

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Vojtěch Ryvola

**Příprava a charakterizace proteinových konstruktů ke strukturní
analýze acylační domény adenylát cyklázového toxinu z bakterie**

B. pertussis

Preparation and characterization of protein constructs for structural
analysis of acylate domain of adenylate cyclase toxin from bacteria

B. pertussis

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Tomáš Ječmen, Ph.D., konzultant: Mgr. Ladislav

Bumba, Ph.D.

Praha 2022

Prohlášení:

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

V Praze dne 26. 05. 2022

Podpis:

Abstrakt:

Černý kašel neboli pertuse je nakažlivé bakteriální onemocnění dýchacích cest způsobené bakterií *B. pertussis*. Navzdory velké proočkovanosti populace ve vyspělých zemích, patří černý kašel k nejrozšířenějším onemocněním, kterému lze předcházet očkováním. Bakterie *B. pertussis* produkuje celou řadu toxinů, které usnadňují osídlení a pomnožení bakteriálních buněk na hostitelském řasinkovém epitelu horních cest dýchacích. Jedním z těchto toxinů je adenylát cyklázový toxin, který je z bakteriálních buněk uvolňován pomocí sekrečního aparátu typu I a po jeho vápníkem-indukovaném sbalení je schopen dopravit přes cytoplasmatickou membránu hostitelských buněk svoji N-koncovou adenylát cyklázovou doménu, která po interakci s cytozolickým kalmodulinem katalyzuje přeměnu adenosintrifosfátu (ATP) na cyklický adenosinmonofosfát (cAMP). Vysoké hladiny cAMP vedou následně k poruchám buněčné signalizace a k zásadnímu omezení baktericidních funkcí fagocytujících buněk. Cílem této bakalářské práce bylo připravit a charakterizovat 'hybridní' proteinové konstrukty, které se skládají z C-koncové části acylační domény a N-koncové části RTX domény (v pozicích 881-1038 a 881-1047) napojené na C-koncovou část RTX domény (v pozici 1562-1681) nesoucí strukturní informaci pro inicializaci správného sbalení proteinové molekuly. Titrace proteinů pomocí vápenatých iontů a měření spektroskopie cirkulárního dichroismu ukázaly odlišnou kinetiku ve vápníkem-zprostředkovaném sbalování proteinů a zároveň odlišné zastoupení sekundárních struktur proteinů v plně sbalených proteinových konstruktech. Tyto data jasně ukazují kooperativní skládání acylační domény v závislosti na RTX doméně.

Klíčová slova: *Bordetella*, adenylát cyklázový toxin, cAMP

Abstract:

Whooping cough or pertussis is a contagious bacterial airways disease caused by *B. pertussis*. Despite the high vaccination coverage of the population in developed countries, whooping cough is one of the most common diseases that can be prevented by vaccination. Bacteria *B. pertussis* produces a variety of toxins that facilitate the colonization and proliferation of bacterial cells in the host ciliary epithelium of the upper respiratory tract. One of these toxins is adenylate cyclase toxin, which is released from bacterial cells by a type I secretory apparatus and, after its calcium-induced packaging, is able to transport its N-terminal adenylate cyclase domain across the cytoplasmic membrane of host cells. This domain is able to catalyze conversion of adenosine triphosphate (ATP) to a cyclic adenosine monophosphate (cAMP) after the interaction with cytoplasmic calmodulin. High levels of cAMP subsequently lead to impaired cell signaling and to a fundamental reduction in the bactericidal functions of phagocytic cells. The aim of this bachelor thesis was to prepare and characterize 'hybrid' protein constructs, which consist of a C-terminal part of the acylation domain and an N-terminal part of the RTX domain (at positions 881-1038 and 881-1047) linked to the C-terminal part of the RTX domain (at positions 1562-1681) carrying structural information to initiate proper packaging of the protein molecule. Protein titrations using calcium ions and circular dichroism spectroscopy measurements showed different kinetics in calcium-mediated protein folding as well as different representations of protein secondary structures in fully packaged protein constructs. These data clearly show cooperative acylation domain folding depending on the RTX domain

Keywords: *Bordetella*, adenylate cyclase toxin, cAMP

(In Czech)

Poděkování:

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Tomáši Ječmenovi, Ph.D. za vedení při sepisování této bakalářské práce.

Dále bych chtěl poděkovat svému konzultantovi Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za rady a za vedení při experimentální části v laboratoři.

Obsah

Seznam zkratek	9
1 Úvod.....	11
1.1 Černý kašel.....	11
1.2 Bakterie rodu <i>Bordetella</i>	12
1.3 Faktory virulence <i>Bordetella pertussis</i>	12
1.4 Adenylát cyklázový toxin	14
1.4.1 Sekrece adenylát cyklázového toxinu.....	14
1.4.2 Struktura adenylát cyklázového toxinu.....	16
1.4.3 Mechanismus účinku adenylát cyklázového toxinu na membránu myeloidních buněk.....	19
1.4.4 Vliv toxinu na makrofágy, monocyty a dendritické buňky	20
2 Cíl práce.....	22
3 Materiál a metody	23
3.1 Chemikálie	23
3.1.1 Antibiotika	23
3.1.2 Chromatografický nosič.....	23
3.1.3 Elektroforetické standardy	24
3.1.4 Enzymy	24
3.1.5 Kultivační media.....	24
3.1.6 Bakteriální kmeny.....	24
3.1.7 Plazmidy	24

3.2	Laboratorní vybavení	25
3.3	Metody	26
3.3.1	Příprava agarových misek pro kultivaci buněk <i>E.coli</i>	26
3.3.2	Polymerázová řetězová reakce.....	26
3.3.3	Restrikční štěpení plazmidu.....	27
3.3.4	Elektroforéza v agarosovém gelu	28
3.3.5	Purifikace DNA fragmentů z gelu	28
3.3.6	Klonování pomocí restrikčního štěpení bez endonukleáz (Gibson cloning)	29
3.3.7	Transformace plazmidové DNA do bakterií.....	29
3.3.8	Izolace plazmidové DNA.....	30
3.3.9	Polyakrylamidová elektroforéza	31
3.3.10	Expresce rekombinantního proteinu.....	32
3.3.11	Purifikace rekombinantního proteinu	32
3.3.12	Renaturace proteinu	33
3.3.13	Metoda Bradfordové	33
3.3.14	Limitovaná proteolýza	34
3.3.15	Spektroskopie cirkulárního dichroismu	35
4	Výsledky	36
4.1	Návrh Konstruktů 1 a Konstruktů 2	36
4.2	Příprava expresních vektorů.....	37
4.3	Expresce Konstruktů 1 a Konstruktů 2	41
4.4	Purifikace Konstruktů 1 a Konstruktů 2.....	42
4.5	Limitovaná proteolýza	45
4.6	Spektroskopie cirkulárního dichroismu	47

5	Diskuze	49
6	Závěr	50
7	Reference	51

Seznam zkratek

A	Absorbance
AC	Adenylát cyklázová doména
APS	Peroxodisíran amonný
ATP	Adenosintrifosfát
BSA	Hovězí sérový albumin
bp	Párů bází
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
cCMP	Cyklický cytosinmonofosfát
cUMP	Cyklický uracilmonofosfát
CD	Cirkulární dichroismus
c_m (mg/ml)	Hmotnostní koncentrace
CyaA	Adenylát cyklázový toxin
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytosintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
dTTP	Deoxythymosintrifosfát
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
FHA	Filamentozní hemaglutinin
GTP	Guanosintrifosfát
Hly	Hemolyzinová doména
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalaktopyranozid
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysacharid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
PCR	Polymerázová řetězová reakce
Peg	Polyethylenglykol

PRN	Pertaktin
PT	Pertusový toxin
RTX	Repeats-in-toxin-opakování v toxinu
SDS	Dodecylsírán sodný
T1SS	Sekreční systém typu I
TCT	Tracheální toxin
TEMED	Tetraethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminoethan
TTSS	Sekreční systém typu III

1 Úvod

1.1 Černý kašel

Černý kašel se řadí mezi nejzávažnější bakteriální onemocnění dýchacích cest, které způsobuje bakterie *Bordetella pertussis* [1]. Celosvětově touto nemocí onemocní kolem 30-40 milionů lidí ročně, z toho jich zemře kolem 300 000. Největší počet potvrzených případů nákazy pochází ze zemí třetího světa. V těchto zemích nejen že není povinné očkování, ale ani medicína tam nedosahuje takové úrovně jako ve vyspělých státech [2].

V České republice bylo zavedeno očkování v roce 1958 a od té doby se úmrtnost na černý kašel velice snížila. V době před zavedením očkování prodělalo tuto nemoc desetitisíce lidí ročně. V dnešní době je očkování povinné pro děti. Od roku 2007 se k očkování používá šesti složková vakcína tzv. Hexavakcína [3], která člověka chrání 3-12 let [4]. Hexavakcína je kombinací šesti různých vakcín v jednu. Chrání před černým kašlem, záškrtem, tetanem, dětskou obrnou, žloutenkou typu B a hemofilovou infekcí. Onemocnění se může vyskytnout i u dospělých lidí, ale u nich přeci jen není tak závažné jako u dětí či dokonce u kojenců, kteří se nemohou nechat očkovat [5]. U malých dětí může černý kašel způsobit i smrt.

Bakterie mohou být přenášeny formou kapének, kýchnutím či kašláním mezi dvěma osobami na vzdálenost 2 metrů. Kapénka mohou přistát na ústech či na nosu nebo se mohou přímo dostat do plic. Bakterie jsou schopné několik dní také přežít na suchém povrchu. Proto je možné nakazit se i dotykem kliky od dveří [2].

Onemocnění trvá 6-8 týdnů a jeho inkubační doba je 7-21 dní [3]. Mezi příznaky černého kašle patří rýma, zvýšená teplota, slzení a dráždivý záchvatový kašel. K záchvatům dochází v určitých intervalech a může se k nim přidat ještě zvracení či dávení [3,4].

Hostiteli s překonáním onemocnění pomáhá imunitní systém. V první linii ochrany stojí epitelové buňky, které díky pohybu řasinek a produkci hlenu zachytávají nečistoty a transportují je pryč z dýchacích cest. Mezi další důležité buňky imunitního systému patří makrofágy, které jsou schopny pohlcovat cizorodé částice a předkládat na svém povrchu antigen T-lymfocytům. T-lymfocyty a B-lymfocyty jsou buňky zprostředkovávající adaptivní imunitu. V největší míře jsou v plicích zastoupeny

T-lymfocyty, které jsou schopné rozpoznat parazita a zahájit účinnou imunitní odpověď. Imunitní odpověď zprostředkovávají také granulocyty. Tyto jaderné buňky jsou schopny vytvářet proteolytické enzymy a pohlcovat cizorodé buňky [6].

1.2 Bakterie rodu *Bordetella*

Bakterie *B. pertussis* je gramnegativní aerobní bakterie ovoidního tvaru. Samotná bakterie byla izolována v roce 1906 [7]. Bakterii izolovali belgický imunolog Jules Bordet a belgický bakteriolog Octave Gengou [7].

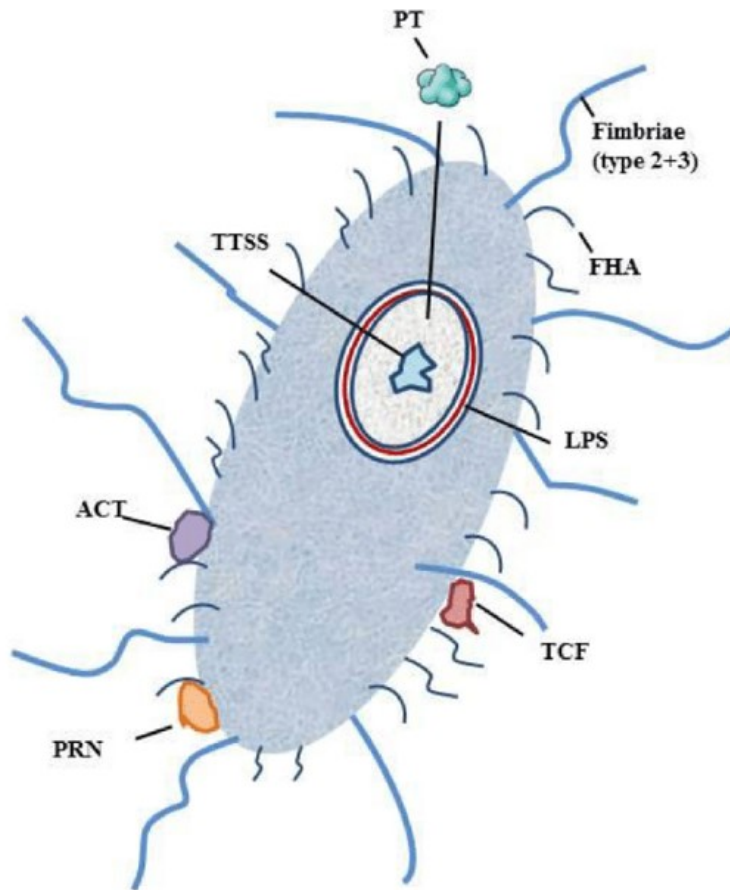
Mezi bakterie rodu *Bordetella* patří různé zvířecí a lidské patogeny. Tyto patogeny kolonizují horní cesty dýchací a způsobují závažná respirační onemocnění. Mezi nejznámější patogeny patří *B. parapertussis*, *B. pertussis* a *B. bronchiseptica*. *B. parapertussis* napadá jak člověka a ovce [8]. Největší zastoupení hostitelů má *B. bronchiseptica*. Ta napadá člověka a různé druhy zvířat. Díky této široké škále hostitelů může způsobovat různá onemocnění dýchacích cest od těch nejlehčích až po smrtící zápal plic [9].

1.3 Faktory virulence *Bordetella pertussis*

Na Obr. 1.1 jsou zobrazeny faktory virulence *B. pertussis*, mezi které se řadí adheziny a toxiny. Mezi adheziny patří filamentózní hemagglutinin, pertaktin a fimbrie. Všechny tyto proteiny se nachází na povrchu bakterie a s jejich pomocí je bakterie schopna se přichytit na epiteliální buňku dýchacích cest [10].

Mezi toxiny patří adenylát cyklázový toxin, pertusový toxin, dermonekrotický toxin, tracheální toxin a lipopolysacharid [10]. Tracheální toxin je 921 Da velký glykopeptid, který paralyzuje řasinky. Řasinky se nachází na povrchu epiteliálních buněk a působením toxinu dojde k velké produkci hlenu epiteliálními buňkami. Hlen se začne hromadit v horních cestách dýchacích a jako obranný reflex se spustí prudký kašel k jejich uvolnění [11]. Pertusový toxin je exotoxin o velikosti 105 kDa, který je tvořen šesti podjednotkami. Toxin podporuje vazbu mikrobů na řasinky epitelu dýchacích cest a inhibuje buněčnou adenylátcyklázu. V důsledku toho je narušena buněčná signalizace, což způsobí v hostitelském organismu hypoglykemii [12]. Dermonekrotický toxin je protein o velikosti 150 kDa, který způsobuje deaminaci glutaminu 63 GTP-ázy

podskupiny Rhó. V důsledku toho je narušena homeostáza v buňce [11]. Lipopolysacharid se nachází na vnější straně membrány gramnegativních bakterií a je vylučován při rozpadu bakteriální buňky. Dále chrání dendritické buňky před apoptózou a napomáhá k pevnosti vnější bakteriální membrány [13].



Obr. 1.1 Bakterii *B. pertussis* a její virulentní faktory (převzato z [9])

PT, pertusový toxin; TCT, tracheální cytotoxin; ACT, adenylát cyklázový toxin; TTSS, sekreční systém typu III; LPS, lipopolysacharid; FHA, filamentozní hemaglutinin; PRN, pertaktin.

1.4 Adenylát cyklázový toxin

Adenylát cyklázový toxin je produkován gramnegativní bakterií *B. Pertussis* a patří do rodiny tzv. Repeats-in-toxin (RTX). Mezi společné vlastnosti RTX proteinů patří vylučování sekrečním systémem typu I (T1SS) a charakteristicky opakující se sekvence tvořené devíti aminokyselinovými zbytky bohaté na glycin a aspartát [14].

1.4.1 Sekrece adenylát cyklázového toxinu

Adenylát cyklázový toxin je kódován genem *cyaA*, který je lokalizován společně s geny *cyaBCDE* v lokusu chromozomu (Obr. 1.2). Gen *cyaA* kóduje samotný adenylát cyklázový toxin. Geny *cyaBDE* kódují proteiny sekrečního systému typu I (Obr 1.3). Ty jsou důležité pro správnou sekreci adenylát cyklázového toxinu ven z buňky. Geny *cyaABDE* jsou přepisovány z jednoho promotoru, který leží mezi geny *cyaA* a *cyaB* společně do jedné mRNA. Gen *cyaC* je přepisován opačným směrem z jiného promotoru [15]. Gen *cyaC* kóduje enzym adenyltransferázu, který používá acyl-ACP (z anglického acyl-Acyl Carrier Protein) jako donor acylového zbytku. Pomocí tohoto nosného proteinu dojde k acylaci pomocí kyseliny palmitové na vnitřních lyzinových zbytcích K860 a K983. Díky acylaci se protoxin stává aktivní [16].

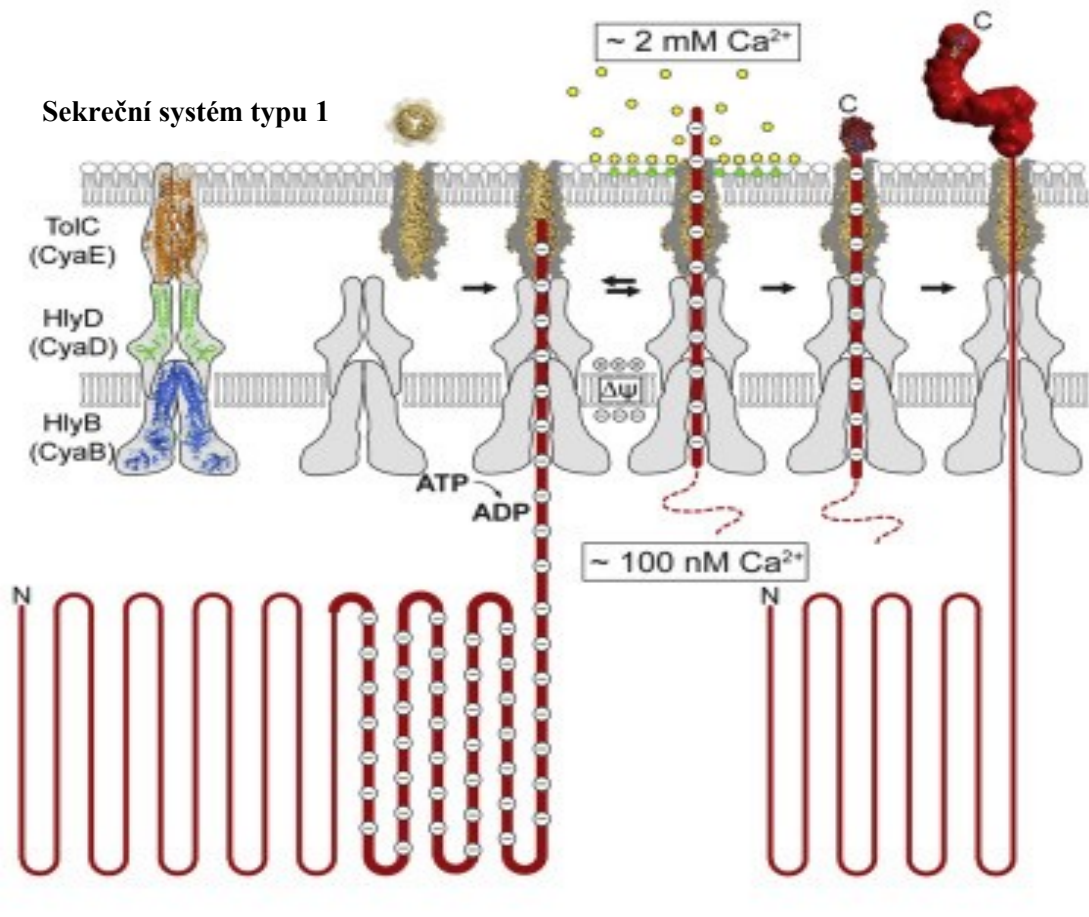


Obr. 1.2 Lokus chromozomu kde se nachází geny *cyaABCDE* (převzato z [17])

cyaA, adenylát cyklázový toxin; *cyaB*, protein vnitřní membrány; *cyaD*, membránový fúzní protein; *cyaE*, protein vnější membrány; *cyaC*, enzym adenyltransferáza. Geny *cyaB*, *cyaD*, *cyaE* jsou přepisovány z jednoho promotoru do jedné mRNA. Geny *cyaC* a *cyaA* jsou přepisovány samostatně každý z jiného promotoru [17].

Sekreční systém typu I prochází přes vnitřní a vnější membránu bakterie a překlenuje celý periplazmatický prostor. Gen *cyaB* kóduje protein vnitřní membrány. Gen *cyaD* kóduje membránový fúzní protein. Fúzní protein se rozkládá mezi vnitřní membránou a periplazmatickým prostorem. Gen *cyaE* kóduje protein vnější membrány, který navazuje na fúzní protein [18].

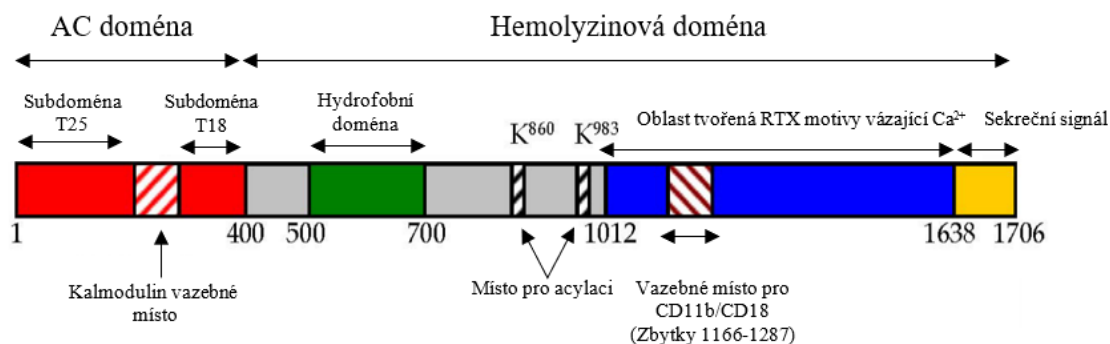
Protein vnitřní membrány dokáže rozpoznat sekreční signál lokalizovaný v posledních 60 aminokyselinách v C-terminální části CyaA za současné hydrolyzy ATP. Navázáním sekretovaného proteinu na fúzní protein dojde ke změně jeho konformace a ke spojení s proteinem vnější membrány. Tímto se vytvoří souvislý kanál překlenující celý periplazmatický prostor. V extracelulárním prostředí je mnohem větší koncentrace Ca^{2+} iontů než v bakteriální cytoplazmě, kde CyaA nemůže být složen do funkční konformace. V extracelulárním prostředí se Ca^{2+} ionty vážou na sekvence nacházející se na C-konci CyaA. Díky tomu dochází ke sbalení proteinu do terciární struktury a k vytvoření Brownových západek. Ty brání proteinu ve zpětném pronikání T1SS [14].



Obr. 1.3 Mechanismu translokace RTX toxinu sekrečním systémem typu I (převzato a upraveno z [14])
 Geny *cyaE*, *cyaD* a *cyaB* kódují proteiny, které tvoří T1SS. Protein vnitřní membrány rozpozná sekreční signál na C-terminálním konci proteinu za současné hydrolyzy ATP. Fúzní protein změní konformaci a spojí se s proteinem vnější membrány. Protein se díky T1SS dostane do extracelulárního prostoru, kde C-terminální konec interaguje s Ca^{2+} ionty. Jednotlivé opakující se RTX motivy jsou skládány do β -otáček a vytvoří tzv. Brownovy západky, díky nimž protein nemůže pronikat zpět pomocí T1SS do buňky.

1.4.2 Struktura adenylát cyklázového toxinu

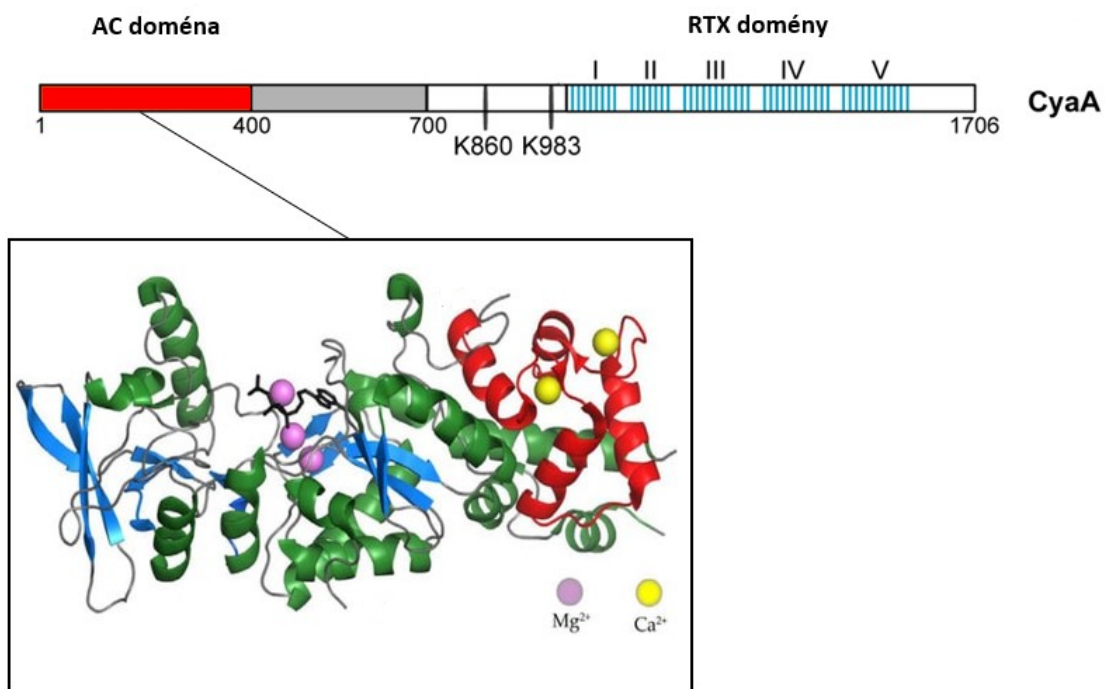
Adenylát cyklázový toxin (Obr. 1.4) je tvořen 1706 aminokyselinovými zbytky a skládá se z hemolyzinové a adenylát cyklázové domény [19].



Obr. 1.4 Struktura adenylát cyklázového toxinu (převzato a upraveno z [20])

1.4.2.1 Adenylát cyklázová doména

Adenylát cyklázová doména má katalytickou aktivitu a končí přibližně čtyřstou aminokyselinou [19]. Samotná AC doména se skládá ze subdomény T25, která leží mezi aminokyselinovými zbytky 1-224 a subdomény T18, která se nachází mezi aminokyselinovými zbytky 225-339 [21]. Subdoména T25 je schopna vázat ionty Mg^{2+} a je označována jako hlavní katalytické místo enzymu [22]. Bylo dokázáno, že dojde-li k nahrazení dvou lysinových zbytků na pozicích 58 a 65, tak dojde k výraznému snížení či dokonce ztrátě katalytické aktivity AC domény [23]. Na subdoméně T18 se nachází hlavní vazebné místo pro kalmodulin [22]. Krystalová struktura AC domény (Obr. 1.5) zkoumaná společně s C-koncovou částí, pomohla odhalit kalmodulin-vazebné místo na této subdoméně a to na aminokyselinovém zbytku Trp 242 a také mezi zbytky 259-273 [24,25]. Studie ukázaly, že došlo-li by k substituci zbytku 242, pak by se afinita AC domény ke kalmodulinu snížila tisícinásobně [23].



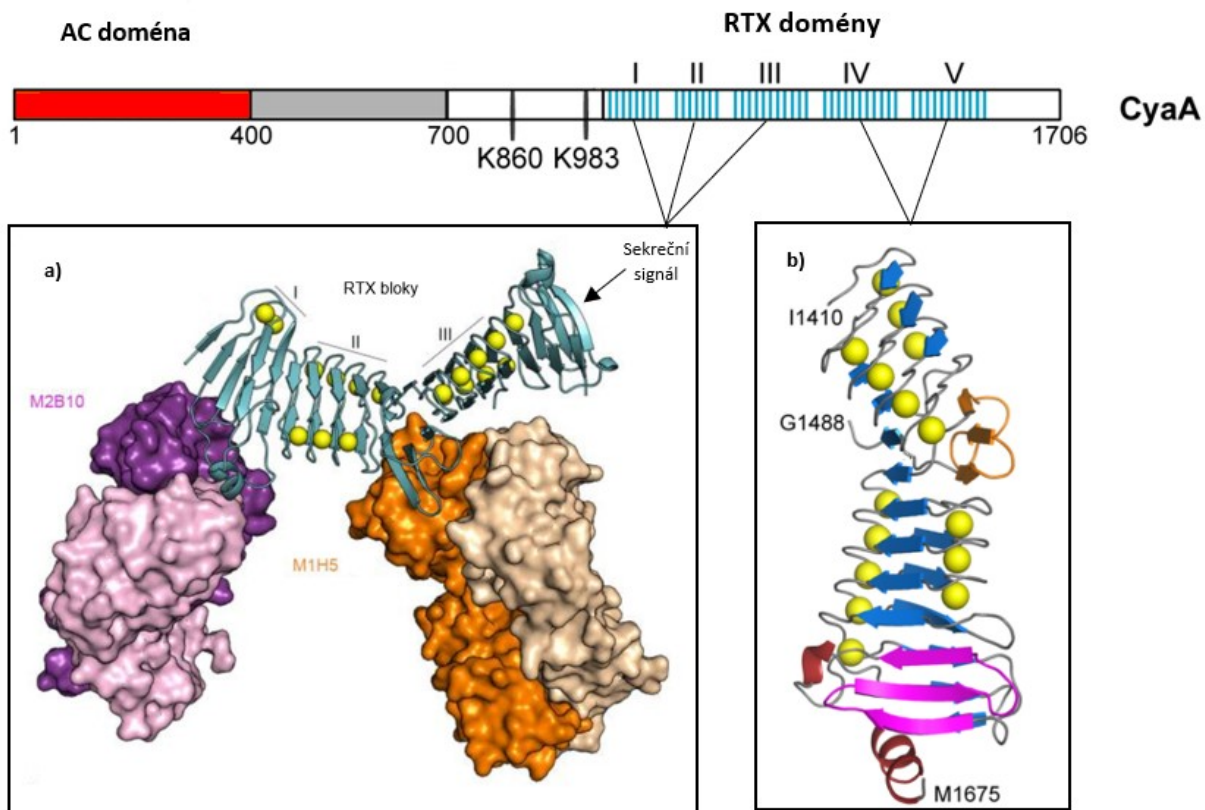
Obr. 1.5 Krystalová struktura AC domény CyaA společně s C-koncovou částí (převzato a upraveno z [26,27])

Červeně je znázorněna C-terminální část, kam se vážou žluté ionty vápníku, růžově jsou vyznačeny ionty hořčíku a zeleně a modře jsou označeny α -helixy a β -řetězce AC domény.

1.4.2.2 Hemolyzinová doména

Druhou částí proteinu po AC doméně je Hly doména, jejíž hlavní funkcí je tvorba kation selektivních kanálů, které způsobí osmotickou lyzi buňky a doprava AC domény do hostitelské buňky [28]. Hemolyzinovou doménu tvoří 1306 aminokyselinových zbytků. Segment 400-500 spojuje AC doménu s Hly doménou a je hodně bohatý na argininové zbytky. Aminokyselinové zbytky 411-490 tvoří α -helikální sekundární struktury [29]. Hlavním úkolem úseku 400-500 je interagovat a destabilizovat lipidovou membránu [30]. Mezi pětistou až sedmistou aminokyselinou se nachází hydrofobní oblast proteinu, kterou z části tvoří glutamátové zbytky. Tato oblast se skládá z několika transmembránových α -helixů, které jsou důležité jak pro tvorbu pórů, tak pro translokaci AC domény [31]. Mezi sedmistou až jeden tisíc stou aminokyselinou dochází k aktivaci proACT pomocí posttranslační modifikace mastnou kyselinou. Mastná kyselina acyluje postranní řetězce lyzinů K860 a K983. Acylace na K983 je nezbytná pro aktivitu toxinu na erythrocytech, zatímco acylace na K860 nemá až takový zásadní vliv na toxinové aktivitě [32,33]. V poslední části CyaA se nachází 38-42 opakujících se RTX motivů, které jsou uspořádány do pěti bloků (Obr. 1.6). Jednotlivé motivy tvoří opakující

nonapeptidy, jež mají sekvenci X-(L/I/F)-XG-G-X-G-(N/D)-D (X-libovolný aminokyselinový zbytek) [34]. Dvě po sobě jdoucí repetice váží ionty Ca^{2+} a tvoří jednu otáčku β -válce [20]. Struktura bloků I-III (kromě pozice 1007-1055) byla vyřešena pomocí krystalové struktury, která byla zkoumána s navázanými protilátkami M2B10, M1H5 a sekrečním signálem za účelem zjistit krystalovou strukturu těchto bloků a odhalit místa k neutralizaci aktivity proteinu [35]. Pomocí krystalové struktury byly také vyřešeny bloky IV a V [36]. Blok I je lokalizován mezi zbytky 1012-1088, blok II mezi zbytky 1135-1211 a blok III mezi zbytky 1286-1353. Jednotlivé bloky spojují segmenty, které jsou tvořeny antiparalelními β -řetězci [35]. V hemolyzinové části proteinu se dále nachází vazebné místo pro receptor fagocytujících buněk CD11b/CD18 a to mezi zbytky 1166-1287. Blok IV obsahuje osm RTX motivů a je tvořen zbytky 1410-1488. RTX motivy váží pomocí aspartátových postranních řetězců a karbonylů glycinových zbytků sedm Ca^{2+} iontů [36]. Spojující segment mezi bloky IV a V obsahuje zbytky 1489-1525 a skládá se ze tří antiparalelních β -řetězců. Blok V je tvořen aminokyselinovými zbytky 1526-1618, které jsou uspořádány do devíti RTX motivů [36]. Tyto RTX motivy jsou schopné vázat osm Ca^{2+} iontů, které jsou koordinovány postranními řetězci aspartátových zbytků a karbonylovými skupinami glycinových zbytků. Na C-konci proteinu se nachází sekvence důležitá pro sekreci proteinu [36].



Obr. 1.6 Krystalové struktury RTX domén (převzato a upraveno z [27],35])

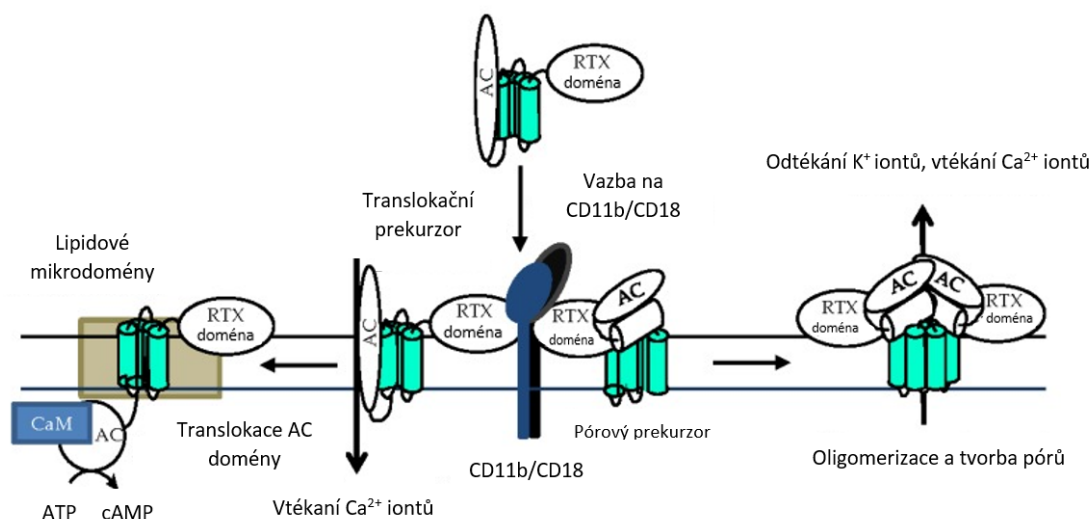
- a) Krystalová struktura RTX bloků I-III s navázanými protilátkami M2B10, M1H5 a sekrečním signálem. Bloky jsou tvořeny nonapeptidovými sekvencemi, na které se vážou žlutě znázorněné Ca^{2+} ionty.
- b) Krystalová struktura bloku IV a V. Žluté kuličky značí Ca^{2+} ionty, C-koncová terminální část je značena oranžově a hnědě a modře a růžově jsou značeny β -struktury a α -helixy.

1.4.3 Mechanismus účinku adenylát cyklázového toxinu na membránu myeloidních buněk

Poté, co vápenaté ionty způsobí konformační změnu proteinu, je protein schopen se vázat na receptor CD11b/CD18 na myeloidních buňkách [14]. Přes membrány buněk může protein pronikat ve dvou různých konformacích (Obr. 1.7), jež každá má svoji funkci. Translokační prekurzor má za úkol přenést AC doménu přes lipidovou dvojvrstvu do buněk, což vyvolá příliv Ca^{2+} iontů do cytosolu buněk. Po translokaci přes membránu hostitele se na AC doménu váže eukaryotní protein kalmodulin v poměru 1:1. Díky této vazbě je katalytická aktivita AC domény ~100-1000 násobně větší. Následně dojde k nekontrolovatelné tvorbě nejen cAMP, ale také cUMP a cCMP [37]. Pórový prekurzor proteinu oligomerizuje membránu myeloidních buněk a vyvolává tvorbu kation-selektivních pórů [38]. Průměr kation-selektivních pórů v buněčné membráně je přibližně

0,6-0,8 nm, mají krátkou životnost a pronikají jimi pouze malé kationty [39]. Po vložení toxinu do buňky začnou do intracelulárního prostoru proudit Ca^{2+} ionty a do extracelulárního prostoru K^+ ionty, což způsobí koloidně-osmotickou lyzi buňky [40].

Adenylát cyklázový toxin se může navázat na buňku bez receptoru. Dojde-li k translokaci proteinu pomocí AC domény do buňky bez receptoru, tak úlohu v tom hrají glutamátové zbytky schované v hydrofobní doméně proteinu [41].



Obr. 1.7 Působení CyaA na membránu myeloidních buněk (převzato a upraveno z [42])

Adenylát cyklázový toxin po navázání na CD11B/CD18 proniká přes membránu buněk ve dvou různých konformacích. Pórový precursor proteinu oligomerizuje membránu a vytváří v ní póry, kterými poté mohou proudit K^+ ionty do extracelulárního prostoru a Ca^{2+} ionty do intracelulárního prostoru, což následně způsobí koloidně-osmotickou lyzi buňky. Translokační precursor má za úkol dopravit AC doménu do buňky, což vyvolá příliv Ca^{2+} iontů do cytosolu buňky. Vazba AC domény na kalmodulin má za následek konverzi ATP na cAMP.

1.4.4 Vliv toxinu na makrofágy, monocyty a dendritické buňky

Na infekci bakterií *B. pertussis* reagují makrofágy, monocyty a dendritické buňky. Tyto fagocytující buňky stojí v první linii ochrany imunitního systému [43]. Pronikne-li toxin do buňky, tak jeho enzymatická aktivita znemožní veškeré baktericidní schopnosti fagocytů. Buňky fagocytů nejsou schopné chemotaxe, fagocytózy a mnoha dalších věcí, které by ochránily organismus před bakterií [44]. Při působení toxinů nemohou neutrofilny produkovat kyslíkové radikály a může být u nich ovlivněna i tvorba neutrofilní extracelulární pasti. Tato extracelulární past slouží k zachycení a eliminaci bakterií v organismu [45]. Jako další se ochrany proti bakteriím účastní monocyty. Tyto jaderné bílkoviny jsou po určité době v tkáni přeměněny na nejaderné makrofágy. U makrofágů

toxin inhibuje produkci oxidu dusnatého a někdy u nich může dojít i k apoptóze [45,46]. V dendritických buňkách CyaA inhibuje tvorbu cytokinů, konkrétně tvorbu interleuktinu 12. Tento signální protein se účastní imunitní odpovědi proti zánětu [47].

2 Cíl práce

- příprava plazmidových vektorů pro produkci proteinových konstruktů obsahující zkrácenou RTX doménu a zkrácenou acylační doménu
- exprese a purifikace proteinových konstruktů
- strukturní charakterizace proteinových konstruktů

3 Materiál a metody

3.1 Chemikálie

β -merkapt ethanol, Calbiochem, SRN.

Akrylamid. Serva, SRN.

Commassie Brilliant Blue R-250, Serva, SRN.

Dodecylsulfát sodný, Serva, SRN.

Ethanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Glycerol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Hovězí sérový albumin, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Chlorid sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Imidazol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Isopropanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Isopropyl β -D-thiogalaktopyranozid, Sigma-Aldrich, USA.

Kanamycin, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Močovina, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Peroxodisíran amonný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Tetramethylethylendiamin, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Tris(hydroxymethyl)aminoethan, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

3.1.1 Antibiotika

Kanamycin, Sigma-Aldrich s.r.o., USA

3.1.2 Chromatografický nosič

Ni Sepharose 6 Fast Flow, Sigma-Aldrich s.r.o., USA

3.1.3 Elektroforetické standardy

Lambda DNA marker, Thermo Fisher Scientific, USA

Page Ruler Unstained, Thermo Fisher Scientific, USA

3.1.4 Enzymy

Nhe I, New England Biolabs, USA

Nco I, New England Biolabs, USA

Hind III, New England Biolabs, USA

Pankreatická ribonukleáza, Fermentas International Inc., Kanada.

Q5 high-fidelity DNA polymeráza, New England Biolabs, USA

3.1.5 Kultivační media

LB medium (10 g Bacto-tryptone, 5 g kvasničný extrakt, 10 g chlorid sodný, 1000 ml dH₂O)

LB medium se sterilizuje autoklávováním 20 min při tlaku 12 MPa.

MDO medium (1 g dihydrogenfosforečnan sodný, 3 g hydrogenfosforečnan sodný, 2 g chlorid amonný, 0,5 g síran sodný, 10 mg thiamin, 20 mg kvasničný extrakt, 20 mg ethanol, 1000 ml deionizovaná voda)

Pomocí 5M hydroxidu sodného se upraví MDO medium na pH 8 a sterilizuje se autoklávováním 20 min při tlaku 12 MPa.

3.1.6 Bakteriální kmeny

E. coli XL-1 blue, Stratagene, USA

E. coli BL21λDE3, Stratagene, USA

3.1.7 Plazmidy

pET28b, Novogene Company Limited, UK

3.2 Laboratorní vybavení

Centrifuga MLW K80 Refrigerated Centrifuge,

Centrifuga Sorvall Lynx 4000 Centrifuge, Thermo scientific, USA

Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen, SRN

Digitální analytické váhy AB-104 S, Mettler Toledo, USA.

Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad, spol. s.r.o., USA

Inkubátor Innova 43-Inkubator Shaker Series, New Brunswick Scientific Co., Inc., USA

Mrazicí box (−80 °C), Jouan, Francie

Mrazicí box (−20 °C), Liebherr, Švýcarsko

T100 Thermal cycler, Bio-Rad, spol. s.r.o., USA

Sonikátor Misonix Ultrasonic liquid Processor, Delta labo, USA

Spektrometr Chirascan-plus, Applied Photophysics, USA

Spektrofotometr, Lightwave II, Biochrom Ltd., UK

Transluminátor G:BOX, Syngene, UK.

Vortex MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA.

Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad, USA

3.3 Metody

3.3.1 Příprava agarových misek pro kultivaci buněk *E.coli*

Z chladicího boxu o teplotě 4 °C byla vyjmuta zásobní láhev se sterilním LB agarem. Směs byla rozehřata v mikrovlnné troubě a po vychladnutí na teplotu 55 °C byl k LB agaru přidán kanamycin o koncentraci 60 µg·ml⁻¹. Směs byla sterilně přelita do Petriho misek a po ztuhnutí směsi byly LB agarové plotny uskladněny při teplotě 4 °C.

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Reakční směs o celkovém objemu 50 µl byla připravena do PCR mikrokumavek podle Tab. 3.1. Mikrokumavky byly umístěny do přístroje T100 Thermal cycler, který byl naprogramován podle Tab. 3.2.

Tab. 3.1 Objemy jednotlivých složek pro přípravu 50 µl vzorku pro PCR

Složky	objem (µl)
dH ₂ O	37,5
10 mM dNTP	1
10 µM Primer A	0,25
10 µM Primer B	0,25
Temlátová DNA	0,5
Q5 high-fidelity DNA polymeráza	0,5
5× Q5 reakční pufr	10

Tab 3.2 Schéma jednoho cyklu PCR

	teplota (°C)	čas (s)
1.	98	30
2.	58	20
3.	72	20

Seznam primerů:

Primer A: 5' - GCCATCATCATCATCATCACGAAAACCTGTACTTCCAGGG -3'

Primer B: 5' - TCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTAGGGGTCCGGAT -3'

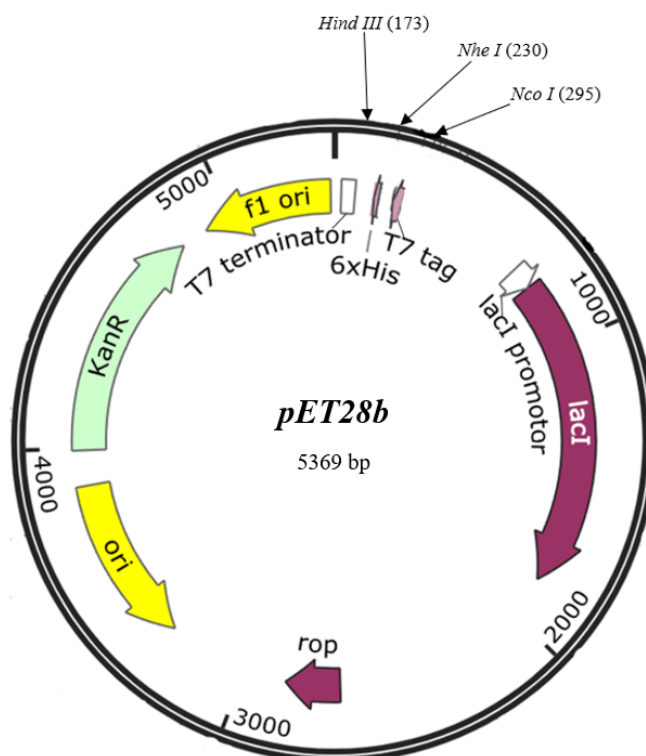
3.3.3 Restrikční štěpení plazmidu

Purifikovaný plazmid *pET28b* (Obr. 3.1) byl získán pro tuto práci z Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AV ČR.

Pro štěpení vektoru *pET28b* byl purifikovaný plazmid inkubován 2 h ve vodní lázni o teplotě 37 °C v přítomnosti restrikčního enzymu *Nhe I* podle Tab 3.3.

Tab. 3.3 Objemy jednotlivých složek pro restrikční štěpení plazmidu

Složky	objem (μl)
dH ₂ O	25
Plazmid <i>pET28b</i>	10
<i>Nhe I</i>	1
10x Cut Smart pufr	4



Obr. 3.1 Mapa plazmidu *pET28b* (převzato a upraveno z [48])

ori: počátek replikace DNA (3284-3872), KanR: Gen pro rezistenci na kanamycin (3994-4809), f1 ori: počátek replikace bakteriofága (4902-5357), T7 terminator: terminátor pro T7 RNA polymerázu (26-73), 6×His: 6× histidinová kotva (140-157), T7 tag: Místo pro navázání T7 kapsidového proteinu (206-238), lacI promotor (694-771), lacI: *lac* represor (772-1854)

3.3.4 Elektroforéza v agarosovém gelu

Zásobní roztok pro agarosovou elektroforézu byl připraven v laboratoři podle Tab. 3.4. Směs byla uvedena do varu a po vychladnutí na 55 °C byl zásobní roztok přelit do vaničky. Do vaničky byl poté přidán hřebínek pro vytvoření jamek pro vzorky a roztok byl ponechán ztuhnout. Z gelu byl odstraněn hřebínek a vanička zalita TBE pufrem (pH 8,0, 89 mM Tris, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA). Následně byly připraveny DNA vzorky smícháním 4 µl DNA s 1 µl nanášecího pufru [0,03 % (w/v) bromfenolová modř, 0,03 % (w/v) xylenolová modř, 40 % (w/v) glycerol] a poté byly jednotlivé DNA vzorky nanášeny společně se standardem (Lambda DNA marker) do jednotlivých jamek. Elektroforéza probíhala 45 minut při konstantním napětí 100 V. Pro následné vyhodnocení elektroforézy byl použit UV transiluminátor.

Tab. 3.4 Složení 0,6% a 1% agarosového gelu ve výsledném objemu 400 ml

hmotnostní zlomek agarosy (%)	objem TBE pufru (ml)	objem ethidium bromidu (µl)	hmotnost agarosy (g)
0,6	400	14	2,4
1	400	14	4

3.3.5 Purifikace DNA fragmentů z gelu

Po skončení agarosové elektroforézy byla DNA v gelu vizualizována pomocí UV transiluminátoru. Proužky obsahující fragmenty DNA byly vyříznuty z gelu pomocí skalpelu a DNA byla purifikována pomocí sady Column DNA Lego Kit od firmy Top-Bio s.r.o. Vyříznutý proužek agarosy obsahující DNA byl rozpuštěn v 1 ml DNA vazebném pufru. Na vývěvu byla nasazena 800 µl kolona, na níž byl nanášen roztok obsahující rozpuštěnou agarosu a DNA. DNA byla zachycena na matici kolony a poté byla kolona promyta 1 ml DNA promývacího pufru, který odstraní nečistoty. Kolona byla vložena do čisté mikrokumavky a následnou centrifugací, která probíhala po dobu 60 s, při teplotě 25 °C a při tíhovém zrychlení 21130 g, byl odstraněn DNA promývací pufr. Kolona byla vložena do nové mikrokumavky a na kolonu bylo nanášeno 20 µl destilované vody. DNA byla poté eluována centrifugací, která probíhala po dobu 60 s, při

teplotě 25 °C a při tíhovém zrychlení 21130 g. Purifikovaná DNA byla uskladněna v mrazicím boxu při teplotě –20 °C.

3.3.6 Klonování pomocí restriční štěpení bez endonukleáz (Gibson cloning)

Spojování DNA fragmentů je založené na homologní rekombinaci DNA úseků. Reakce probíhá za konstantní teploty 55 °C za přítomnosti tří enzymů (*T5 exonukleáza*, *Taq DNA ligáza*, *fúzní polymeráza*)[49].

K 7,5 µl reakční směsi [ISO pufr (složení Tab. 3.5), 10 U/µl *T5 exonukleáza*, 2 U/µl *fúzní polymeráza*, 100 mM *Taq polymeráza*, dH₂O] připravené v laboratoři byly přidány 2 µl purifikovaného štěpeného fragmentu a 3 µl PCR produktu. Reakční směs byla inkubována ve vodní lázni při teplotě 55 °C po dobu 1 h a poté byla směs transformována do bakteriálních buněk (viz kap. 3.3.7)

Tab. 3.5 Složení ISO pufru

Složky	Množství
1 M Tris-HCl pH 7,5	3 ml
2 M MgCl ₂	150 µl
100 mM dGTP	60 µl
100 mM dATP	60 µl
100 mM dTTP	60 µl
100 mM dCTP	60 µl
1 M DTT	300 µl
100 mM NAD	300 µl
dH ₂ O	6 ml
PEG-800	1,5 g

3.3.7 Transformace plazmidové DNA do bakterií

Superkompetentní bakteriální buňky *E. coli XL-1 blue* byly vyjmuty z mrazicího boxu (–80 °C) a vytemperovány na teplotu 20 °C. Transformace plazmidové DNA do bakterií byla provedena pomocí teplotního šoku. Buňky byly smíchány se směsí po

Gibsonově reakci (viz kap. 3.3.6) a inkubovány po dobu 10 min při teplotě 4 °C. Následně byly buňky inkubovány ve vodní lázni po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Poté byly buňky inkubovány po dobu 2 min při teplotě 4 °C. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 900 µl LB média. Bakteriální suspenze byla inkubována ve vodní lázni po dobu 1 h při teplotě 37 °C. Poté byla bakteriální suspenze centrifugována po dobu 60 s, při teplotě 25 °C a při tíhovém zrychlení 21130 g. Bakterie v peletu byly resuspendovány se 100 µl LB pufrem (supernatant) a poté byla směs rozetřena po LB agarové plotně obsahující kanamycin o koncentraci 60 µg·ml⁻¹. Miska s rozetřenými bakteriemi byla inkubována po dobu 16 h při teplotě 37 °C.

3.3.8 Izolace plazmidové DNA

Pro získání plazmidu byla jednotlivá kolonie vypíchnuta z agarové plotny a inkubována 16 h při teplotě 37 °C za stálého míchání ve 2 ml LB media obsahující kanamycin o koncentraci 60 µg·ml⁻¹. Bakteriální kultura byla centrifugována po dobu 60 s, při teplotě 25 °C a při tíhovém zrychlení 21130 g. Pomocí centrifugace bylo odstraněno růstové medium a k bakteriálnímu peletu bylo poté přidáno 100 µl roztoku I (50 mM glukosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl). Resuspendované bakterie byly inkubovány po dobu 5 min při teplotě 20 °C. Bakteriální suspenze byla následně lyzována pomocí 200 µl roztoku II [0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS] po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. K bakteriálnímu lyzátu bylo poté přidáno 150 µl roztoku III (60 ml 5 M octan draselný, 11,5 ml kyselina octová, 28,5 ml dH₂O), který precipituje všechny materiál. Precipitovaný materiál byl poté centrifugován po dobu 10 min, při teplotě 4 °C, při tíhovém zrychlení 21130 g. Po centrifugaci byl opatrně odebrán supernatant (400 µl) a DNA v roztoku byla sražena pomocí isopropanolu (400 µl). Sražená DNA byla centrifugována po dobu 10 min, při teplotě 4 °C a při tíhovém zrychlení 21130 g. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a pelet, obsahující vysráženou DNA, byl opláchnut 1 ml 70% (w/v) ethanolu a poté ponechán vyschnout. K peletu bylo poté přidáno 40 µl roztoku TE (pH 8, 10 nM Tris, 1 mM EDTA) s *pankreatickou RNAsou* o koncentraci 20 µg·ml⁻¹. Roztok byl mírně zamíchán a ponechán inkubovat ve vodní lázni po dobu 30 min při teplotě 70 °C.

3.3.9 Polyakrylamidová elektroforéza

Polyakrylamidová elektroforéza byla provedena v aparatuře Mini-PROTEAN Tetra Cell od firmy Bio-Rad, spol. s.r.o. podle standartního protokolu.

3.3.9.1 Příprava polyakrylamidového gelu

Podle Tab. 3.6 byl připraven roztok pro přípravu separačního gelu. Roztok byl nalit mezi dvě skla a hladina roztoku byla poté převrstvena pomocí destilované vody. Polymerací akrylamidu se vytvořil separační gel a destilovaná voda byla následně odsáta filtračním papírem.

Podle Tab. 3.6 byl připraven roztok pro přípravu zaostřovacího gelu, který byl následně nanesen mezi dvě skla na separační gel. Mezi skla byl poté vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro vzorky, který byl po polymeraci gelu odstraněn.

Tabulka 3.6 Objemy složek pro přípravu 12,5% polyakrylamidového gelu

Polyakrylamidová elektroforéza ve 12,5 % gelu		
Složky	Separací gel (12,5 %)	Zaostřovací gel (4 %)
Akrylamid 30 %	2,07 ml	0,266 ml
dH ₂ O	0,98 ml	1,23 ml
TRIS 1M pH 8,8	1,87 ml	-
TRIS 1M pH 6,8	-	200 µl
SDS 10 %	50 µl	60 µl
APS 25 %	12,5 µl	20 µl
TEMED	12,5 µl	5 µl

3.3.9.2 Polyakrylamidová elektroforéza

Sklička s gelem byla přemístěna do elektroforetické aparatury, která byla poté zalita Tris-glycinovým pufrem pH 8,3 [25 mM Tris, 250 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS]. Proteinové vzorky na elektroforézu byly připraveny smícháním 4 µl vzorku proteinu a 1 µl vzorkového pufru pH 6,8 [50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 10 % (v/v) glycerol] a poté byla směs společně se standardem (Page Ruler Unstained) nanesena do jednotlivých jamek. Elektroforetická separace probíhala při konstantním proudu 30 mA po dobu 50 min. Po skončení elektroforézy byl gel vyňat z aparatury a inkubován v barvicím roztoku [40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,1 % (w/v) Commassie Brilliant Blue] po dobu

30 min za stálého míchání. Poté byl gel opláchnut destilovanou vodou a inkubován v odbarvovacím roztoku [40 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová] přes noc za stálého míchání.

3.3.10 Exprese rekombinantního proteinu

Z agarové plotny byly přemístěny bakteriální kolonie pomocí kličky do 50 ml LB media obsahující kanamycin o koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a poté byla bakteriální kultura inkubována 4 h při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého míchání. Poté byla bakteriální kultura přelita do 500 ml MDO media obsahující kanamycin o koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bakteriální kultura byla kultivována při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého míchání při tíhovém zrychlení 112 g . Každých 30 minut probíhala kontrola optické hustoty, kdy byl měřen růst bakteriální biomasy. Vždy byl odebrán 1 ml bakteriální kultury do plastové kyvety a pomocí spektrofotometru byla změřena její absorbance při vlnové délce 600 nm. Poté, co byla dosažena hodnota optické hustoty 0,3, byla snížena teplota inkubace bakterií na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro indukci exprese proteinu bylo k bakteriální kultuře po 30 min inkubace přidáno 0,5mM IPTG. Bakteriální kultura byla poté inkubována 16 h při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za stálého míchání při tíhovém zrychlení 112 g . Po skončení kultivace byla bakteriální kultura centrifugována po dobu 30 min, při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při tíhovém zrychlení 1730 g . Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 50 ml pufru X (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). Bakteriální suspenze byla poté centrifugována po dobu 10 min, při teplotě $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při tíhovém zrychlení 2996 g . Supernatant byl odstraněn a bakteriální suspenze byla uskladněna při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.11 Purifikace rekombinantního proteinu

3.3.11.1 Sonikace

Z mrazícího boxu ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) byla vyjmuta zkumavka s bakteriální suspenzí, která byla vytemperována na pokojovou teplotu. K suspenzi bylo poté přidáno 35 ml pufru X (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl). Bakteriální suspenze byla sonikována 10 min na ledu při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomocí přístroje Misonix ultrasonic liquid processor. Sonikace byla provedena pomocí pulsů, které trvaly 15 sekund s minutovou odmlkou.

3.3.11.2 Příprava inkluzních tělísek

Bakteriální lyzát byl centrifugován po dobu 5 min, při teplotě 4 °C a při tíhovém zrychlení 3000 g. Supernatant byl poté centrifugován po dobu 30 min, při teplotě 4 °C a při tíhovém zrychlení 41657 g. Z kyvety byl odstraněn supernatant a inkluzní tělíska byla resuspendována ve 4 ml roztoku (50 mM Tris-HCl pH 8, 8 M močovina). Močovinový extrakt byl centrifugován po dobu 30 min, při teplotě 4 °C a při tíhovém zrychlení 41657 g. Po centrifugaci byl močovinový extrakt uskladněn při -20 °C.

3.3.11.3 Niklová chelatační chromatografie

Chromatografická kolona Econo-pac od firmy Bio-Rad, spol. s.r.o. o objemu 10 ml byla naplněna 0,5 ml chromatografického nosiče Ni Sepharose 6 Fast Flow. Naplněná kolona byla poté ekvilibrována 4 ml roztoku (50 mM Tris-HCl pH 8, 8 M močovina). Močovinový extrakt byl nanesen na chromatografickou kolonu a poté, co močovinový extrakt prošel kolonou, byla kolona promyta 5 ml roztoku (50 mM pufru Tris-HCl pH 8, 8 M močovina). Protein zachycený na nosiči pomocí histidinové kotvy byl poté eluován pomocí 50mM pufru Tris pH 8 s 25mM, 50mM, 75mM, 0,1M, 0,15M imidazolem a sbírán do 1,5ml frakcí.

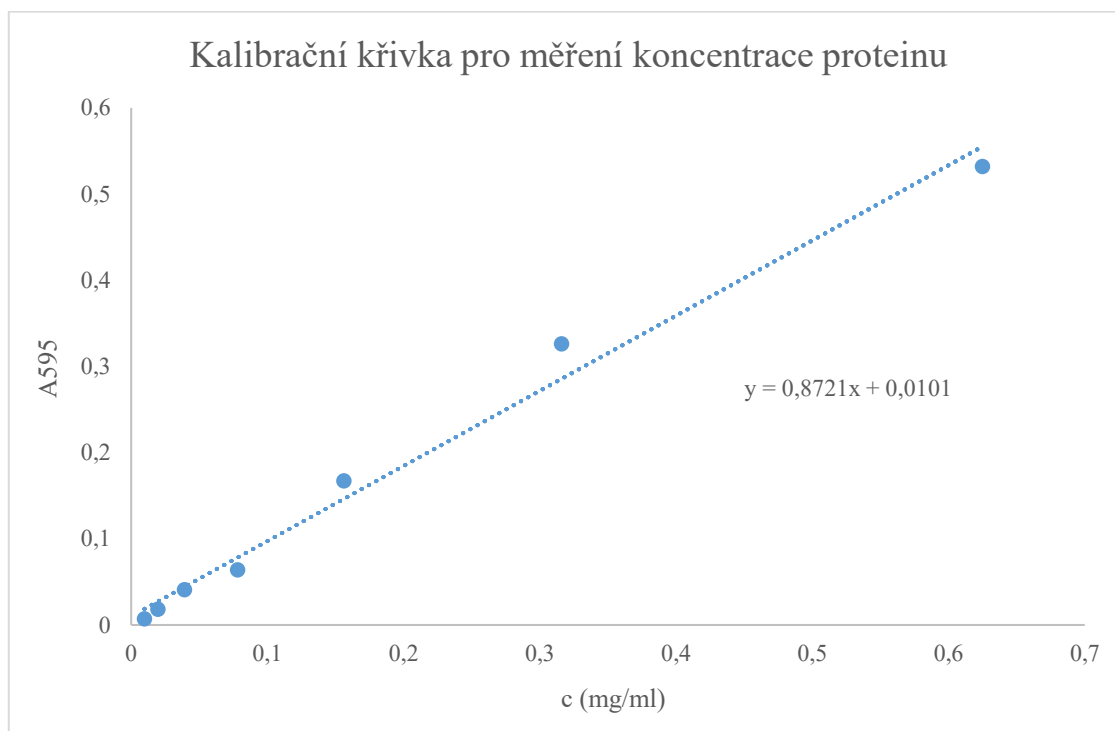
3.3.12 Renaturace proteinu

Do dialyzačního střeva byly přelity 1,5ml vzorky proteinu eluovaného 25mM, 50mM, 75mM koncentrací imidazolu. Protein byl poté dialyzován ve 2 l dialyzačního pufru X (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) přes noc při teplotě 4 °C.

3.3.13 Metoda Bradfordové

Pro stanovení koncentrace proteinu ve vzorku byl připraven 1 ml BSA standardu o koncentraci 10 mg·ml⁻¹. Pomocí dvojkové ředící řady bylo připraveno sedm 100μl vzorků BSA standardu. Pro spektrofotometrickou analýzu bylo připraveno sedm vzorků obsahujících 900 μl činidla Bradfordové [0,01 % (w/v) Bradfordové Commassie Brilliant blue R250, 4,7 % (v/v) ethanol, 8,7 % (v/v) H₃PO₄] a 100 μl vzorku ředěného BSA standardu. Absorbance připravených vzorků byla měřena při vlnové délce 595 nm.

Hodnoty absorbancí byly poté použity pro sestavení kalibrační křivky zobrazené na Obr. 3.2.



Obr. 3.2 Kalibrační křivka pro měření koncentrace proteinu

3.3.14 Limitovaná proteolýza

Do mikroskopavek bylo připraveno šest 100 μ l alikvotů proteinu o stejné koncentraci. K alikvotům proteinu byl poté přidáván určitý objem zásobního roztoku *trypsinu* o koncentraci 2 mg \cdot ml⁻¹, který byl vypočítán podle poměru hmotnostních koncentrací proteinu a *trypsinu* (Tab. 3.7). Reakce byly zastaveny po 1 h přidáním 100 μ l vzorkového pufru.

Tab 3.7. Poměr hmotnostních koncentrací ve vzorku proteasy *trypsin* ku proteinu

Poměr hmotnostních koncentrací proteasy <i>trypsin</i> ku proteinu
1:100
1:500
1:1000
1:2500
1:5000
1:10000

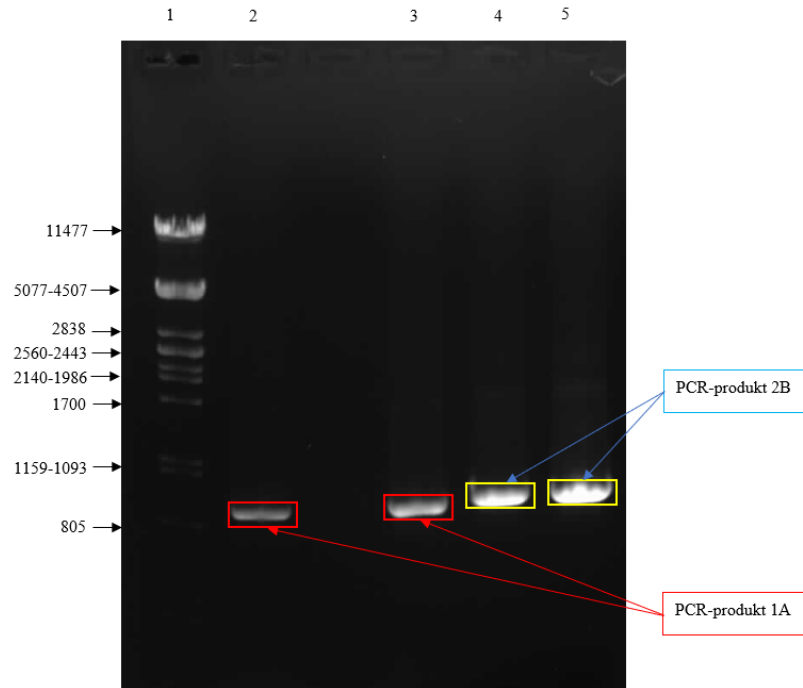
3.3.15 Spektroskopie cirkulárního dichroismu

Vzorky proteinů o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ byly smíchány s 5mM Tris-HCl (pH 7,4) a 50mM NaCl. Poté byly vzorky titrovány 500 μM , 1000 μM , 1500 μM a 2000 μM CaCl_2 . Spektra cirkulárního dichroismu proteinů byla poté měřena pomocí přístroje Chirascan-plus (Applied Photophysics, USA) ve vzdálené UV oblasti při teplotě 25 °C ve skleněné kyvetě o optické délce dráhy 10 mm při rychlosti skenování 1 nm/s. Získaná spektra byla poté odečtena od spekter pufrů.

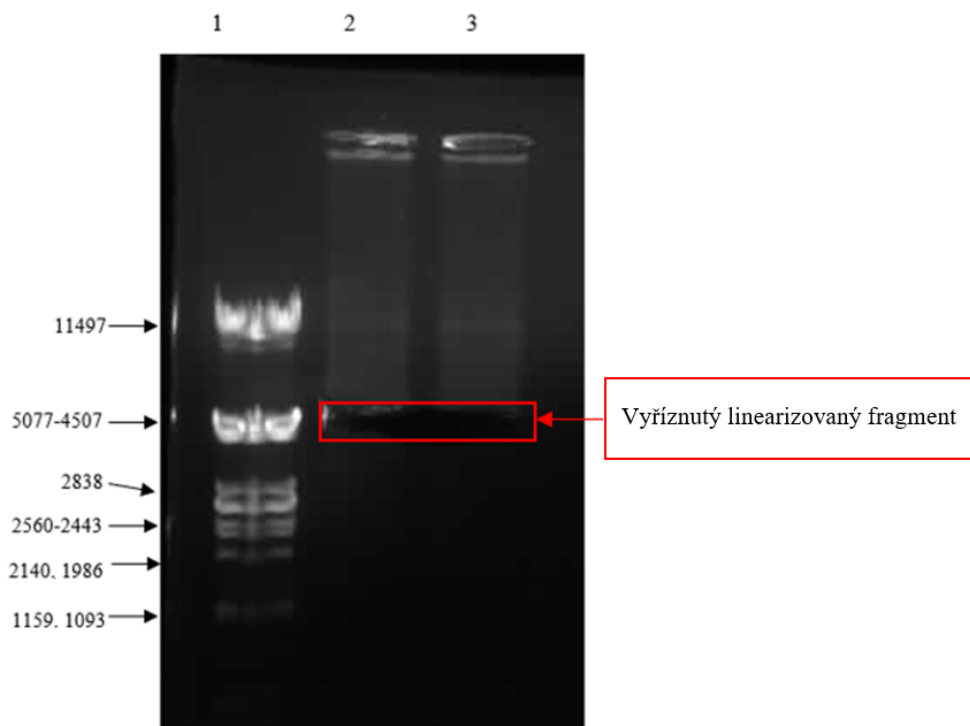
4 Výsledky

4.1 Návrh Konstruktů 1 a Konstruktů 2

Struktura acylační domény CyaA je zatím neznámá na rozdíl od RTX domény. V článku z roku 2016 autoři Bumba a spol. odhalili, že CyaA je sbalován od C-konce k N-konci a že pro správné sbalení proteinu jsou důležité Ca^{2+} ionty, které se vážou na repetice nacházející se na C-konci CyaA [50]. Z tohoto důvodu byly pro strukturní analýzu části acylační domény připraveny dva Konstrukty, které obsahovali C-konec s částí bloku V (1562-1681). Jelikož by bylo zbytečné analyzovat acylační doménu s celou RTX doménou a C-koncem, byl segment 1562-1681 napojen u Konstruktů 1 na segment 881-1038 a u Konstruktů 2 na segment 881-1047 (Obr. 4.1). Dva Konstrukty lišící se o jednu RTX repetici byly sestrojeny z toho důvodu, jelikož nebylo možné, kvůli delecii velké části RTX domény, odhadnout prostorovou orientaci β -válece pro napojení segmentu 1562-1681 na část bloku I.

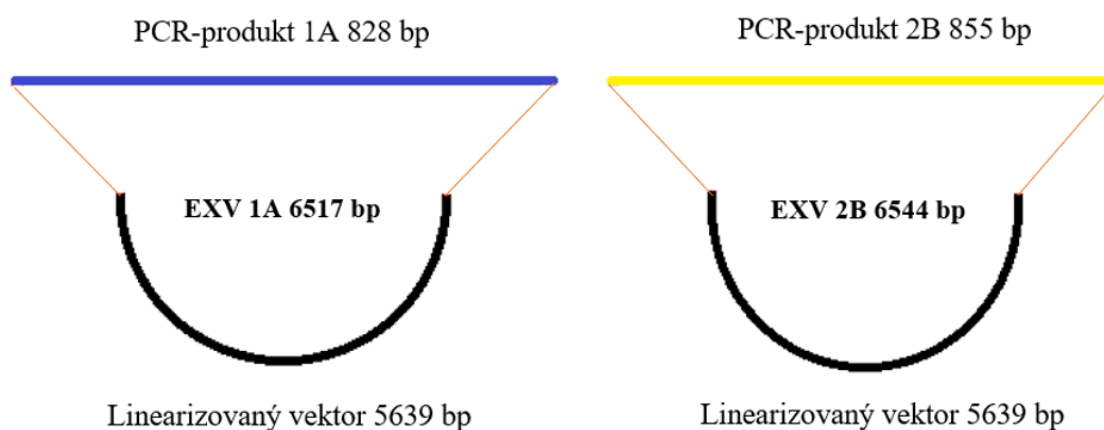


Obr. 4.2 Elektroforéza v 1% agarosovém gelu znázorňující separaci dna fragmentů vzniklých po PCR
 1. dráha: standard, 2. a 3. dráha: PCR-produkt 1A o velikosti 828 bp, 4. a 5. dráha: PCR-produkt 2B o velikosti 855 bp



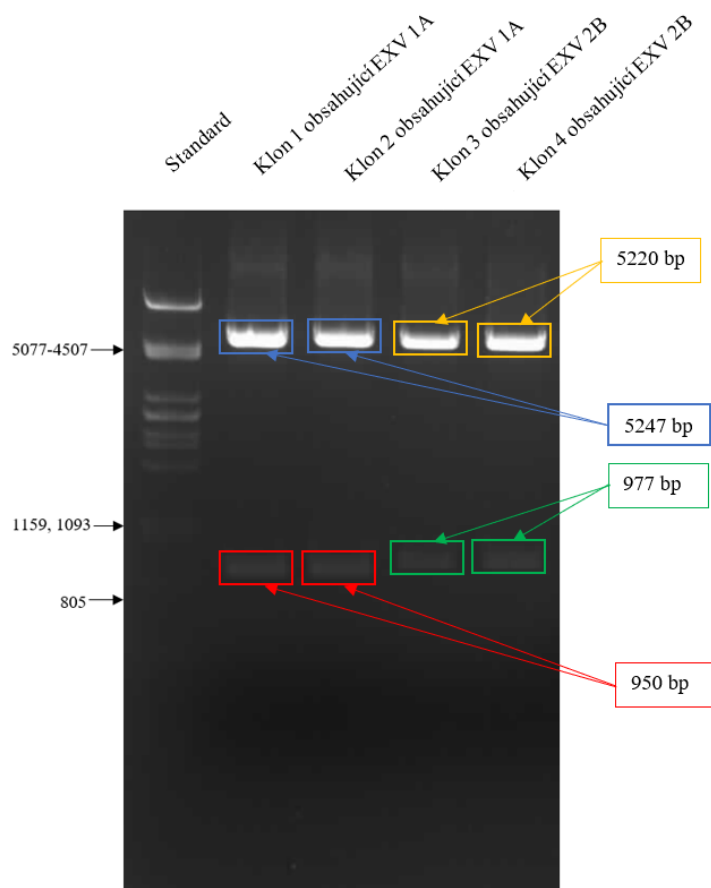
Obr. 4.3 Elektroforéza v 0,6% agarosovém gelu znázorňující separaci produktů po restričním štěpení plazmidu *pET28b* enzymem *Nhe I*
 1. dráha: standard, 2. a 3. dráha: vyříznutý linearizovaný fragment o velikosti 5369 bp

PCR fragmenty byly nezávisle na sobě zaklonovány do linearizovaného vektoru pomocí reakce Gibsona (viz kap. 3.3.6). Na Obr. 4.4 se nachází schéma expresních vektorů vytvořených po reakci Gibsona, kdy EXV 1A má velikost 6517 bp a EXV 2A 6544 bp.

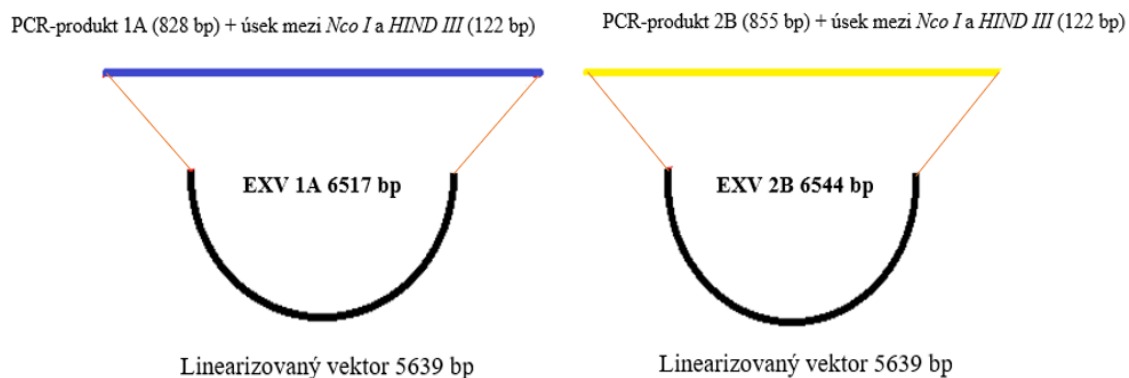


Obr. 4.4 Schéma expresních vektorů vytvořených po reakci Gibsona
EXV 1A 6517 bp = PCR-produkt 1A + Linearizovaný vektor, EXV 2B 6544 bp = PCR-produkt 2B + Linearizovaný vektor

Plazmidy byly poté nezávisle na sobě transformovány do super kompetentních buněk *E. coli XL-1 blue*, které byly poté inkubovány na dvou agarových plotnách s kanamycinem o koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ přes noc při teplotě $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Kultivace buněk v přítomnosti antibiotika zajistila selekci buněk obsahujících rekombinantní DNA od těch buněk, které ji neobsahují. Z každé agarové plotny byly izolovány dvě unikátní kolonie s unikátním plazmidem. Pomocí metody minipreparace byl poté z jednotlivých kolonií izolován plazmid pro restrikční štěpení. Pomocí restrikčního štěpení bylo analyzováno, zda jsou plazmidy správně složeny. Na Obr. 4.5 se nachází výsledek elektroforetické separace DNA fragmentů po restrikčním štěpení enzymy *Nco I* a *Hind III*. Výsledek agarosové elektroforézy potvrdil správné složení připravených expresních vektorů vznikem DNA fragmentů zobrazených na Obr. 4.6. U Klonu 1 a Klonu 2 obsahujících EXV 1A vznikly po restrikčním štěpení EXV 1A fragmenty (950 bp + 5247 bp), jejichž součet velikostí odpovídá velikosti EXV 1A (6517 bp). U Klonu 3 a Klonu 4 obsahujících EXV 2B vznikly po restrikčním štěpení EXV 2B fragmenty (977 bp + 5220 bp), jejichž součet velikostí odpovídá velikosti EXV 2 (6544 bp).



Obr. 4.5 Elektroforéza v 0,6% agarosovém gelu znázorňující separaci DNA fragmentů po restričním štěpení enzymy *Nco I* a *Hind III*

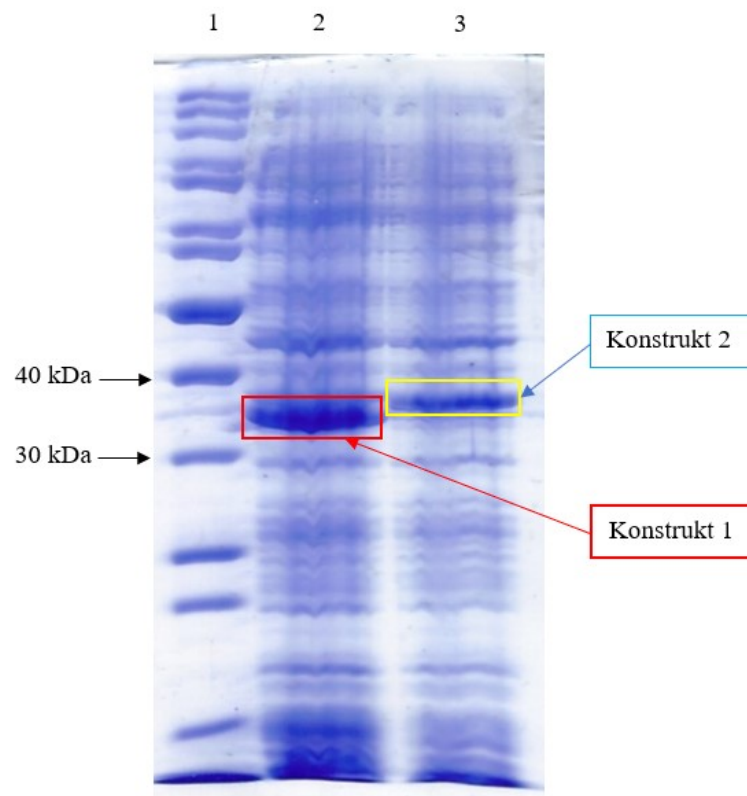


Obr. 4.6 Schéma fragmentů vzniklých po restričním štěpení EXV 1A a EXV 2B

Izolované plazmidy byly poté transformovány do buněk *E. coli BL21λDE3* (bakterie 1A, bakterie 2B), které byly inkubovány na dvou agarových plotnách s kanamycinem o koncentraci $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ přes noc při teplotě 37°C , díky čemuž byly získány jednotlivé kolonie pro následnou expresi Konstruktů 1 a Konstruktů 2.

4.3 Expresse Konstrukt 1 a Konstrukt 2

Z každé agarové plotny bylo izolováno deset transformovaných buněk *E. coli* *BL21λDE3* určených pro expresi Konstrukt 1 a Konstrukt 2. Expresse Konstrukt 1 a Konstrukt 2 byla provedena podle protokolu uvedeného v Materiálu a metodách (viz. kap. 3.3.10). Bakterie byly lyzovány a poté byly připraveny dva proteinové vzorky pro analýzu proteinového složení bakteriální biomasy pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu. Na Obr. 4.7 se nachází bakteriální lyzát z bakterií 1A, které exprimovaly protein o velikosti 35 kDa. Tento protein je v nadbytku oproti ostatním a odpovídá Konstrukt 1. Na Obr. 4.6 se dále nachází bakteriální lyzát z bakterií 2B a protein o velikosti 36 kDa. Tento protein je v nadbytku oproti ostatním proteinům a odpovídá Konstrukt 2.

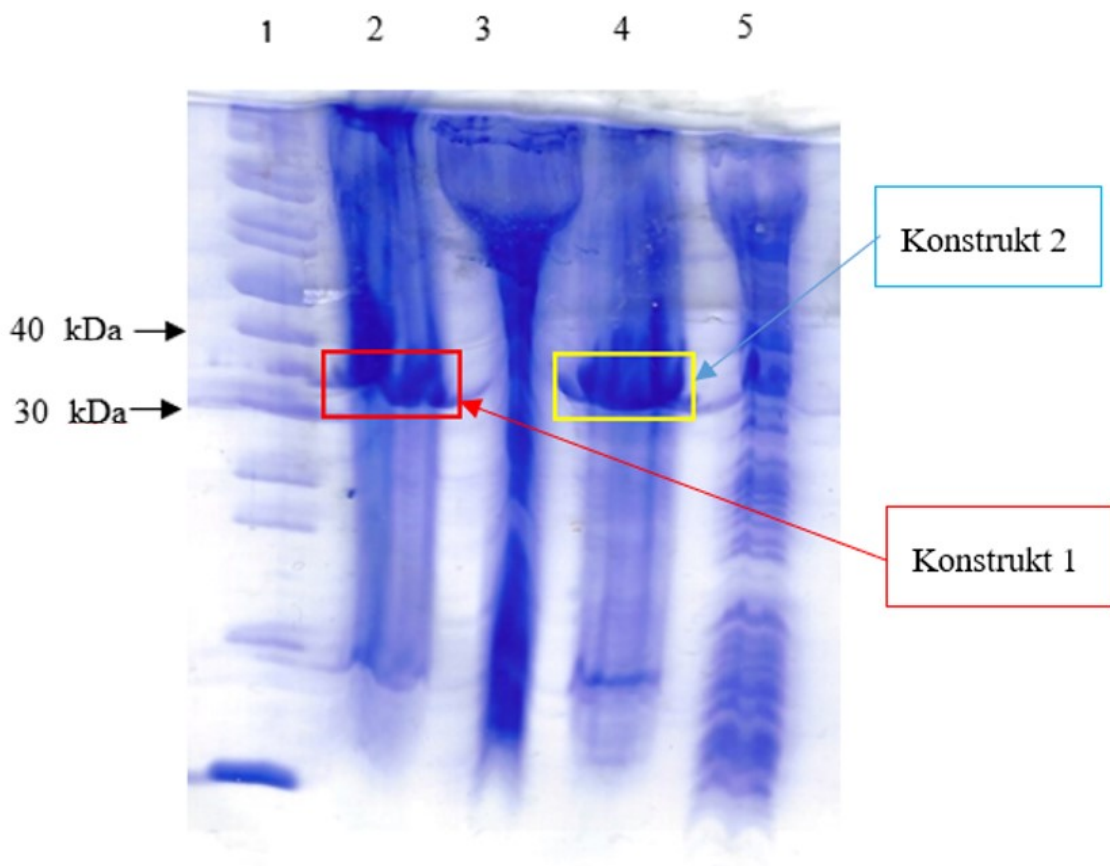


Obr. 4.7 Analýza proteinového složení bakteriální biomasy pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu

1. dráha: standard, 2. dráha: bakteriální lyzát z bakterií 1A, které exprimovaly Konstrukt 1 o velikosti 35 kDa, 3. dráha: bakteriální lyzát z bakterií 2B, které exprimovaly Konstrukt 2 o velikosti 36 kDa

4.4 Purifikace Konstruktů 1 a Konstruktů 2

Bakteriální lyzáty byly rozděleny na cytoplazmatickou rozpustnou frakci a membránovou nerozpustnou frakci. Pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu bylo poté analyzováno, ve které frakci se oba Konstrukty nachází. Na Obr. 4.8 se nachází rozpustná a nerozpustná frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 1A. V nerozpustné frakci se nachází v nadbytku protein o velikosti 35 kDa, který odpovídá Konstrukt 1. Na Obr. 4.8 se dále nachází rozpustná a nerozpustná frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 2B. V nerozpustné frakci se nachází v nadbytku protein o velikosti 36 kDa, který odpovídá Konstrukt 2.



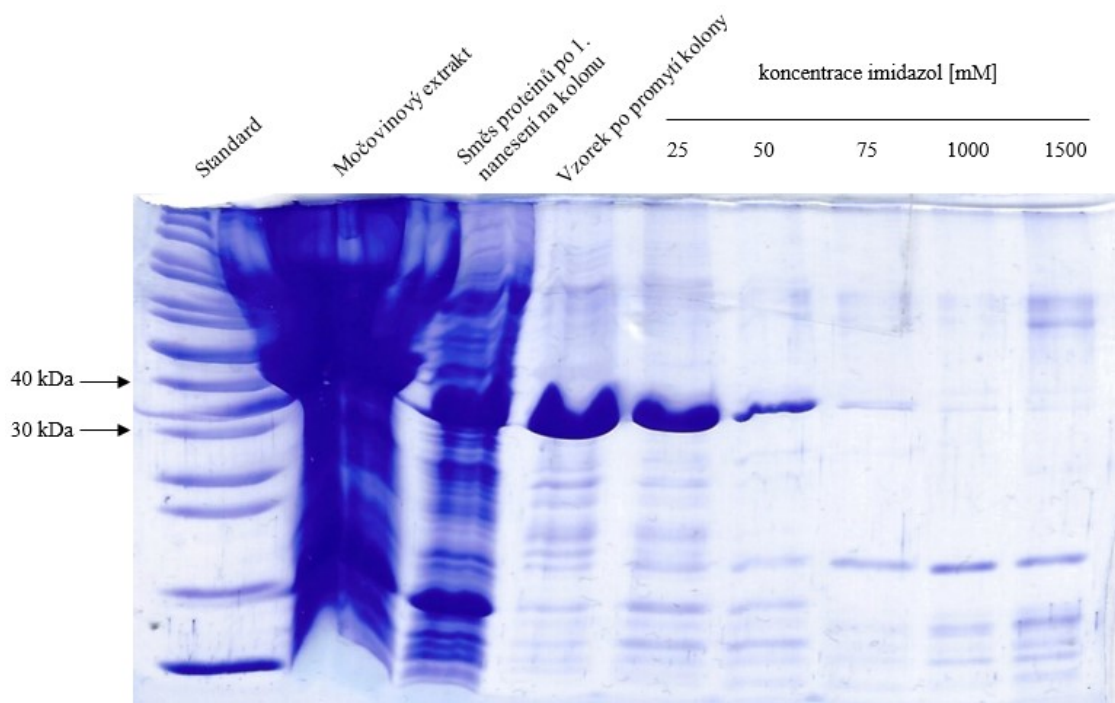
Obr. 4.8 Analýza proteinového složení cytoplazmatických rozpustných a membránových nerozpustných frakcí bakteriálních lyzátů pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu

1. dráha: standard, 2. dráha: membránová frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 1A obsahující Konstrukt 1 o velikosti 35 kDa, 3. dráha: cytoplazmatická frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 1A, 4. dráha: membránová frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 2B obsahující Konstrukt 2 o velikosti 36 kDa, 5. dráha: cytoplazmatická frakce bakteriálního lyzátu z bakterií 2B.

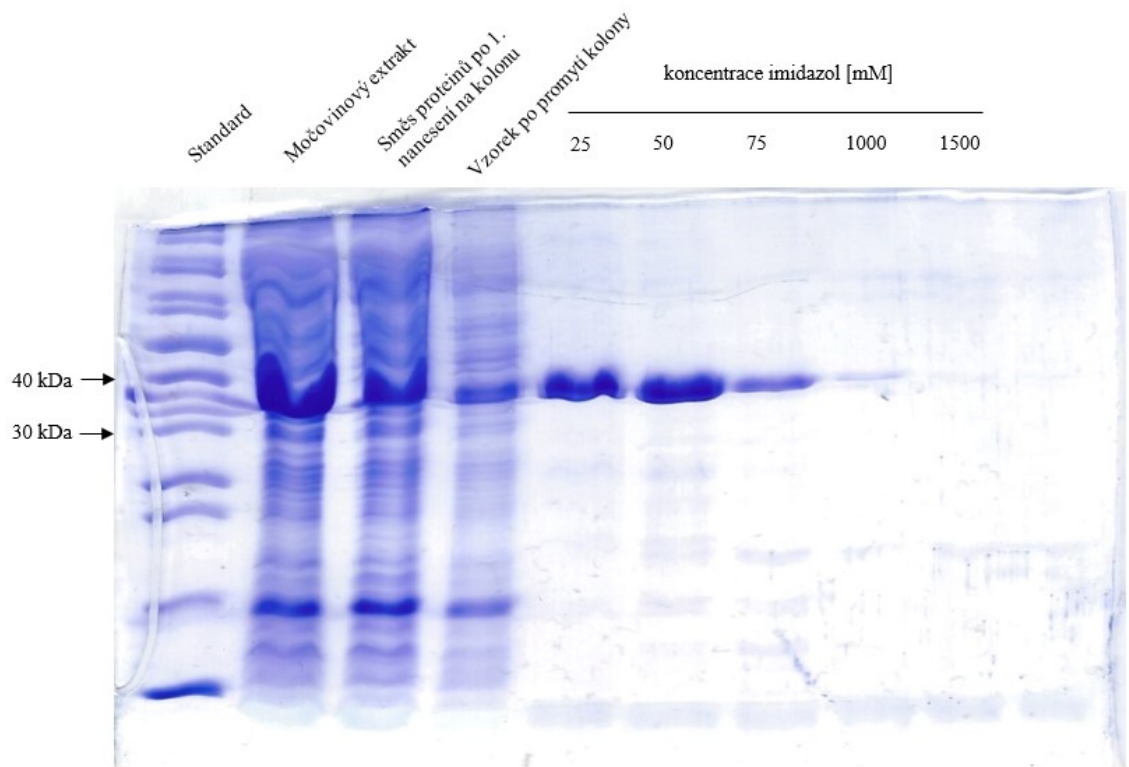
Konstrukt 1 a Konstrukt 2 byly purifikovány pomocí niklové chelatační chromatografie za denaturujících podmínek v 8M močovíně na chromatografické koloně Econo-pac od firmy Bio-Rad, spol. s.r.o. naplněné chromatografickým nosičem Ni Sepharose 6 Fast Flow. Na Obr. 4.9 se nachází analýza proteinového složení jednotlivých frakcí po purifikaci Konstrukt 1. Analýza byla provedena pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu. Na Obr. 4.9 se nachází Konstrukt 1, který byl po eluci 25mM, 50mM a 75mM imidazolem oddělen od nečistot. Ve frakcích po eluci 1000mM a 1500mM imidazolem již nebyl Konstrukt 1 zastoupen.

Na Obr. 4.10 se nachází analýza proteinového složení jednotlivých frakcí po purifikaci Konstrukt 2 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu. Na Obr. 4.10 se nachází Konstrukt 2, který byl po eluci 25mM, 50mM, 75mM a 1000mM imidazolem oddělen od nečistot. Ve frakci po eluci 1500mM imidazolem již nebyl Konstrukt 2 zastoupen.

Frakce Konstrukt 1 eluovaného 25mM, 50mM a 75mM imidazolem a frakce Konstrukt 2 eluovaného 25mM, 50mM, 75mM a 1000mM imidazolem byly převedeny do dialyzačního střeva. Oba Konstrukty byly poté dialyzovány, čímž byly oba proteiny převedeny do nativní konformace.



Obr. 4.9 Analýza proteinového složení jednotlivých frakcí po purifikaci Konstrukt 1 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu



Obr. 4.10 Analýza purifikace Konstrukt 2 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu

4.5 Limitovaná proteolýza

Na spektrofotometru Lightwave II byla změřena hodnota absorbance pro Konstrukt 1 0,680 a pro Konstrukt 2 0,544. Z kalibrační křivky standardu BSA stanovené pomocí analýzy Bradfordové byla vypočtena hmotnostní koncentrace Konstrukt 1 na $0,75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a Konstrukt 2 na $0,60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ke $100\mu\text{l}$ alikvotům Konstrukt 1 o koncentraci $0,75 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla přidávána proteasa *trypsin* podle Tab. 4.1 a ke $100\mu\text{l}$ alikvotům Konstrukt 2 o koncentraci $0,60 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla přidávána proteasa *trypsin* podle Tab. 4.2.

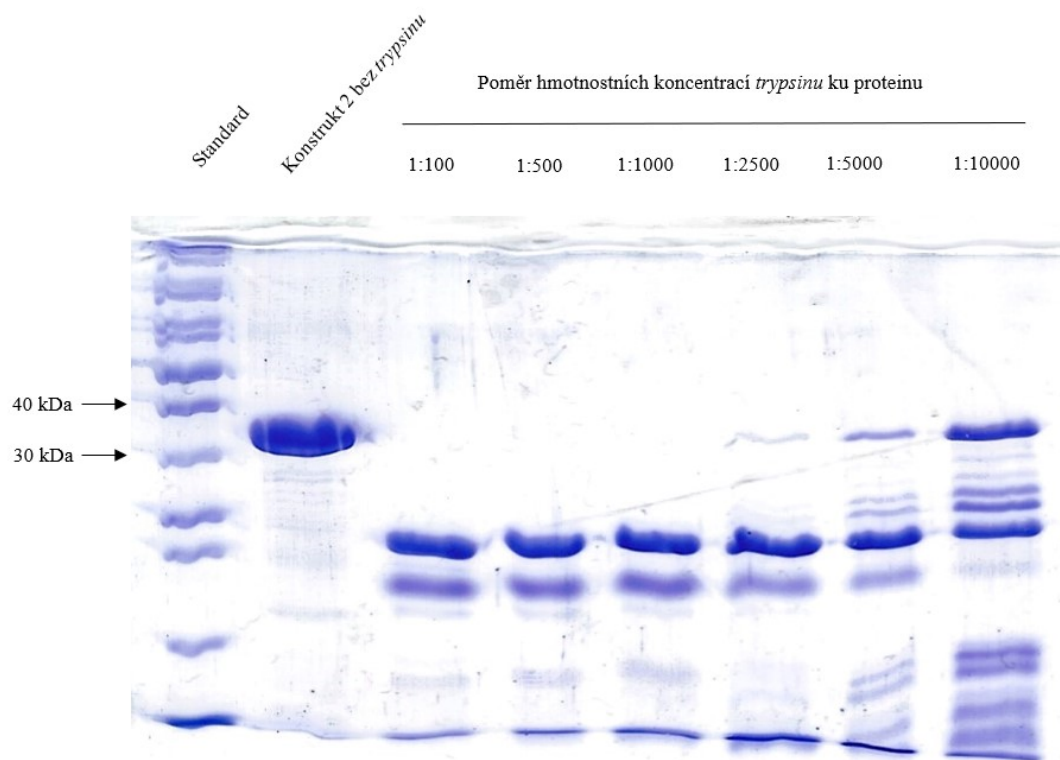
Tab. 4.1 Objemy složek pro limitovanou proteolýzu Konstrukt 1

Koncentrace <i>trypsinu</i> ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	0	200	200	20	20	20	2
Objem Konstrukt 1 (μl)	100	100	100	100	100	100	100
Objem <i>trypsinu</i> (μl)	0	3,75	0,75	3,75	1,4	0,75	3,75

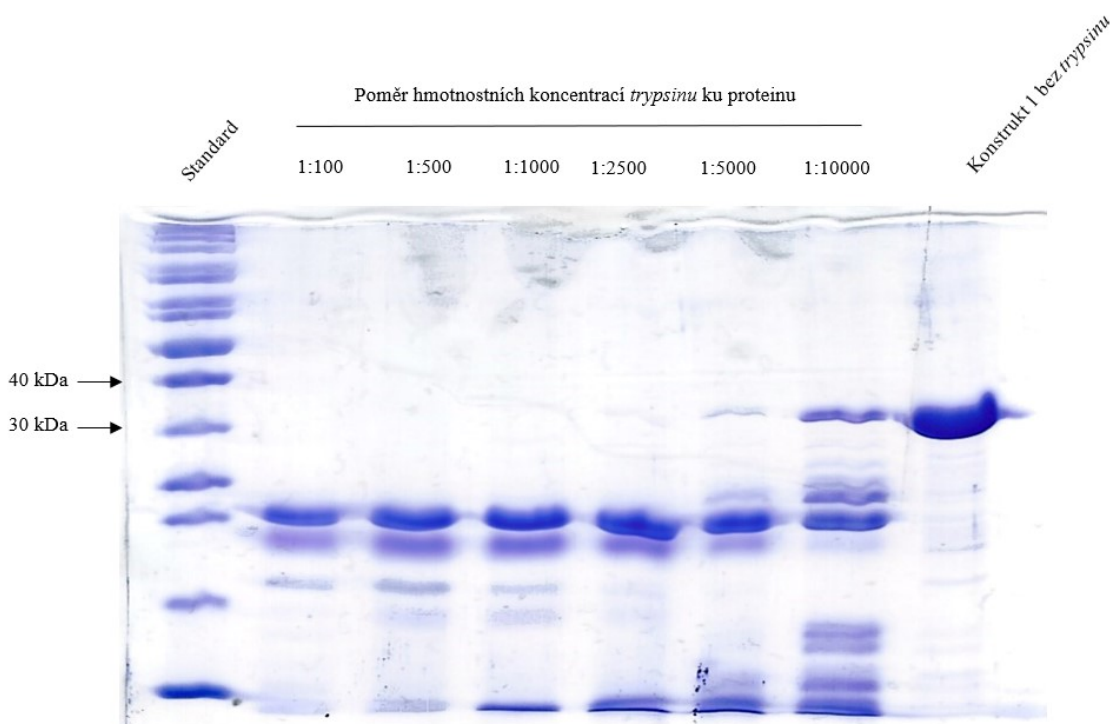
Tab. 4.2 Objemy složek pro limitovanou proteolýzu Konstrukt 2

Koncentrace <i>trypsinu</i> ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	0	200	200	20	20	20	2
Objem Konstrukt 1 (μl)	100	100	100	100	100	100	100
Objem <i>trypsinu</i> (μl)	0	3	0,6	3	1	0,6	3

Na Obr. 4.11 a 4.12 se nachází analýza proteinového složení po limitované proteolýze Konstrukt 1 a Konstrukt 2 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu. Při poměru hmotnostních koncentrací trypsinu ku proteinu 1:10000, 1:5000 a 1:2500 byl Konstrukt 2 štěpen *trypsinem* na vícero místech než Konstrukt 1, což potvrzuje zastoupení modrých proužků na polyakrylamidových gelech po porovnání Obr. 4.11 a 4.12. Při poměru hmotnostních koncentrací trypsinu ku proteinu 1:100, 1:500 a 1:1000 byly oba Konstrukty štěpeny trypsinem na méně místech než při poměru hmotnostních koncentrací trypsinu ku proteinu 1:10000, 1:5000 a 1:2500, avšak podle zastoupení modrých proužků na polyakrylamidových gelech na Obr. 4.11 a 4.12 stále platí, že Konstrukt 2 byl štěpen na vícero místech než Konstrukt 1.



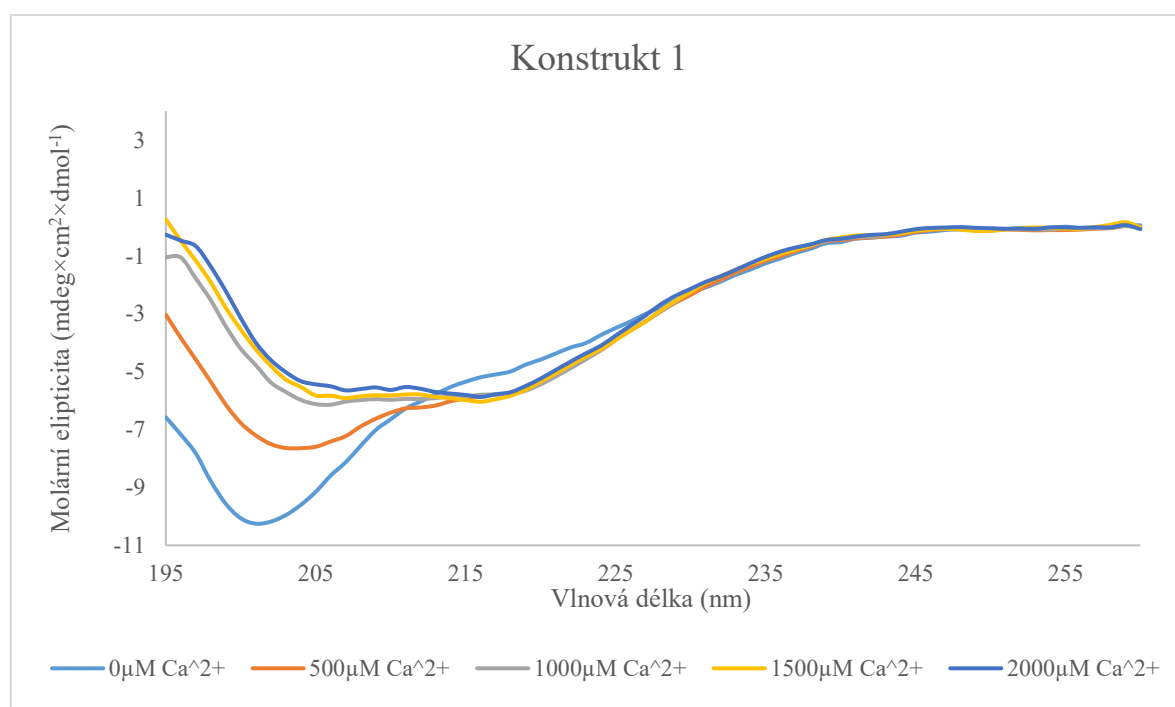
Obr. 4.11 Analýza proteinového složení po limitované proteolýze Konstrukt 1 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu



Obr. 4.12 Analýza proteinového složení po limitované proteolýze Konstrukt 2 pomocí elektroforézy ve 12,5% polyakrylamidovém gelu

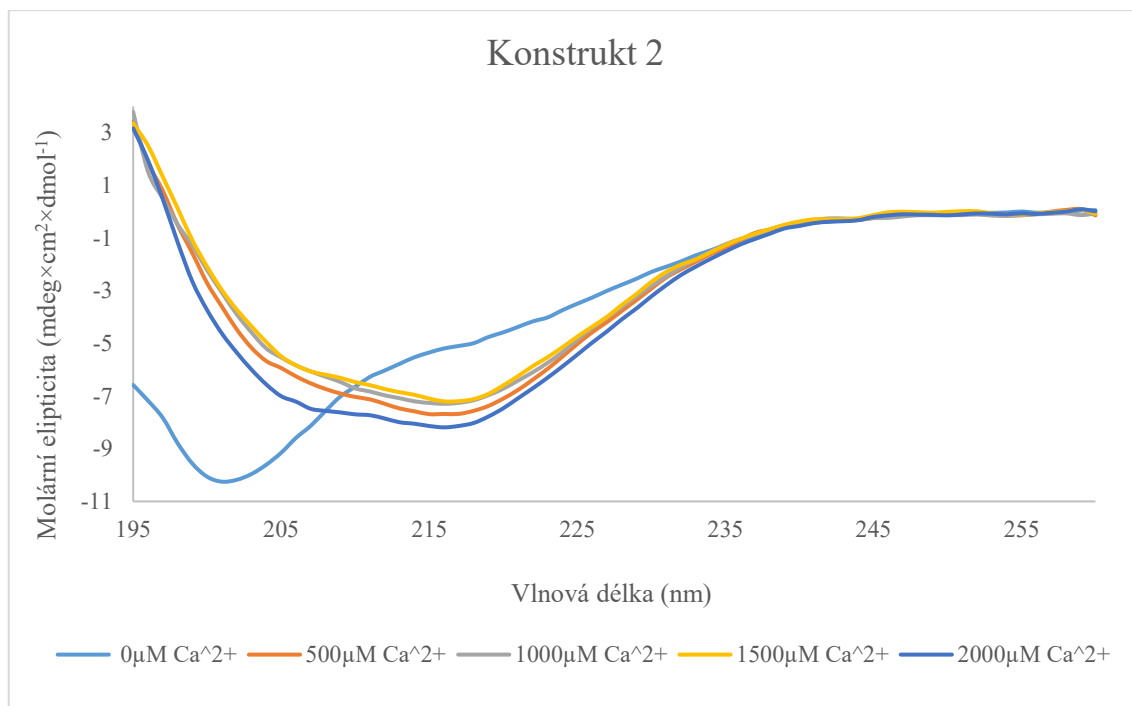
4.6 Spektroskopie cirkulárního dichroismu

Pomocí CD spektroskopie bylo sledováno strukturování Konstrukt 1 a Konstrukt 2 v závislosti na koncentraci Ca^{2+} iontů. Na Obr. 4.13 se nachází CD spektra Konstrukt 1 titrovaného 500 μM , 1000 μM , 1500 μM , 2000 μM koncentrací CaCl_2 . Konstrukt 1 byl sbalen při 1000 μM koncentraci Ca^{2+} iontů. Spektrum Konstrukt 1 je charakterizováno negativním pásem při vlnové délce 205 nm, které odpovídá α -helixu a negativním pásem při vlnové délce 218 nm, které odpovídá β -struktūře (Obr. 4.13).



Obr. 4.13 CD spektra Konstrukt 1 titrovaného 500 μM , 1000 μM , 1500 μM a 2000 μM koncentrací CaCl_2

Na Obr. 4.14 se nachází CD spektra Konstrukt 2 titrovaného 500 μM , 1000 μM , 1500 μM , 2000 μM koncentrací CaCl_2 . Konstrukt 2 byl sbalen při 500 μM koncentraci Ca^{2+} iontů. Spektrum Konstrukt 2 je charakterizováno negativním pásem při vlnové délce 205 nm, kde se nachází ramínko, které odpovídá α -helixu. Dále je spektrum Konstrukt 2 charakterizováno negativním pásem při vlnové délce 218 nm, které odpovídá β -struktūře (Obr. 4.14).



Obr. 4.14 CD spektra Konstrukt 2 titrovaného 500 μM , 1000 μM , 1500 μM a 2000 μM koncentrací CaCl_2

5 Diskuze

V rámci této bakalářské práce byly připraveny dva Konstrukty lišící se o jednu RTX repetici z důvodu nemožnosti přesně odhalit správnou orientaci β -válce pro napojení segmentu 1562-1681, který je důležitý pro správné sbalení proteinu. Účinnost sbalování proteinu díky tomuto segmentu byla ověřena v práci od autora Carlose Angela Espinosa-Vinalse a spol. (2021) [27]. Připravené Konstrukty byly poté použity pro strukturní charakterizaci části acylační domény, která byla provedena pomocí limitované proteolýzy a CD spektroskopie.

Pomocí limitované proteolýzy byla analyzována stabilita Konstruktů 1 a Konstruktů 2. Oba Konstrukty byly smíchány s *trypsinem* v různých poměrech a reakční směsi byly následně analyzovány pomocí polyakrylamidové elektroforézy. Ukázalo se, že i při nízké koncentraci trypsinu můžeme pozorovat štěpení Konstruktů 2 na větší počet fragmentů, než Konstruktů 1 (Obr. 4. 11, Obr. 4.12). Toto pozorování svědčí o větší stabilitě Konstruktů 1 ve srovnání s Konstruktem 2. Menší stabilita Konstruktů 2 by mohla být vyvolána jeho strukturou a absencí N-terminální části acylační domény se zbylými RTX bloky.

Zásadním úkolem bylo ověření správného sbalení Konstruktů. Předchozí studie ukázaly, že CyaA je sbalován od C-konce k N-konci a že ke správnému sbalení je potřeba dostatečná koncentrace Ca^{2+} iontů [50]. Indukovatelné sbalování Konstruktů 1 a Konstruktů 2 v přítomnosti Ca^{2+} iontů bylo analyzováno pomocí CD spektroskopie. CD spektra odhalila, že Konstrukt 2 byl strukturován při nižší koncentraci Ca^{2+} iontů než Konstrukt 1 (Obr. 4.13, Obr. 4.14). Tento fakt je způsoben tím, že segment 1562-1681 je lépe napojen na segment 881-1047 u Konstruktů 2 než na segment 881-1038 u Konstruktů 1 [27]. CD spektroskopie dále umožnila analýzu sekundárních struktur přítomných ve struktuře Konstruktů 1 a Konstruktů 2. CD spektra odhalila, že oba Konstrukty jsou složeny převážně z β -struktur a v menší míře i z α -helixů. Zastoupení α -helixů je podle výsledků CD spektroskopie větší u Konstruktů 1 než u Konstruktů 2. To značí, že Konstrukt 1 je špatně sbalen, jelikož tento fakt není v souladu se strukturou zobrazenou na Obr. 4.1, která byla získána pomocí rentgenové strukturní analýzy [36]. Ze struktury na Obr. 4.1 je vidět, že celá RTX doména je tvořena β -strukturami a že jenom C-konec je tvořen α -helixem. Po porovnání výsledků CD spektroskopie a Obr. 4.1 lze soudit, že správně sbalen je Konstrukt 2.

6 Závěr

V rámci této bakalářské práce byly připraveny expresní vektory pro produkci Konstruktů 1 a Konstruktů 2. Následně byla provedena exprese a purifikace Konstruktů 1 a Konstruktů 2. Vzniklé Konstrukty byly poté analyzovány pomocí limitované proteolýzy a CD spektroskopie za účelem charakterizace jejich stability, struktury a dynamiky sbalování.

Limitovaná proteolýza prokázala větší stabilitu Konstruktů 1 ve srovnání s Konstruktem 2. Následná analýza pomocí CD spektroskopie za současné titrace Ca^{2+} ionty ukázala správné sbalení Konstruktů 2 při nižší koncentraci Ca^{2+} iontů než u Konstruktů 1. Tento fakt způsobilo to, že Konstrukt 2 má optimálnější orientaci β -válece pro napojení segmentu 1562-1681 než Konstrukt 1. Kromě toho CD spektrometrie odhalila, že připravené Konstrukty jsou složeny převážně z β -struktur.

7 Reference

- 1 Mattoo, S. and Cherry, J. D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**, 326–382.
- 2 Nennig, M. E., Shinefield, H. R., Edwards, K. M., Black, S. B. and Fireman, B. H. (1996) Prevalence and incidence of adult pertussis in an urban population. *JAMA* **275**, 1672–1674.
- 3 info@aion.cz, A. C.-. 473/2008 Sb. Vyhláška o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. *Zákony pro lidi*.
- 4 Fabiánová, K., Beneš, Č., Šebestová, H., Kynčl, J., Částková, J., Zavadilová, J., Lžičařová, D. and Kříž, B. Pertuse v ČR v roce 2012 – rozbor epidemiologické situace 7.
- 5 Fabiánová, K., Kříž, B. and Beneš, Č. Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982–2009 3.
- 6 Striz, I. (2008) Respiracni imunita. *Internal Medicine for Practice* **10**, 184–187.
- 7 Rowatt, E. (1957) The Growth of *Bordetella pertussis*: a Review. *Journal of General Microbiology* **17**, 297–326.
- 8 Hamidou Soumana, I., Linz, B. and Harvill, E. T. (2017) Environmental Origin of the Genus *Bordetella*. *Front. Microbiol., Frontiers* **8**.
- 9 Zlamy, M. (2016) Rediscovering Pertussis. *Frontiers in Pediatrics* **4**.
- 10 Carbonetti, N. H. (2010) Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiology, Future Medicine* **5**, 455–469.
- 11 Szymkowicz, L., Gerard, J., Messham, B., Tam, W. W. V. and James, D. A. (2021) Design of a Quantitative LC-MS Method for Residual Toxins Adenylate Cyclase Toxin (ACT), Dermonecrotic Toxin (DNT) and Tracheal Cytotoxin (TCT) in *Bordetella pertussis* Vaccines. *Toxins (Basel)* **13**, 763.
- 12 Carbonetti, N. H. (2010) Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol* **5**, 455–469.
- 13 Fedele, G., Celestino, I., Spensieri, F., Frasca, L., Nasso, M., Watanabe, M., Remoli, M. E., Coccia, E. M., Altieri, F. and Ausiello, C. M. (2007) Lipooligosaccharide from *Bordetella pertussis* induces mature human monocyte-derived dendritic cells and drives a Th2 biased response. *Microbes Infect* **9**, 855–863.
- 14 Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., et al. (2016) Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Molecular Cell* **62**, 47–62.
- 15 Gray, M. C., Donato, G. M., Jones, F. R., Kim, T. and Hewlett, E. L. (2004) Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Molecular Microbiology* **53**, 1709–1719.
- 16 Hackett, M., Walker, C. B., Guo, L., Gray, M. C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Hewlett, E. L. and Sebo, P. (1995) Hemolytic, but Not Cell-invasive Activity, of Adenylate Cyclase Toxin Is Selectively Affected by Differential Fatty-acylation in *Escherichia coli*(*). *Journal of Biological Chemistry* **270**, 20250–20253.
- 17 Smith, A., Guzman, C. A. and Walker, M. (2001) The virulence factors of *Bordetella pertussis*: A matter of control. *FEMS microbiology reviews* **25**, 309–33.

- 18 Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., et al. (2010) RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* **34**, 1076–1112.
- 19 Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. (2006) Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Current Opinion in Microbiology* **9**, 69–75.
- 20 Novak, J., Cerny, O., Osickova, A., Linhartova, I., Masin, J., Bumba, L., Sebo, P. and Osicka, R. (2017) Structure–Function Relationships Underlying the Capacity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. *Toxins, Multidisciplinary Digital Publishing Institute* **9**, 300.
- 21 Ladant, D. (1988) Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem* **263**, 2612–2618.
- 22 Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A. M., Predeleanu, R. and Bârzú, O. (1989) Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *J Biol Chem* **264**, 4015–4020.
- 23 Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Bârzú, O. and Danchin, A. (1989) Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in Bordetella pertussis adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J* **8**, 967–972.
- 24 Bouhss, A., Krin, E., Munier, H., Gilles, A. M., Danchin, A., Glaser, P. and Bârzú, O. (1993) Cooperative phenomena in binding and activation of Bordetella pertussis adenylate cyclase by calmodulin. *J Biol Chem* **268**, 1690–1694.
- 25 Guo, Q., Jureller, J. E., Warren, J. T., Solomaha, E., Florián, J. and Tang, W.-J. (2008) Protein-protein docking and analysis reveal that two homologous bacterial adenylate cyclase toxins interact with calmodulin differently. *J Biol Chem* **283**, 23836–23845.
- 26 Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C. S., Mrksich, M. and Tang, W.-J. (2005) Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J* **24**, 3190–3201.
- 27 Espinosa-Vinals, C. A., Masin, J., Holubova, J., Stanek, O., Jurnecka, D., Osicka, R., Sebo, P. and Bumba, L. (2021) Almost half of the RTX domain is dispensable for complement receptor 3 binding and cell-invasive activity of the Bordetella adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* **297**, 100833.
- 28 Sebo, P., Osicka, R. and Masin, J. (2014) Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Review of Vaccines, Taylor & Francis* **13**, 1215–1227.
- 29 Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R. and Sebo, P. (2016) Negatively charged residues of the segment linking the enzyme and cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci Rep* **6**, 29137.
- 30 Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.-C., Hessel, A., Spiczka-Karst, J., Selwa, E., Sapay, N., Veneziano, R., Pansieri, J., Chopineau, J., Ladant, D., et al. (2013) Characterization of a Membrane-active Peptide from the Bordetella pertussis CyaA Toxin. *J Biol Chem* **288**, 32585–32598.
- 31 Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P. (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli. *J Biol Chem* **269**, 27231–27239.

- 32 Havlíček, V., Higgins, L., Chen, W., Halada, P., Sebo, P., Sakamoto, H. and Hackett, M. (2001) Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom* **36**, 384–391.
- 33 Basar, T., Havlíček, V., Bezousková, S., Hackett, M. and Sebo, P. (2001) Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J Biol Chem* **276**, 348–354.
- 34 Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. and Korostoff, J. (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology* **7**, 356–361.
- 35 Goldsmith, J. A., DiVenere, A. M., Maynard, J. A. and McLellan, J. S. (2021) Structural basis for antibody binding to adenylate cyclase toxin reveals RTX linkers as neutralization-sensitive epitopes. *PLoS Pathog* **17**, e1009920.
- 36 Motlova, L., Klimova, N., Fiser, R., Sebo, P. and Bumba, L. (2020) Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins. *Journal of Molecular Biology* **432**, 5696–5710.
- 37 Calmodulin-Induced Conformational and Hydrodynamic Changes in the Catalytic Domain of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin | *Biochemistry*.
- 38 Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R. and Sebo, P. (2009) Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *The FASEB Journal* **23**, 2831–2843.
- 39 Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P. (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27231–27239.
- 40 Fiser, R., Masín, J., Basler, M., Krusek, J., Spuláková, V., Konopásek, I. and Sebo, P. (2007) Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* **282**, 2808–2820.
- 41 Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A. (1990) Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* **58**, 3242–3247.
- 42 Novak, J., Cerny, O., Osickova, A., Linhartova, I., Masin, J., Bumba, L., Sebo, P. and Osicka, R. (2017) Structure–Function Relationships Underlying the Capacity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. *Toxins (Basel)* **9**, 300.
- 43 Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. - Abstract - Europe PMC.
- 44 Confer, D. L. and Eaton, J. W. (1982) Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**, 948–950.
- 45 Novak, J., Cerny, O., Osickova, A., Linhartova, I., Masin, J., Bumba, L., Sebo, P. and Osicka, R. (2017) Structure-Function Relationships Underlying the Capacity of *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin to Disarm Host Phagocytes. *Toxins (Basel)* **9**.
- 46 Carbonetti, N. H. (2010) Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiology, Future Medicine* **5**, 455–469.
- 47 Ahmad, J. N. and Sebo, P. (2020) Adenylate Cyclase Toxin Tinkering With Monocyte-Macrophage Differentiation. *Front Immunol* **11**.

48 pET-28b(+) Sequence and Map. SnapGene.

49 Addgene: Gibson Assembly Protocol.

50 Bumba, L., Masin, J., Macek, P., Wald, T., Motlova, L., Bibova, I., Klimova, N., Bednarova, L., Veverka, V., Kachala, M., et al. (2016) Calcium-Driven Folding of RTX Domain β -Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Molecular Cell*, Elsevier **62**, 47–62.