, Hassya KEDEM a David A. RELMAN.** Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with Bordetella pertussis Filamentous Hemagglutinin. *Infection and Immunity*. 2001, 69(4): 2650-2658.

**AHMAD, Jawid Nazir, Jana HOLUBOVA, Oldrich BENADA, Olga KOFRONOVA, Ludek STEHLIK, Martina VASAKOVA, Peter SEBO a Philippe J. SANSONETTI.** Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Inhibits Monocyte-to-Macrophage Transition and Dedifferentiates Human Alveolar Macrophages into Monocyte-like Cells. *MBio*. 2019, 10(5): e01743-19.

**AMDAHL, Hanne, Hanna JARVA, Marjo HAANPERÄ, Jussi MERTSOLA, Qiushui HE, T. Sakari JOKIRANTA a Seppo MERI.** Interactions between Bordetella pertussis and the complement inhibitor factor H. *Molecular Immunology*. 2011, 48(4): 697-705.

**ANDREASEN, Charlotte, Daniel A. POWELL, Nicholas H. CARBONETTI a Paulo Lee HO.** Pertussis Toxin Stimulates IL-17 Production in Response to Bordetella pertussis Infection in Mice. *PLoS ONE*. 2009, 4(9): e7079.

**BARBIC, Jerko, Mary F. LEEF, Drusilla L.- BURNS a Roberta D. SHAHIN.** Role of gamma interferon in natural clearance of Bordetella pertussis infection. *Infection and Immunity*. 1997, 65(12): 4904-4908.

**BARNES, Michael G. a Alison A. WEISS.** Activation of the complement cascade by Bordetella pertussis. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 220(2): 271-275.

**BAYRAM, Jan, Ivana MALCOVA, Larisa SINKOVEC, et al.** Cytotoxicity of the effector protein BteA was attenuated in Bordetella pertussis by insertion of an alanine residue. *PLOS Pathogens*. 2020, 16(8): e1008512.

**BART, Marieke J., Simon R. HARRIS, Abdolreza ADVANI, et al.** Global Population Structure and Evolution of Bordetella pertussis and Their Relationship with Vaccination. *MBio*. 2014, 5(2): e01074-14.

**BEHAR, Samuel M. a Volker BRIKEN.** Apoptosis inhibition by intracellular bacteria and its consequence on host immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2019, 60: 103-110.

**BELCHER, Thomas, Violaine DUBOIS, Alex RIVERA-MILLOT, Camille LOCHT a Françoise JACOB-DUBUISSON.** Pathogenicity and virulence of Bordetella pertussis and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*. 2021, 12(1): 2608-2632.

**BENDOR, Liron, Laura S. WEYRICH, Bodo LINZ, et al.** Type Six Secretion System of Bordetella bronchiseptica and Adaptive Immune Components Limit Intracellular Survival During Infection. *PLOS ONE*. 2015, 10(10): e0140743.

**BERGGÅRD, Karin, Eskil JOHANSSON, Frits R. MOOI a Gunnar LINDAHL.** Bordetella pertussis binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infection and Immunity*. 1997, 65(9): 3638-3643.

**BERNARD, Nicholas J., Conor M. FINLAY, Gilliam M. TANNAHILL, Joseph P. CASSIDY, Luke A. O'NEILL a Kingston H. G. MILLS.** A critical role for the TLR signaling adapter Mal in alveolar macrophage-mediated protection against Bordetella pertussis. *Mucosal Immunology*. 2015, 8(5): 982-992.

**BONE, M. Ashley, Aaron J. WILK, Andrew I. PERAULT, et al.** Bordetella PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017, 114(8): E1519-E1527.

**BOSSHART, Herbert a Michael HEINZELMANN.** THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine*. 2016, 4(21): 438-438.

**BRADSTREET, C. M. Patricia, Agnes J. TANNAHILL, Joan M. B. EDWARDS a P. F. BENSON.** Detection of Bordetella pertussis antibodies in human sera by complement-fixation and immunofluorescence. *Journal of Hygiene*. 1972, 70(1): 75-83.

**BRICKMAN, Timothy J. a Sandra K. ARMSTRONG.** Impact of Alcaligin Siderophore Utilization on In Vivo Growth of Bordetella pertussis. *Infection and Immunity*. 2007, 75(11): 5305-5312.

**BRICKMAN, Timothy J., Craig A. CUMMINGS, Sin-Yee LIEW, David A. RELMAN a Sandra K. ARMSTRONG.** Transcriptional Profiling of the Iron Starvation Response in Bordetella pertussis Provides New Insights into Siderophore Utilization and Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology*. 2011, 193(18): 4798-4812.

**BRIDEL, Sébastien, Valérie BOUCHEZ, Bryan BRANCOTTE, et al.** A comprehensive resource for Bordetella genomic epidemiology and biodiversity studies. *Nature Communications*. 2022, 13(1): 3807.

**BROCKMEIER, Susan, Karen B. REGISTER.** Effect of temperature modulation and bvg mutation of Bordetella bronchiseptica on adhesion, intracellular survival and cytotoxicity for swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology*. 2000. 73(1): 1-12.

**BROOKES, Charlotte, Irene FREIRE-MARTIN, Breeze CAVELL, et al.** Bordetella pertussis isolates vary in their interactions with human complement components. *Emerging Microbes & Infections*. 2018, 7(1): 1-11.

**BRUMMELMAN, Jolanda, Mieszko M. WILK, Wanda G. H. HAN, Cécile A. C. M. VAN ELS, Kingston H. G. MILLS a Nicholas CARBONETTI.** Roads to the development of improved pertussis vaccines paved by immunology. *Pathogens and Disease*. 2015: 73(8).

**CAFIERO, Juan Hilario, Yanina Andrea LAMBERTI, Kristin SURMANN, Branislav VECEREK, Maria Eugenia RODRIGUEZ a Jérôme NIGOU.** A Bordetella pertussis MgtC homolog plays a role in the intracellular survival. *PLOS ONE*. 2018: 13(8).

**CANONNE-HERGAUX, Francois, Samantha GRUENHEID, Gregory GOVONI a Philippe GROS.** The Nramp1 Protein and Its Role in Resistance to Infection and Macrophage Function. *Proceedings of the Association of American Physicians* [online]. 1999, 111(4): 283-289.

**CELLIER, Mathieu.** Cell-Type Specific Determinants of NRAMP1 Expression in Professional Phagocytes. *Biology*. 2013, 2(1): 233-283.

**ČERNÝ, Ondrej, Karen E. ANDERSON, Len R. STEPHENS, Phillip T. HAWKINS a Peter SEBO.** cAMP Signaling of Adenylate Cyclase Toxin Blocks the Oxidative Burst of Neutrophils through Epac-Mediated Inhibition of Phospholipase C Activity. *The Journal of Immunology*. 2017, 198(3): 1285-1296.

**CONOVER, Matt S., Gina Parise SLOAN, Cheraton F. LOVE, Neelima SUKUMAR a Rajendar DEORA.** The Bps polysaccharide of Bordetella pertussis promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Molecular Microbiology*. 2010, 77(6): 1439-1455.

- COOK, Alasdair M., Karin DENGEL a Theo H. M. SMITS.** Dissimilation of C3-sulfonates. *Archives of Microbiology*. 2006, 185(2): 83-90.
- COUTTE, Loïc, Ludovic HUOT, Rudy ANTOINE, et al.** The multifaceted *RisA* regulon of *Bordetella pertussis*. *Scientific Reports*. 2016, 6(1): 32774.
- CRAIG, Rodger, Elizabeth KUNKEL, Natasha S CROWCROFT, et al.** Asymptomatic Infection and Transmission of Pertussis in Households: A Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2020, 70(1): 152-161.
- CRAWFORD, James G. a Charles W. FISHEL.** GROWTH OF BORDETELLEA PERTUSSIS IN TISSUE CULTURE. *Journal of Bacteriology*. 1959, 77(4): 465-474.
- ČAPEK, Jan, Ilona PROCHÁZKOVÁ, Tomáš MATOUŠEK, David HOT, Branislav VEČEREK a Julian PARKHILL.** A Unique Reverse Adaptation Mechanism Assists *Bordetella pertussis* in Resistance to Both Scarcity and Toxicity of Manganese. *MBio*. 2021, 12(5): e01902-21.
- DEWAN, Kalyan K., Eric T. HARVILL a Jorn COERS.** Did new transmission cycles in anthropogenic, dense, host populations encourage the emergence and speciation of pathogenic *Bordetella*?. *PLOS Pathogens*. 2019, 15(3): e1007600.
- DIAZ-CHOA, Vladimir E., Diana LAM, Carlin S. LEE, et al.** Salmonella Mitigates Oxidative Stress and Thrives in the Inflamed Gut by Evading Calprotectin-Mediated Manganese Sequestration. *Cell Host & Microbe*. 2016, 19(6): 814-825.
- DOMINY, John E., Chad R. SIMMONS, P. Andrew KARPLUS, Amy M. GEHRING a Martha H. STIPANUK.** Identification and Characterization of Bacterial Cysteine Dioxygenases: a New Route of Cysteine Degradation for Eubacteria. *Journal of Bacteriology*. 2006, 188(15): 5561-5569.
- DUNKELBERGER, Jason R a Wen-Chao SONG.** Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*. 2010, 20(1): 34-50.
- DUNNE, Aisling, Pádraig J. ROSS, Eva POSPISILOVA, et al.** Inflammasome Activation by Adenylate Cyclase Toxin Directs Th17 Responses and Protection against *Bordetella pertussis*. *The Journal of Immunology*. 2010, 185(3): 1711-1719.
- EBY, Joshua C., Mary C. GRAY, Erik L. HEWLETT a S. R. BLANKE.** Cyclic AMP-Mediated Suppression of Neutrophil Extracellular Trap Formation and Apoptosis by the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *Infection and Immunity*. 2014, 82(12): 5256-5269.
- FABIÁNOVÁ, Kateřina, Jana ZAVADILOVA, Patrik LENZ, Helena SEBESTKOVA. A Jan KYNCL.** Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2019 – epidemiologická situace. *CEM SZÚ*, 2020. 29(10): 402-410.
- FARMAN, Mariam R., Denisa PETRÁČKOVÁ, Dilip KUMAR, et al.** Avirulent Phenotype promotes *Bordetella pertussis* Adaptation to the Intramacrophage Environment. *Emerging Microbes & Infections*. 2022, 10:1-96.
- FEDELE, Giorgio, Paola STEFANELLI, Fabiana SPENSIERI, Cecilia FAZIO, Paola MASTRANTONIO a Clara M. AUSIELLO.** *Bordetella pertussis* -Infected Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Undergo Maturation and Induce Th1 Polarization and Interleukin-23 Expression. *Infection and Immunity*. 2005, 73(3): 1590-1597.
- FRIEDMAN, Richard L., Kathryn NORDENSSON, Linda WILSON, Emmanuel T. AKPORIAYE a David E. YOCUM.** Uptake and intracellular survival of *Bordetella pertussis* in human macrophages. *Infection and Immunity*. 1992, 60(11): 4578-4585.

**GARCÍA-DEL PORTILLO, Francisco, Heidrun JUNGNTZ, Manfred ROHDE a Carlos A. GUZMÁN.** Interaction of Salmonella enterica Serotype Typhimurium with Dendritic Cells Is Defined by Targeting to Compartments Lacking Lysosomal Membrane Glycoproteins. *Infection and Immunity*. 2000, 68(5): 2985-2991.

**GESTAL, Monica C., Israel RIVERA, Laura K. HOWARD, et al.** Blood or Serum Exposure Induce Global Transcriptional Changes, Altered Antigenic Profile, and Increased Cytotoxicity by Classical Bordetellae. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 1969.

**GILL, Christopher J., Christian E. GUNNING, William B. MACLEOD, et al.** Asymptomatic Bordetella pertussis infections in a longitudinal cohort of young African infants and their mothers. *ELife*. 2021, 10: e65663.

**GORGOJO, Juan, Eric T. HARVILL, Maria Eugenia RODRÍGUEZ a R. P. MORRISON.** Bordetella parapertussis Survives inside Human Macrophages in Lipid Raft-Enriched Phagosomes. *Infection and Immunity*. 2014, 82(12): 5175-5184.

**GOUW, Daan de, Marien I. de. JONGE, Peter W. M. HERMANS, et al.** Proteomics-Identified Bvg-Activated Autotransporters Protect against Bordetella pertussis in a Mouse Model. *PLoS ONE*. 2014, 9(8): e105011.

**GRAY, David F. a Christina CHEERS.** THE STEADY STATE IN CELLULAR IMMUNITY. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. 1967, 45(4): 417-426.

**GRÖNDAHL-YLI-HANNUKSELA, Kirsi, Markku VIANDER, Jussi MERTSOLA a Qiushui HE.** Increased risk of pertussis in adult patients with mannose-binding lectin deficiency. *APMIS*. 2013, 121(4): 311-315.

**GUZMAN, Carlos A., Manfred ROHDE, Maren BOCK a Kenneth N. TIMMIS.** Invasion and intracellular survival of Bordetella bronchiseptica in mouse dendritic cells. *Infection and Immunity*. 1994, 62(12): 5528-5537.

**HAMIDOU SOUMANA, Illiassou, Bodo LINZ a Eric T. HARVILL.** Environmental Origin of the Genus Bordetella. *Frontiers in Microbiology*. 2017, 8: 28.

**HANAWA, Tomoko, Hideo YONEZAWA, Hayato KAWAKAMI, Shigeru KAMIYA a Sandra K. ARMSTRONG.** Role of Bordetella pertussis RseA in the cell envelope stress response and adenylate cyclase toxin release. *Pathogens and Disease*. 2013, 69(1): 7-20.

**HASAN, Shakir, Nikhil Nitin KULKARNI, Arni ASBJARNARSON, Irena LINHARTOVA, Radim OSICKA, Peter SEBO, Gudmundur H. GUDMUNDSSON a Andreas J. BÄUMLER.** Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin Disrupts Functional Integrity of Bronchial Epithelial Layers. *Infection and Immunity*. 2018, 86(3): e00445-17.

**HAZENBOS, Wouter L., Bernard M. VAN DEN BERG, Jan W. VAN'T WOUT, Fritz R. MOOI a Ralph VAN FURTH.** Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized Bordetella pertussis by human monocytes. *Infection and Immunity*. 1994, 62(11): 4818-4824.

**HIRAMATSU, Yukihiro, Koichiro SUZUKI, Daisuke MOTOOKA, Shota NAKAMURA a Yasuhiko Horiguchi.** Expression of small RNAs of Bordetella pertussis colonizing murine tracheas. *Microbiology and Immunology*. 2020, 64(6): 469-475.

**HIRAMATSU, Yukihiro, Takashi NISHIDA, Dendi Krisna NUGRAHA, Fuminori SUGIHARA, Yasuhiko Horiguchi a Sarah E. F. D'ORAZIO.** Melanin Produced by Bordetella parapertussis

Confers a Survival Advantage to the Bacterium during Host Infection. *MSphere*. 2021, 6(5): e00819-21.

**HOVINGH, Elise S., Betsy KUIPERS, Axel A BONAČIĆ MARINOVIĆ, et al.** Detection of opsonizing antibodies directed against a recently circulating *Bordetella pertussis* strain in paired plasma samples from symptomatic and recovered pertussis patients. *Scientific Reports*. 2018, 8(1): 12039.

**HOVINGH, Elise S., Bryan VAN DEN BROEK, Betsy KUIPERS, Elena PINELLI, Suzan H. M. ROOIJAKKERS, Ilse JONGERIUS a Andreas J BAUMLER.** Acquisition of C1 inhibitor by *Bordetella pertussis* virulence associated gene 8 results in C2 and C4 consumption away from the bacterial surface. *PLOS Pathogens*. 2017, 13(7): e1006531.

**CHEN, Qing, Victoria NG, Jason M. WARFEL, Tod J. MERKEL, Scott STIBITZ a Ann M. STOCK.** Activation of Bvg-Repressed Genes in *Bordetella pertussis* by *RisA* Requires Cross Talk from Noncooperonic Histidine Kinase *RisK*. *Journal of Bacteriology*. 2017, 199(22): e00475-17.

**INATSUKA, Carol S., Steven M. JULIO a Peggy A. COTTER.** *Bordetella* filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, 102(51): 18578-18583.

**JAHNSEN, Frode L., Deborah H. STRICKLAND, Jennifer A. THOMAS, et al.** Accelerated Antigen Sampling and Transport by Airway Mucosal Dendritic Cells following Inhalation of a Bacterial Stimulus. *The Journal of Immunology*. 2006, 177(9): 5861-5867.

**JIANG, Lingyan, Peisheng WANG, Xiaorui SONG, et al.** *Salmonella* Typhimurium reprograms macrophage metabolism via T3SS effector *SopE2* to promote intracellular replication and virulence. *Nature Communications*. 2021, 12(1): 879.

**JONGERIUS, Ilse, Tim J. SCHUIJT, Frits R. MOOI a Elena PINELLI.** Complement evasion by *Bordetella pertussis*: implications for improving current vaccines. *Journal of Molecular Medicine*. 2015, 93(4): 395-402.

**JUNGNITZ, Heidrun, Nicholas P. WEST, Mark J. WALKER, Gursharan S. CHHATWAL a Carlos 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*. 1998, 66(10): 4640-4650.

**KAMANOVA, Jana, Olga KOFRONOVA, Jiri MASIN, et al.** Adenylate Cyclase Toxin Subverts Phagocyte Function by *RhoA* Inhibition and Unproductive Ruffling. *The Journal of Immunology*. 2008, 181(8): 5587-5597.

**KATADA, Toshiaki, Makoto TAMURA a Michio UI.** The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983, 224(1): 290-298.

**KEHL-FIE, Thomas E., Seth CHITAYAT, M. Indriati HOOD, et al.** Nutrient Metal Sequestration by Calprotectin Inhibits Bacterial Superoxide Defense, Enhancing Neutrophil Killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host & Microbe*. 2011, 10(2): 158-164.

**KHELEF, Nadia, Arturo ZYCHLINSKY a Nicole GUIISO.** *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infection and Immunity*. 1993, 61(10): 4064-4071.

**KINNEAR Susan M., Ryan R. MARQUES a Nicholas H. CARBONETTI.** Differential Regulation of Bvg-Activated Virulence Factors Plays a Role in Bordetella pertussis Pathogenicity. *Infection and Immunity*. 2001, 69(4): 1983-1993.

**KIRIMANJESWARA, Girish S., Luis M. AGOSTO, Marry J. KENNETT, Ottar N. BJORNSTAD. Eric T. HARVILL.** Pertussis toxin inhibits neutrophil recruitment to delay antibody-mediated clearance of Bordetella pertussis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, 115(12): 3594-3601.

**KLIMOVA, Nela, Jana HOLUBOVA, Gaia STREPAROLA, et al.** Pertussis toxin suppresses dendritic cell-mediated delivery of B. pertussis into lung-draining lymph nodes. *PLOS Pathogens*. 2022, 18(6): e1010577.

**KNOWLES, Helen J., David R. MOLE, Peter J. RATCLIFFE a Adrian L. HARRIS.** Normoxic Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  by Modulation of the Labile Iron Pool in Differentiating U937 Macrophages: Effect of Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1. *Cancer Research*. 2006, 66(5): 2600-2607.

**KOHRO, Takahide, Toshiya TANAKA, Takeshi MURAKAMI, Yoichiro WADA, Hiroyuki ABURATANI, Takao HAMAKUBO a Tatsuhiko KODAMA.** A Comparison of Differences in the Gene Expression Profiles of Phorbol 12-myristate 13-acetate Differentiated THP-1 Cells and Human Monocyte-derived Macrophage. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2004, 11(2): 88-97.

**LAMBERTI, Yanina A., Jimena Alvarez HAYES, Maria L. PEREZ VIDAKOVICS, Eric T. HARVILL a Maria Eugenia RODRIGUEZ.** Intracellular Trafficking of Bordetella pertussis in Human Macrophages. *Infection and Immunity*. 2010, 78(3): 907-913.

**LAMBERTI, Yanina, Juan GORGOJO, Cintia MASSILLO a Maria E. RODRIGUEZ.** Bordetella pertussis entry into respiratory epithelial cells and intracellular survival. *Pathogens and Disease*. 2013, 69(3): 194-204.

**LAMBERTI, Yanina, Juan Hilario CAFIERO, Kristin SURMANN, et al.** Proteome analysis of Bordetella pertussis isolated from human macrophages. *Journal of Proteomics*. 2016, 136: 55-67.

**LENZ, Derrick H., Christine L. WEINGART a Alison A. WEISS.** Phagocytosed Bordetella pertussis Fails To Survive in Human Neutrophils. *Infection and Immunity*. 2000, 68(2): 956-959.

**LESNE, Elodie, Breeze E. CAVELL, Irene FREIRE-MARTIN, et al.** Acellular Pertussis Vaccines Induce Anti-pertactin Bactericidal Antibodies Which Drives the Emergence of Pertactin-Negative Strains. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11: 2108.

**LI, XiangWei, Yu YANG, Feng ZHOU, Yunzhi ZHANG, Hongzhou LU, Qi JIN a Lei GAO.** SLC11A1 (NRAMP1) Polymorphisms and Tuberculosis Susceptibility: Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2011, 6(1): e15831.

**LIU, Yulong, Hua LI, Daniel M. CZAJKOWSKY a Zhifeng SHAO.** Monocytic THP-1 cells diverge significantly from their primary counterparts: a comparative examination of the chromosomal conformations and transcriptomes. *Hereditas*. 2021, 158(1): 43.

**LUND, Maria E., Joyce TO, Bronwyn A. O'BRIEN a Sheila DONNELLY.** The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods*. 2016, 430: 64-70.

**MADHVI, Abhilasha, Hridesh MISHRA, Gina R. LEISCHING, Precious Z. MAHLOBO a Bienyameen BAKER.** Comparison of human monocyte derived macrophages and THP1-like macrophages as in vitro models for M. tuberculosis infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2019, 67: 101355.

- MARR, Nico, Adeline M. HAJJAR, Nita R. SHAH, Alexey NOVIKOV, Cathy S. YAM, Martine CAROFF a Rachel C. FERNANDEZ.** Substitution of the Bordetella pertussis Lipid A Phosphate Groups with Glucosamine Is Required for Robust NF- $\kappa$ B Activation and Release of Proinflammatory Cytokines in Cells Expressing Human but Not Murine Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD14. *Infection and Immunity*. 2010, 78(5): 2060-2069.
- MARTIN, Stacey W., Lucia PAWLOSKI, Margaret WILLIAMS, et al.** Pertactin-Negative Bordetella pertussis Strains: Evidence for a Possible Selective Advantage. *Clinical Infectious Diseases*. 2015, 60(2): 223-227.
- MATTOO, Seema a James D. CHERRY.** Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to Bordetella pertussis and Other Bordetella Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, 18(2): 326-382.
- MCKINNEY, John D., Kerstin Höner ZU BENTRUP, Ernesto J. MUÑOZ-ELÍAS, et al.** Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*. 2000, 406(6797): 735-738.
- MILLS, Kingston H, Amanda BARNARD, Johanna WATKINS a Keith REDHEAD.** Cell-mediated immunity to Bordetella pertussis: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infection and Immunity*. 1993, 61(2): 399-410.
- MILLS, Kingston H. G., Pádraig J. ROSS, Aideen C. ALLEN a Mieszko M. WILK.** Do we need a new vaccine to control the re-emergence of pertussis?. *Trends in Microbiology*. 2014, 22(2): 49-52.
- MONTI, Manlio, Danila DIANO, Francesco ALLEGRINI, Angelo DELMONTE, Valentina FAUSTI, Paola CRAVERO, Giulia MARCANTOGNINI a Giovanni Luca FRASSINETI.** Bordetella bronchiseptica pneumonia in a patient with lung cancer; a case report of a rare infection. *BMC Infectious Diseases*. 2017, 17(1): 644.
- MOON, Kyung, Richard P. BONOCORA, David D. KIM, et al.** The BvgAS Regulon of Bordetella pertussis. *MBio*. 2017, 8(5): 74 -81.
- NOBLE, Gary R., Roger H. Bernier, Elaine C. Esber et al.** Acellular and whole-cell pertussis vaccines in Japan. Report of a visit by US scientists . *JAMA*. 1987, 257(10): 1351-6.
- NOOFELI, Mojtaba, Habib BOKHARI, Paul BLACKBURN, Mark ROBERTS, John G. COOTE a Roger PARTON.** BapC autotransporter protein is a virulence determinant of Bordetella pertussis. *Microbial Pathogenesis*. 2011, 51(3): 169-177.
- NOVÁK, Jakub, David JURNEČKA, Irena LINHARTOVÁ, et al.** A Mutation Upstream of the rplN-rpsD Ribosomal Operon Downregulates Bordetella pertussis Virulence Factor Production without Compromising Bacterial Survival within Human Macrophages. *MSystems*. 2020, 5(6): e00612-20.
- PARK, Sunny a James A. IMLAY.** High Levels of Intracellular Cysteine Promote Oxidative DNA Damage by Driving the Fenton Reaction. *Journal of Bacteriology*. 2003, 185(6): 1942-1950.
- PETRÁČKOVÁ, Denisa, Mariam R. FARMAN, Fabian AMMAN, et al.** Transcriptional profiling of human macrophages during infection with Bordetella pertussis. *RNA Biology*. 2020, 17(5): 731-742.
- PISHKO, Elizabeth J., David J. BETTING, Christina S. HUTTER a Eric T. HARVILL.** Bordetella pertussis Acquires Resistance to Complement-Mediated Killing In Vivo. *Infection and Immunity*. 2003, 71(9): 4936-4942.

**PORTER, John F., Katie CONNOR a Willie DONACHIE.** Differentiation between human and ovine isolates of Bordetellaparapertussis using pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*. 1996, 135(1): 131-135.

**RIENDEAU, Carrie J. a Hardy KORNFELD.** THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. *Infection and Immunity*. 2003, 71(1): 254-259.

**RIVERA, Israel, Bodo LINZ a Eric T. HARVILL.** Evolution and Conservation of Bordetella Intracellular Survival in Eukaryotic Host Cells. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11: 557819.

**RIVERA, Israel, Bodo LINZ, Kalyan K. DEWAN, Longhuan MA, Christopher A. RICE, Dennis E. KYLE a Eric T. HARVILL.** Conservation of Ancient Genetic Pathways for Intracellular Persistence Among Animal Pathogenic Bordetellae. *Frontiers in Microbiology*. 2019, 10: 2839.

**RODRIGUEZ, Maria Eugenia, Sandra M. M. HELLWIG, Daniela F. HOZBOR, Jeanette LEUSEN, W. -Ludo VAN DER POL a Jan G. J. VAN DE WINKEL.** Fc Receptor-Mediated Immunity Against Bordetella pertussis. *The Journal of Immunology*. 2001, 167(11): 6545-6551.

**SELWA, Edithe, Marilyn DAVI, Alexandre CHENAL, Ana-Cristina SOTOMAYOR-PÉREZ, Daniel LADANT a Thérèse E. MALLIAVIN.** Allosteric Activation of Bordetella pertussis Adenylyl Cyclase by Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, 289(30): 21131-21141.

**SCHELLER, Erich V., Jeffrey A. MELVIN, Amanda J. SHEETS, Peggy A. COTTER a Michele S. SWANSON.** Cooperative Roles for Fimbria and Filamentous Hemagglutinin in Bordetella Adherence and Immune Modulation. *MBio*. 2015, 6(3): e00500-15.

**SCHNAPPINGER, Dirk, Sabine EHRT, Martin I. VOSKUIL, et al.** Transcriptional Adaptation of Mycobacterium tuberculosis within Macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. 2003, 198(5): 693-704.

**SCHNEIDER Boris, Roy GROSS a Albert HAAS.** Phagosome Acidification Has Opposite Effects on Intracellular Survival of Bordetella pertussis and B. bronchiseptica. *Infection and Immunity*. 2000, 68(12): 7039-7048.

**SCHWARTZ, Kevin L., Jeffrey C. KWONG, Shelley L. DEEKS, et al.** Effectiveness of pertussis vaccination and duration of immunity. *Canadian Medical Association Journal*. 2016, 188(16): E399-E406.

**SIVARAJAN, Rinu, David Komla KESSIE, Heike OBERWINKLER, Niklas PALLMANN, Thorsten WALLEES, Agmal SCHERZAD, Stephan HACKENBERG a Maria STEINKE.** Susceptibility of Human Airway Tissue Models Derived From Different Anatomical Sites to Bordetella pertussis and Its Virulence Factor Adenylate Cyclase Toxin. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021, 11: 797491.

**SLOAN, Gina Parise, Cheraton F. LOVE, Neelima SUKUMAR, Meenu MISHRA a Rajendar DEORA.** The Bordetella Bps Polysaccharide Is Critical for Biofilm Development in the Mouse Respiratory Tract. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189(22): 8270-8276.

**STARR, Tregi, Timothy J. BAULER, Preeti MALIK-KALE, Olivia STEELE-MORTIMER a Dennis C. KO.** The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. *PLOS ONE*. 2018, 13(3): e0193601.



**STEFANELLI, Paola, Rodolfo IPPOLITI, Cecilia FAZIO a Paola MASTRANTONIO.** Role of immune sera in the in-vitro phagocytosis of Bordetella pertussis strains. *Microbial Pathogenesis*. 2002, 32(3): 135-141.

**STIPANUK, M. H., I. UEKI, J. E. DOMINY, C. R. SIMMONS a L. L. HIRSCHBERGER.** Cysteine dioxygenase: a robust system for regulation of cellular cysteine levels. *Amino Acids*. 2009, 37(1): 55-63.

**SYCZ, Gabriela, Gisela DI VENANZIO, Jesus S. DISTEL, et al.** Modern Acinetobacter baumannii clinical isolates replicate inside spacious vacuoles and egress from macrophages. *PLOS Pathogens*. 2021, 17(8): e1009802.

**TAKUMI, Kazuhiro, Mikhail Kharisovich ZIYATDINOV, Viktor SAMSONOV, Gen NONAKA a Claire VIEILLE.** Fermentative Production of Cysteine by Pantoea ananatis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017, 83(5): e02502-16.

**TAYLOR-MULNEIX, Dawn L., Liron BENDOR, Bodo LINZ, et al.** Bordetella bronchiseptica exploits the complex life cycle of Dictyostelium discoideum as an amplifying transmission vector. *PLOS Biology* [online]. 2017, 15(4): e2000420.

**TAZATO, Nozomi, Yutaka HANDA, Miyuki NISHIJIMA, Rika KIGAWA, Chie SANO a Junta SUGIYAMA.** Novel environmental species isolated from the plaster wall surface of mural paintings in the Takamatsuzuka tumulus: Bordetella muralis sp. nov., Bordetella tumulicola sp. nov. and Bordetella tumbae sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015, 65(12): 4830-4838.

**TÓTH, Eszter Judit, Éva BOROS, Alexandra HOFFMANN, et al.** Interaction of THP-1 Monocytes with Conidia and Hyphae of Different Curvularia Strains. *Frontiers in Immunology*. 2017, 8:1369.

**TROTTA, Aldana, Lis N. VELÁSQUEZ, M. Ayelén MILILLO, et al.** Platelets Promote Brucella abortus Monocyte Invasion by Establishing Complexes With Monocytes. *Frontiers in Immunology*. 2018, 9:1000.

**TSENG, Hsing-Ju, Alastair G. MCEWAN, James C. PATON a Michael P. JENNINGS.** Virulence of Streptococcus pneumoniae: PsaA Mutants Are Hypersensitive to Oxidative Stress. *Infection and Immunity*. 2002, 70(3): 1635-1639.

**TSENG, Hsing-Ju, Yogitha SRIKHANTA, Alastair G. MCEWAN a Michael P. JENNINGS.** Accumulation of manganese in Neisseria gonorrhoeae correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Molecular Microbiology*. 2001, 40(5): 1175-1186.

**TSUCHIYA, Saho, Yasuko KOBAYASHI, Yusuke GOTO, Hiroyuki OKUMURA, Sunny NAKAE, Tasuke KONNO, Keiya TADA.** Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res*. 1982, 42(4):1530-6.

**VALDEZ, Hugo A., Jose L. MARIN FRANCO, Juan P. GORGOJO, Jimena ALVAREZ HAYES, Luciana BALBOA, Marcelo FERNANDEZ LAHORE, María C. SASIAIN a Maria Eugenia RODRIGUEZ.** Human macrophage polarization shapes B. pertussis intracellular persistence. *Journal of Leukocyte Biology*. 2021, 112(1):173-184.

**VALDEZ, Hugo Alberto, Juan Marcos OVIEDO, Juan Pablo GORGOJO, Yanina LAMBERTI, Maria Eugenia RODRIGUEZ a Nicholas CARBONETTI.** Bordetella pertussis modulates human macrophage defense gene expression. *Pathogens and Disease*. 2016, 74(6): ftw073.

**VAN DER HEIJDEN, Joris, Lisa A. REYNOLDS, Wanyin DENG, et al.** Salmonella Rapidly Regulates Membrane Permeability To Survive Oxidative Stress. *MBio*. 2016, 7(4): e01238-16.

**VON BOTH, Ulrich, Maurice BERK, Paul-Michael AGAPOW, et al.** Mycobacterium tuberculosis Exploits a Molecular Off Switch of the Immune System for Intracellular Survival. *Scientific Reports* [online]. 2018, 8(1): 661.

**VOUGIER, Stéphanie, Jean MARY, Nathalie DAUTIN, Joëlle VINH, Bertrand FRIGUET a Daniel LADANT.** Essential Role of Methionine Residues in Calmodulin Binding to Bordetella pertussis Adenylate Cyclase, as Probed by Selective Oxidation and Repair by the Peptide Methionine Sulfoxide Reductases. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, 279(29): 30210-30218.

**WARFEL, Jason M. a Tod J. MERKEL.** Bordetella pertussis infection induces a mucosal IL-17 response and long-lived Th17 and Th1 immune memory cells in nonhuman primates. *Mucosal Immunology*. 2013, 6(4): 787-796.

**WARFEL, Jason M., Lindsey I. ZIMMERMAN a Tod J. MERKEL.** Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(2): 787-792.

**WILK, Mieszko M., Alicja MISIAK, Róisín M. MCMANUS, Aideen C. ALLEN, Marina A. LYNCH a Kingston H. G. MILLS.** Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by Previous Infection of Mice with Bordetella pertussis. *The Journal of Immunology*. 2017, 199(1): 233-243.

**ZHANG, Jian Hua a Ming XU.** DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*. 2000, 10(3): 205-211.

**ZHANG, Guoliang, Huizhen ZHANG, Yiwen LIU, Yiqing HE, Wenjuan WANG, Yan DU, Cuixia YANG a Feng GAO.** CD44 clustering is involved in monocyte differentiation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2014, 46(7): 540-547.

**ZIMNA, Katarzyna, Eva MEDINA, Heidrun JUNGNTZ a Carlos A. GUZMÁN.** Role played by the response regulator Ris in Bordetella bronchiseptica resistance to macrophage killing. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, 201(2): 177-180.

Z knihy:

**FINGER H, von KOENIG CHW. Bordetella.** In: **Baron S, editor.** Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 31.

**SINGH, Yashpal, Anjani SAXENA, Rajesh KUMAR a Mumtash Kumar SAXENA.** Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. In: MASCELLINO, Maria Teresa, ed. *Salmonella - A Re-emerging Pathogen*. InTech, 2018, 2018-07-18.

Diplomová práce:

**ŠTIPL, Daniel.** *Interakce lidského patogenu Bordetella pertussis s krevním sérem*. Praha, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra genetiky a mikrobiologie. Vedoucí práce Večerek, Branislav.