

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

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Anna Suková

Role segmentu 400-500 v biologické aktivitě adenylát cyklázového toxinu
bakterie *Bordetella pertussis*

Role of the segment 400-500 in biological activity of *Bordetella pertussis*
adenylate cyclase toxin

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Jiří Mašín Ph.D.
Praha, 2017

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, 27. 4. 2017

.....

Anna Suková

Poděkování

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D. za cenné rady, inspiraci a pomoc při vypracovávání diplomové práce.

Další poděkování patří vedoucímu Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AVČR Prof. Ing. Peteru Šebovi, CsC. za možnost pracovat v jeho laboratoři. Nemalé díky patří i Ing. Adrianě Osičkové, Ph.D. a Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za přípravu mutantních proteinů a Soně Charvátové za výbornou technickou podporu.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře fyziologie bakterií Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy, především RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za neocenitelnou odbornou pomoc. Neméně mé díky patří i Doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CsC., RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D., Mgr. Lucii Motlové, Mgr. Tereze Dolejšové a Mgr. Dominiku Pinkasovi, Bc. Albertu Sokolovi a Lucii Jánské za celkovou podporu, pomoc a mnohé rady.

Práce vznikla za finanční podpory GAČR v rámci projektu 16-05919S

Abstrakt

Adenylát cyklázový toxin-hemolyzin (CyaA) je RTX protein, který hraje zásadní roli ve virulenci bakterie *Bordetella pertussis*, způsobující onemocnění černý kašel. CyaA dopravuje do cytosolu CD11b⁺ fagocytů svou enzymatickou adenylát cyklázovou doménu a katalyzuje přeměnu ATP na cAMP, které následně zablokuje baktericidní funkce fagocytů. Současně toxin vytváří v membráně cílových buněk póry, způsobující únik draselných iontů z buňky. Cílem této diplomové práce bylo analyzovat mechanismus interakce domény spojující invazivní adenylát cyklázovou (AC) doménu a tzv. RTX hemolyzin s biologickou membránou. Z našich výsledků vyplývá, že tato doména interaguje s cílovou membránou a hraje zásadní roli v tvorbě malých pórů selektivních pro kationty. Získané výsledky budou zásadní pro pochopení interakce bakteriálních toxinů s cílovou membránou a naleznou reálné použití při vývoji terapeutických vakcín odvozených od CyaA.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, adenylát cyklázový toxin, translokace přes membránu, pórtvorná aktivita, černé lipidové membrány, liposomy

Abstract

The adenylate cyclase toxin-hemolysin (CyaA) plays a key role in virulence of the whooping cough agent *Bordetella pertussis*. It translocates an AC enzyme into cytosol of CD11b⁺ phagocytes and subverts their bactericidal functions by unregulated conversion of ATP to cAMP. In parallel, CyaA permeabilizes cellular membrane by forming cation-selective pores.

The goal of my diploma thesis was an analysis of the mechanism of interaction of the segment linking the invasive adenylate cyclase domain and the RTX hemolysin moiety of CyaA with target membrane. Our data show that the segment linking the AC to the hydrophobic domain of CyaA is directly involved in the interaction of the toxin with the membrane and controls the formation of small cation-selective pores. Our results generate new knowledge that will be of relevance to the entire field of toxin biology and will enable the design of improved CyaA-based vaccines.

Keywords: *Bordetella pertussis*, adenylate cyclase toxin, membrane translocation, pore-forming activity, black lipid bilayers, liposomes

Obsah

ABSTRAKT

ABSTRACT

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1. ÚVOD	1
2. CÍLE PRÁCE	2
3. PŘEHLED LITERATURY	3
3.1. BAKTERIÁLNÍ PÓROTVORNÉ PROTEINY	3
3.2. RTX TOXINY	6
3.1. PÓROTVORNÉ VLASTNOSTI RTX CYTOTOXINŮ	8
3.2. BORDETELLA PERTUSSIS	11
3.2.1. Faktory virulence <i>B. pertussis</i>	12
3.3. ADENYLÁT CYKLÁZOVÝ TOXIN CYAA	13
3.3.1. Struktura <i>CyaA</i>	13
3.3.2. Vazba toxinu na membránu	15
3.3.3. Funkce <i>CyaA</i> - pórotvorná aktivita <i>CyaA</i> a translokace AC domény	16
3.3.4. Role segmentu 400-500	18
4. MATERIÁL A METODY	19
4.1. CHEMIKÁLIE A DALŠÍ MATERIÁL	19
4.1.1. Seznam použitého materiálu a chemikálií	19
4.1.2. Použité plasmidy	20
4.1.3. Bakteriální kmeny	20
4.1.4. Kultivační média	20
4.2. METODY A PRACOVNÍ POSTUPY	20
4.2.1. Uchování bakteriálních kmenů	20
4.2.2. Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk	21
4.2.3. Příprava močovinového extraktu toxinu	21
4.2.4. Purifikace toxinu chromatografií na DEAE-Sepharoze	22
4.2.5. Purifikace toxinu chromatografií na Phenyl-Sepharoze	22
4.2.6. Stanovení množství proteinu metodou Bradfordové	23

4.2.7. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	23
4.2.8. Černé lipidické membrány (Black lipid membrane – BLM)	24
4.2.9. Příprava lipozómů	27
4.2.10. Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů	28
4.2.11. Únik fluorescenční sondy z lipozómů	29
5. VÝSLEDKY	30
5.1. CHARAKTERISTIKA PÓROTVORNÉ AKTIVITY MUTANTNÍCH TOXINŮ S DELECEMI N-KONCOVÉ ČÁSTI CYAA30	
5.1.1. Charakterizace mutantních toxinů pomocí BLM	32
5.2. ROLE NEGATIVNĚ NABITÝCH AMINOKYSELINOVÝCH ZBYTKŮ V SEGMENTU 400-500 V PÓROTVORNÉ AKTIVITĚ CYAA	36
5.2.1. Predikce sekundárních struktur v segmentu 400-500	36
5.2.2. Charakterizace pórotočné aktivity mutantních toxinů pomocí BLM	38
5.3. INTERAKCE SEGMENTU 400-500 S MEMBRÁNOU	42
5.3.1. Vliv lipidového složení membrány na membránovou aktivitu	43
5.3.2. Charakterizace interakce syntetického peptidu CyaA 454-484 s membránou	44
5.3.3. Charakterizace interakce segmentu 411-490 s membránou	48
6. DISKUZE	51
7. SOUHRN	59
8. SEZNAM LITERATURY:	60

Seznam použitých zkratek

$\alpha M\beta 2$	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
ABC	z ang. ATP Binding Casette
AC-Hly	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
ACT	adenylát cyklázový toxin <i>B. pertussis</i>
ADP	adenosin-5'-difosfát
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BLM	černé lipidové membrány (z ang. Black Lipid Membranes)
BSA	hovězí sérový albumin (z ang. Bovine Serum Albumin)
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CD	cirkulární dichroismus (metoda stanovení sekundárních struktur proteinů)
CD11b/CD18	integrin, specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
CDC	cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu (z ang. Cholesterol-Dependent Cytolysins)
CF	karboxyfluorescein
CR3	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>
Da	dalton (jednotka molekulární hmotnosti)
DEAE	diethylaminoethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNT	dermonekrotický toxin
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin
DOPE	dioleoylfosfatidyletanolamin
DOPG	dioleoylfosfatidylglycerol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FHA	filamentózní hemagglutinin
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová
IF	intenzita fluorescence
Il-1 β	interleukin
IM	vnitřní membrána (z ang. Inner Membrane)
KDE	jádrový odhad hustoty rozložení (z ang. Kernel Density Estimation)
LPS	lipopolysacharid
MAC	z ang. Membrane Attack Complex
Mac1	integrin CD11b/CD18 – specifický receptor pro CyaA <i>B. pertussis</i>

MARTX	multifunkční RTX proteiny rodu Vibrio (z ang. Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin Toxins)
MFP	z ang. Membrane Fusion Protein
NALP3	z ang. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
Ni-NTA	nitrilotrioctová kyselina s navázaným Ni ²⁺
OD	optická denzita
OM	vnější membrána (z ang. Outer Membrane)
OMP	protein vnější membrány (z ang. Outer Membrane Protein)
PC	fosfatidylcholin
PCI	počítačová sběrnice (z ang. Peripheral Component Interconnect)
PE	fosfatidyletanolamin
PFT	pórotvorné toxiny (z ang. Pore-Forming Toxins)
PG	fosfatidylglycerol
PT	pertusový toxin
RTX	skupina cytolysinů s opakujícími se sekvencemi vážícími vápník (z ang. Repeats in ToXin)
SDS	dodecylsírán sodný
SDA-PAGE	SDS polyakryamidová gelová elektroforéza
T1SS	sekreční systém typu 1 (z ang. Type 1 Secretion System)
TCT	tracheální cytotoxin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEV	z ang. Tobacco Etch Virus
TLR	z ang. Toll-like Receptors
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
wt	divoký typ (z ang. wild type)

Seznam jednopísmených zkratk aminokyselin

Jednopísmená zkratka	Aminokyselina
D	Kyselina asparagová
E	Kyselina glutamová
F	Fenylalanin
G	Glycin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
N	Asparagin

W	Tryptofan
Y	Tyrosin
X	nespecifická aminokyselina

1. Úvod

Adenylát cyklázový toxin (CyaA, ACT, AC-Hly) je klíčovým faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis*, původce vysoce nakažlivého respiračního onemocnění zvané černý nebo též dávivý kašel. Přesný mechanismus interakce toxinu s membránou cílové buňky není doposud znám. Toxin dopravuje do cytosolu cílových buněk imunitního systému, nesoucích na svém povrchu integrin CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001), svou adenylát cyklázovou doménu. Po vazbě eukaryotního kalmodulinu na adenylát cyklázovou (AC) doménu vyvolá AC enzym v cytoplasmě buňky nekontrolovanou přeměnu ATP na cAMP. Vysoká hladina tohoto „druhého posla“ pak vyvolá poruchu vnitrobuněčné signalizace a tím inhibici funkce buněk imunitního systému hostitele (Confer a Eaton, 1982). CyaA také vytváří póry v cytoplasmatické membráně cílové buňky a tím narušuje rovnováhu iontů na membráně.

Geneticky detoxifikovaný CyaA (neschopný konverze ATP na cAMP), nesoucí ve své AC doméně cizorodé epitopy (z virů, bakterií či nádorů) lze také využít jako vektor pro dopravu cizorodých antigenů do cytosolu buněk, které na svém povrchu následně tyto cizorodé epitopy vystavují. To umožňuje indukci cytotoxické nebo buněčně zprostředkované imunitní odpovědi proti příslušné infekci nebo nádoru (Saron *et al.*, 1997; Sebo *et al.*, 2014). CyaA je také vhodným kandidátem do nově připravované bezbuněčné vakcíny proti pertusi (Sebo *et al.*, 2014).

Adenylát cyklázový toxin je tak nejen vhodným modelovým systémem pro studium interakce proteinů s cytoplasmatickou membránou, ale toxoidy odvozené od CyaA mohou mít také praktické použití pro přípravu nových typů vakcín.

2. Cíle práce

Cílem mé diplomové práce bylo studium role segmentu spojujícího AC doménu a RTX hemolysin v interakci CyaA s plasmatickou membránou. Práce navazuje na předchozí výsledky získané naší laboratoří. Dílčí cíle jsou shrnuty v několika bodech:

- Pomocí metody černých lipidových membrán charakterizovat pórtvorné vlastnosti mutantních toxinů s deletovanými N-koncovými částmi proteinu
- Charakterizovat pórtvorné vlastnosti mutantních CyaA proteinů se záměnou negativně nabitých aminokyselinových zbytků v segmentu 400-500
- Analyzovat interakci segmentu 411-490 s membránou pomocí metody měření úniku fluorescenční sondy z liposomů
- Podrobněji sledovat pórtvornou aktivitu segmentu 411-490 metodou černých lipidových membrán

3. Přehled literatury

3.1. Bakteriální pórotvorné proteiny

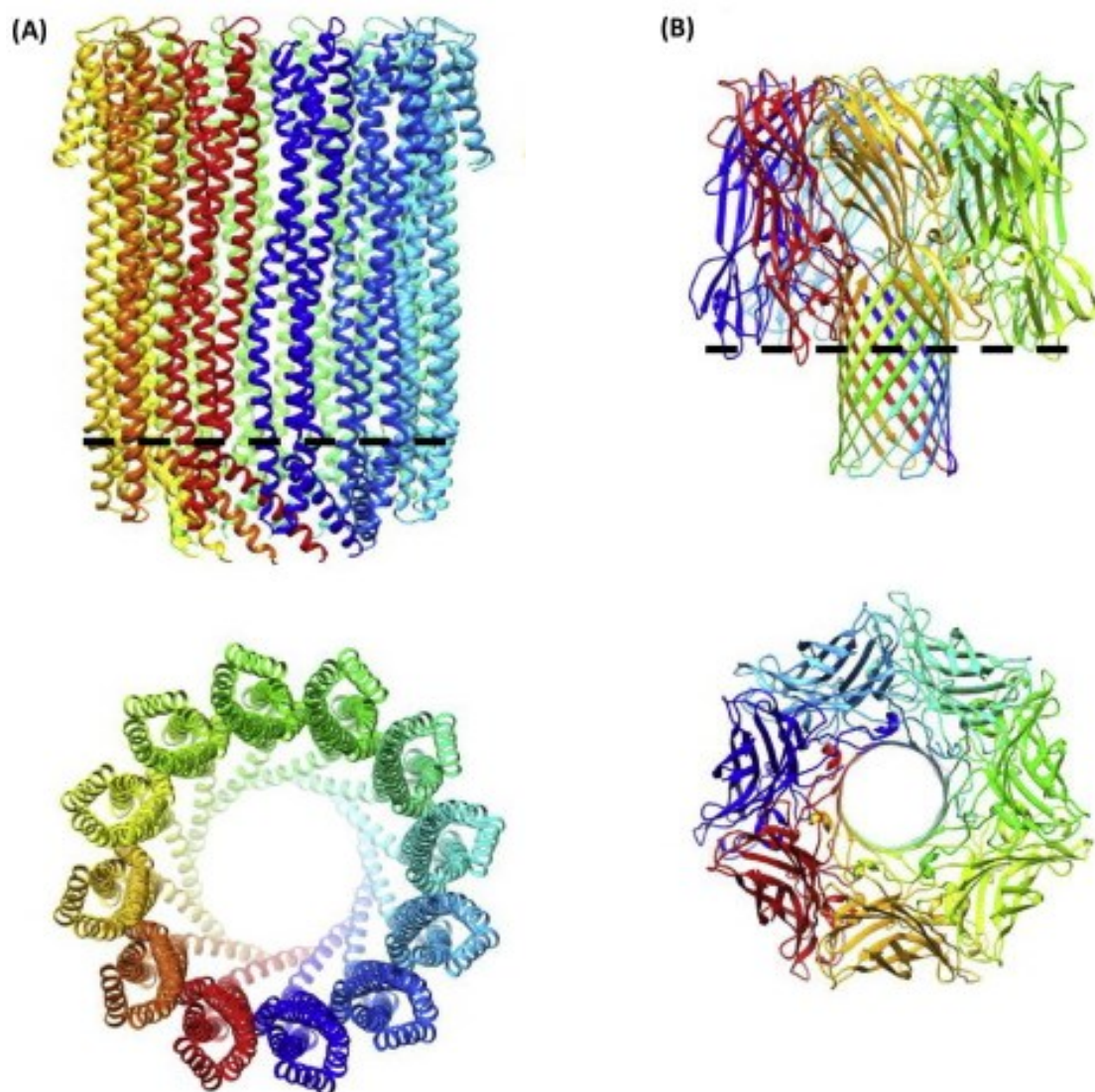
Pórotvorné proteiny jsou produkovány eukaryoty, bakteriemi i archea. Nejlépe charakterizovanou skupinou pórotvorných proteinů jsou bakteriální proteiny, tvořící v membráně cílových buněk transmembránové póry. Často jsou produkovány bakteriálními patogeny a jsou označovány jako toxiny (PFT – z ang. Pore-Forming Toxins). Desítky let studia bakteriálních toxinů ukazují, že skupina pórotvorných toxinů je nesmírně různorodou skupinou proteinů s rozličnými mechanismy působení a vlivem na membrány napadených buněk, od změny propustnosti membrány po úplné rozrušení membrány a smrti buňky. Znalost působení PTF je důležitá, především pro lepší porozumění patogeneze bakterií. Díky PFT můžeme také zkoumat signální dráhy napadených buněk a adaptaci buněk na působení PFT. V neposlední řadě jsou PFT využívány v biotechnologiích a farmacii (Bischofberger *et al.*, 2012).

PFT mají několik společných znaků, co se týká sekrece z buňky nebo mechanismu působení. Toxiny jsou produkovány většinou ve formě monomerů, které se váží na membránu, kde následně vytvářejí oligomery. Oligomery se poté inzertují do membrány a vytvoří transmembránový pór. Počet monomerů se mezi jednotlivými toxiny značně liší od dimerů až po oligomery tvořené více než 30 monomery (Cytolysiny závislé na vazbě cholesterolu - CDC, Hotze a Tweten, 2012). Dodnes jsou PFT nejčastěji děleny do dvou hlavních skupin podle jejich struktury – na pórotvorné toxiny, jejichž pór je tvořen α -helixy nebo β -strukturami (Obr. 1).

Hlavním zástupcem skupiny α -helikálních PFT je cytolysin A (ClyA, HlyE, SheA). ClyA je produkován bakteriemi *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* a *Shigella flexneri* (del Castillo *et al.*, 1997; von Rhein *et al.*, 2009). Má velmi vysokou hemolytickou aktivitu a na umělých lipidových membránách tvoří póry s vodivostí 10 nS (v 1M KCl) (Ludwig *et al.*, 1999). Toxin je produkován jako monomer a následně tvoří oligomer z 12 monomerů. Struktura monomerů i oligomerního póru je známá. Ukazuje se, že při inzerci oligomerní struktury prekurzoru póru do membrány musí prekurzor projít rozsáhlou změnou konformace, aby mohl vzniknout transmembránový pór. Ze struktury je také znám vnitřní průměr póru tvořeného ClyA (3-4 nm) (Mueller *et al.*, 2009; Wallace *et al.*, 2000).

Druhou skupinou PFT jsou pórotvorné toxiny s póry tvořenými β -strukturami. Typickým zástupcem je α -hemolysin produkován bakterií *Staphylococcus aureus*. Toxin je opět produkován v podobě monomerů, které po vazbě do membrány tvoří oligomerní pór tvořený 7

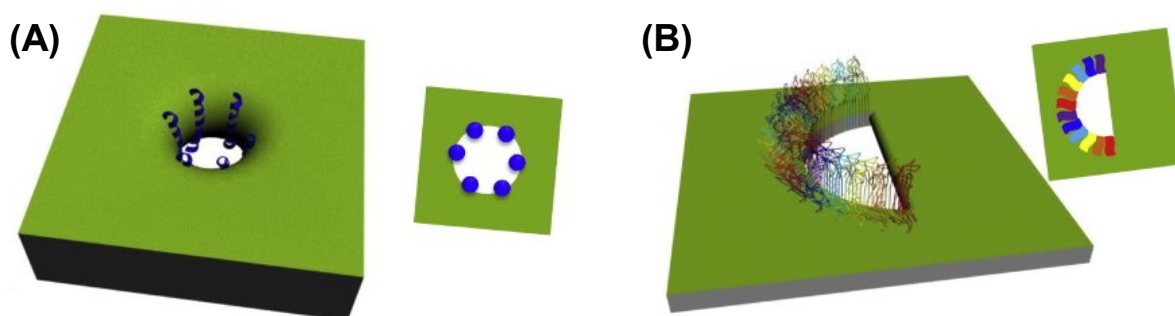
monomery (Bhakdi a Tranum-Jensen, 1991). Struktura tohoto toxinu je velmi dobře známá. Samotný pór, tvořený 14 β -vláknky, má vnitřní průměr kolem 2 nm. Při pokusech na umělých lipidových membránách byla zjištěna vodivost póru – 820 pS (v 1M KCl). Pór je velmi lehce selektivní pro anionty. Díky interakci mezi jednotlivými monomery a celkovému uspořádání oligomeru se jedná o velmi rigidní a stabilní strukturu (Bezrukov a Kasianowicz, 1993; Chakraborty *et al.*, 1990; Song *et al.*, 1996).



Obr. 1: Příklady struktury proteinových pórů. Oba obrázky poskytují pohled ze stran a shora. Černá přerušovaná čára značí membránu. (A) Cytolysin A *Escherichia coli*, typický α -helikální pór. (B) α -hemolysin *Staphylococcus aureus*, typický pór tvořený β -vláknky. (Převzato a upraveno podle Mueller *et al.*, 2009; Song *et al.*, 1996 - pdb kódy 2wcd a 7ahl)

V posledních několika letech přicházejí do popředí zájmu také póry, které nejsou tvořeny pouze proteiny (Obr. 2). PFT mohou také tvořit tzv. proteolipidické póry, které tvoří v membráně toroidní struktury (Gilbert *et al.*, 2014). U těchto struktur se na architektuře póru

kromě samotných proteinů podílejí také fosfolipidy membrány. Toroidní póry vyžadují specifické složení a uspořádání polárních hlaviček fosfolipidů, které umožňují pozitivní zakřivení membrány. Díky tomuto zakřivení membrány dochází ke splývání vnitřního a vnějšího listu membrány a vytvoření kruhového otvoru v membráně. Polární hlavičky fosfolipidů jsou součástí póru a mohou ovlivňovat některé jeho vlastnosti, jako je selektivita nebo doba života póru. V současnosti jsou definovány alespoň dvě skupiny toroidních pórů. Prvním je tzv. „matrix“ typ, který je tvořen rovnoměrně rozmístěnými polypeptidy po obvodu póru. Fosfolipidy se aktivně podílejí na architektuře póru. Příkladem proteinů tvořících takovéto póry jsou např. aktinoporiny, ale také některé antimikrobiální peptidy jako jsou melitin a magainin (Yang *et al.*, 2001). Druhým typem toroidních pórů jsou tzv. „obloukovité póry“ (z angl. arc-type), které vznikají zanořením amfipatického proteinového oblouku do membrány. Na hydrofilní straně struktury jsou fosfolipidy membrány odpuzovány od proteinového oblouku, čímž vzniká otvor v membráně. Typickým příkladem jsou póry tvořené bakteriálními cytolysiny závislými na vazbě cholesterolu (CDC), ale také eukaryotický MAC komplex (z ang. Membrane attack complex) (Gilbert *et al.*, 2014; Hotze a Tweten, 2012).



Obr. 2: Schematické znázornění toroidních pórů. Oba obrázky ukazují 3D model toroidního póru a pohled shora. (A) Toroidní pór matrix typu s rovnoměrně rozmístěnými peptidy po obvodu póru. (B) Toroidní pór obloukovitého typu. (Převzato a upraveno podle Gilbert *et al.*, 2014).

Často podceňovanou a nepříliš dobře prozkoumanou roli hraje ve struktuře a funkci PFT i prostředí, ve kterém se nacházejí, tedy cílové membrány. Fyzikálně-chemické vlastnosti lipidových membrán hrají značnou roli v procesech tvorby póru jako je inserce toxinu do membrány a oligomerizace. Těmito vlastnostmi jsou především tvorba membránových domén, fluidita membrány a tloušťka membrány. Kromě procesu tvorby póru fosfolipidy ovlivňují i vlastnosti vzniklého póru jako jsou selektivita nebo i průměr póru (Rojko a Anderluh, 2015).

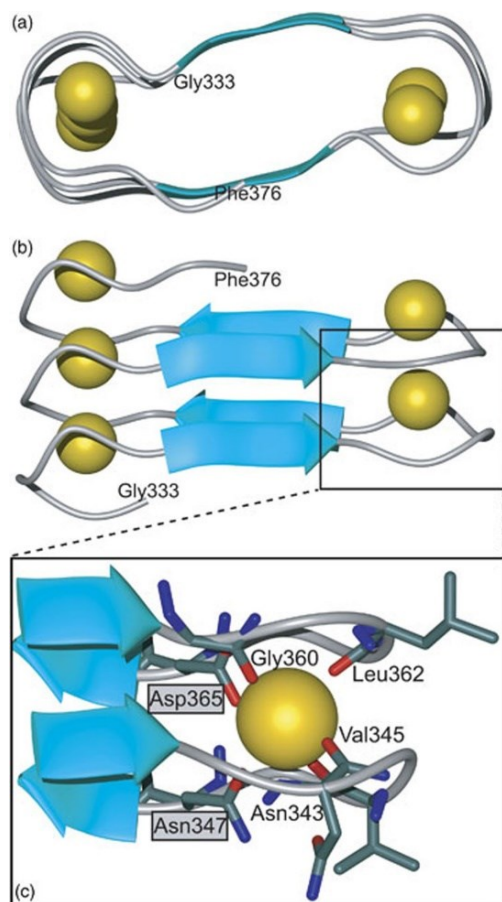
3.2. RTX toxiny

Rodina RTX proteinů (z anglického Repeats in ToXin) je tvořena velkým množstvím proteinů produkovaných Gram-negativními bakteriemi. Původně byly do této rodiny řazeny pouze cytolytické a pórotočné toxiny patogenních bakterií (Welch, 1991). V dnešní době jsou do rodiny RTX proteinů řazeny také některé metaloproteázy a lipázy nebo multifunkční RTX proteiny rodu *Vibrio* (MARTX) (Linhartová *et al.*, 2010).

Prvním společným znakem proteinů této rodiny je podobná organizace genů na chromozómu. Téměř všechny geny potřebné pro funkci proteinů jsou kódovány v jednom komplexním operonu *rtxCABD* (Lally *et al.*, 1999). RTX proteiny jsou produkovány v neaktivní formě. Aktivace probíhá posttranslační modifikací mastnou kyselinou prostřednictvím acyltransferázy RtxC.

Hlavním znakem, podle kterého tato rodina dostala své jméno, jsou krátké opakující se sekvence devíti aminokyselinových zbytků bohatých na glycin a aspartát, tzv. RTX motivy. RTX motiv má společnou sekvenci X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D. Počet motivů se mezi jednotlivými proteiny liší od šesti po přibližně padesát. Do struktury RTX motivů se váží vápenaté kationty, což vede k vytvoření terciární struktury tzv. „β-rollu“ (někdy označován i jako β-helix) (Linhartová *et al.*, 2010; Sotomayor-Pérez *et al.*, 2014). Tato terciární struktura byla poprvé objevena u alkalické proteázy *Pseudomonas aeruginosa*, která obsahuje šest RTX motivů (Obr. 3) (Baumann *et al.*, 1993). Prvních šest aminokyselinových zbytků RTX motivu tvoří smyčku, která váže jeden vápenatý kationt. Zbylé tři aminokyselinové zbytky tvoří krátké β-vláknko. Konzervovaný hydrofobní aminokyselinový zbytek (L/I/F) stabilizuje hydrofobní jádro β-rollu. Výsledná terciární struktura je tedy pravotočivá šroubovice s hydrofobním jádrem tvořená krátkými β-vláknky. Toto velmi organizované uspořádání proteinu je možno pouze v přítomnosti vápenatých kationtů. Vápenaté kationty mají optimální poloměr pro vazbu do smyček a také kompenzují záporný náboj přítomných zbytků kyseliny asparagové. V nepřítomnosti vápníku má sekvence příliš velký negativní povrchový náboj, který brání složení proteinu do jeho nativní struktury (Bumba *et al.*, 2016; Linhartová *et al.*, 2010; Sotomayor-Pérez *et al.*, 2014). Tento model je podpořen i CD spektry, která naznačují, že vápník má vliv pouze na terciární strukturu proteinu, ne na sekundární (Bakás *et al.*, 1998; Baumann *et al.*, 1993; Ostolaza *et al.*, 1995). Vazba vápenatých kationtů je dobrá strategie pro vytvoření velmi stabilní terciární struktury. Dále bylo ukázáno, že vazba vápníku do RTX motivů hraje roli v sekreci proteinů (Bumba *et al.*, 2016). Také vyvolává konformační změny v ostatních doménách proteinů, které jsou nutné pro interakci toxinu s receptorem nebo

cytoplasmatickou membránou (Sanchez-Magraner *et al.*, 2007; Sánchez-Magraner *et al.*, 2010; Schindel *et al.*, 2001).



Obr. 3: 3D model tzv. „β-rollu“ tvořeného RTX motivy alkalické proteázy bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

(a) pohled shora (b) pohled ze strany

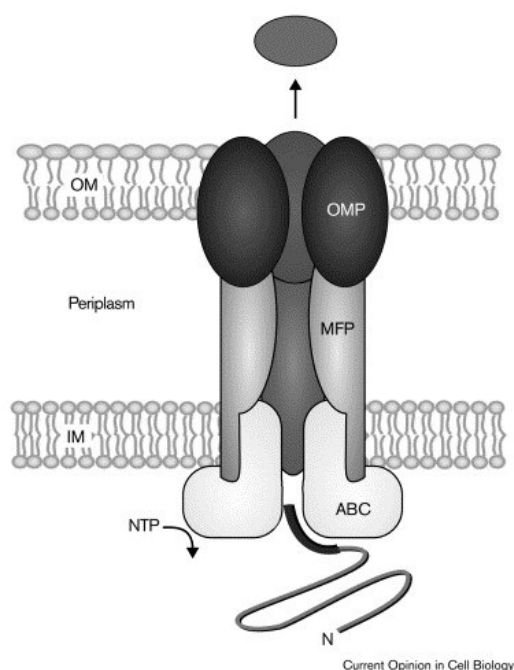
Na obrázku jsou znázorněny krátká β-vlákna (modře), nestrukturované smyčky (šedivě) a vápenaté kationty vázané ve struktuře (žluté kuličky).

(c) detailní pohled na vazebné vápníku. Každý Ca²⁺ je vázán pomocí šesti aminokyselinových zbytků (převzato a upraveno podle Linhartová *et al.*, 2010)

Posledním charakteristickým znakem RTX proteinů je sekrece pomocí sekrečního systému typu I (T1SS). T1SS byl poprvé popsán na α -hemolysinu HlyA produkovaného bakterií *E. coli*. Sekrece pomocí T1SS probíhá v jednom kroku, je tedy potřeba vytvořit přímou cestu jak dopravit sekretovaný protein přes vnitřní i vnější membránu bakterie. T1SS tvoří kanál, kterým je sekretovaný protein dopravován přes obě membrány bakterie. Kanál je tvořen třemi proteiny – ABC transportérem, MFP proteinem (z ang. membrane fusion protein) a OMP proteinem (z ang. outer membrane protein - protein vnější membrány). ABC transportér se nachází ve vnitřní membráně. Na jeho C-konci se nachází ATP vazebné místo. MFP je tvořen dvěma doménami – transmembránovou a periplasmatickou. OMP je protein vnější membrány, kde tvoří transmembránový kanál. OMP je multifunkční protein, kromě T1SS se účastní např. na vylučování toxických látek z buňky (tzv. multidrug efflux) (Gentschev a Goebel, 1992; Koronakis *et al.*, 2000; Pimenta *et al.*, 1999). V případě HlyA *E. coli* se jedná o proteiny HlyB, HlyD a TolC. Proteiny HlyB a HlyD jsou kódovány ve stejném operonu jako HlyA, TolC je kódován samostatně na jiném místě chromosomu (Wandersman a Delepelaire, 1990). T1SS *E.*

coli pro sekreci HlyA je nejlépe studovaným sekrečním systémem, proto je v této práci použit pro popis mechanismu sekrece (Obr. 4).

Protein HlyA má na svém C-konci sekreční signální sekvenci. Při sekreci je tato sekvence nejprve rozpoznávána komplexem HlyB (dimer)/HlyD (hexamer) zanořeném ve vnitřní membráně bakterie. Vazbou sekretovaného proteinu dochází ke konformační změně v periplasmatické doméně HlyD, která následně rekrutuje TolC. TolC tvoří homotrimerní kanál, který má regulovatelný průřez. Všechny tři proteiny spolu tvoří kanál z cytoplasy do vnějšího prostředí buňky přes obě bakteriální membrány. Kanálem pak prochází nestrukturovaný sekretovaný protein. Energie nutná pro sekreci je dodávána částečně hydrolýzou ATP a částečně protonovým gradientem na vnitřní membráně. (Koronakis *et al.*, 1995, 1991, 1993; Stanley *et al.*, 1991; Thomas *et al.*, 2014). V posledních letech se ukazuje, že transportu proteinu by mohla napomáhat také jeho struktura (Bumba *et al.*, 2016; Sotomayor-Pérez *et al.*, 2014).



Obr. 4: Model sekrečního systému typu I.

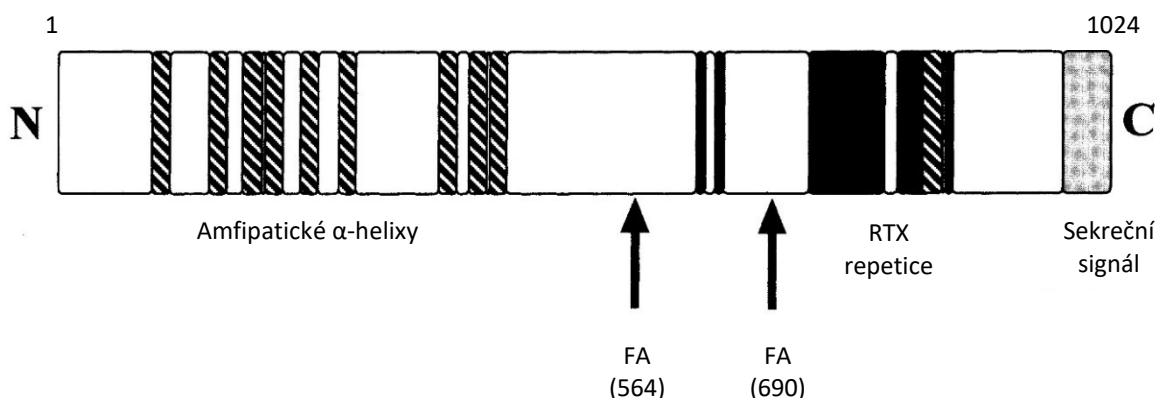
T1SS rozpoznává C-koncovou signální sekvenci. Během sekrece periplasmatický MFP protein interaguje jak s ABC transportérem nacházejícím se ve vnitřní membráně, tak s proteinem vnější membrány (OMP). To vede k sekreci proteinu přes vnitřní i vnější membrány (IM a OM) bez potřeby periplasmatického intermediátu (upraveno a převzato z Thanassi a Hultgren 2000).

3.1. Pórtvorné vlastnosti RTX cytotoxinů

Jednou z podskupin RTX proteinů jsou pórtvorné RTX cytotoxiny. Jedná se o skupinu proteinů produkovaných patogenními Gram-negativními bakteriemi. Tyto proteiny vykazují všechny znaky RTX proteinů, ale mají navíc jeden společný znak. Tím je přítomnost hydrofobní domény v N-koncové části proteinu, která je zodpovědná za tvorbu

transmembránového póru (Linhartová *et al.*, 2010). V dnešní době není známá krystalová struktura hydrofobní domény žádného z RTX cytotoxinů, proto jsou data o jejich pórtvorné aktivitě a mechanismu působení odvozována z biochemických a biofyzikálních studií.

Typický zástupcem a nejvíce prozkoumaným RTX cytotoxinem je α -hemolysin HlyA produkovaný patogenními kmeny *E. coli*. Mnohé znalosti o struktuře a mechanismu působení RTX cytotoxinů se odvozují právě od něho.



Obr. 5: Schematické znázornění primární struktury HlyA *E. coli*. RTX repetice jsou vyznačeny černě, amfipatické α -helixy pružovaně a C-koncový sekreční signál světle šedě. Dále jsou šipkami označeny lysiny, kde dochází k posttranslační modifikaci (FA) (převzato a upraveno podle Soloaga *et al.* 1998).

HlyA se skládá z několika domén (Obr. 5). Na N-konci se nachází hydrofobní doména s predikovanými transmembránovými amfipatickými α -helixy (Benz *et al.*, 1992). V nedávné době bylo ukázáno, že se v hydrofobní doméně nachází i krátká β -vlákna (Benz *et al.*, 2014). Hydrofobní doména je zodpovědná za inserci toxinu do membrány a za tvorbu transmembránového póru (Hyland *et al.*, 2001; Ludwig *et al.*, 1991). Další důležitou částí toxinu je centrální segment, kde dochází k dvěma posttranslačním modifikacím mastnou kyselinou, konkrétně na lysinech K564 a K690 (Stanley *et al.*, 1994). Tyto modifikace jsou typické pro RTX proteiny a jsou nutné pro biologickou aktivitu toxinu. Blízko C-konce HlyA se nachází RTX doména, ve které se nachází 11-13 RTX motivů. RTX motivy váží do své struktury vápenaté ionty, což umožňuje molekule zaujmout nativní konformaci (Boehm *et al.*, 1990). Na úplném C-konci molekuly se nachází signální sekvence nutná pro sekreci toxinu pomocí T1SS (Stanley *et al.*, 1991; Yin *et al.*, 1995).

Tvorba transmembránových pórů RTX cytotoxinů se připisuje N-koncové hydrofobní doméně. Mnohé studie využívající delece vybraných úseků či mutace vybraných aminokyselin ukázaly, že integrita hydrofobní domény je nezbytná pro správnou funkci toxinu (Basler *et al.*,

2007; Bellalou *et al.*, 1990; Benz, 2016; Benz *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 1991; Osičková *et al.*, 1999).

Další otázkou týkající se transmembránových pórů tvořených RTX cytotoxiny je oligomerizace. Většina autorů se shoduje na nutnosti oligomerizace pro vytvoření póru. Existuje několik důkazů podporující oligomerizaci jako klíčový krok při tvorbě póru. Prvním důkazem je schopnost komplementace funkčních a záměrně nefunkčních (mutovaných) variant toxinů vedoucí k částečnému obnovení hemolytické aktivity toxinu (Iwaki *et al.*, 1995; Ludwig *et al.*, 1993). Druhým důkazem je koncentrační závislost hemolytické i pórotvorné aktivity (Benz *et al.*, 1989, 1994a; Maier *et al.*, 1996; Szabo *et al.*, 1994). Další důkaz byl získán při *in vitro* pokusech zaměřujících se detailně na tvořené póry. Ukazuje se, že RTX cytotoxiny tvoří relativně dynamické struktury s krátkou dobou života (v řádech sekund) (Benz *et al.*, 1989, 1994b, 2014). Tím se výrazně liší od jiných bakteriálních pórotvorných toxinů, které tvoří rigidní struktury a velmi stabilní póry. Poslední důkaz podporující oligomerizaci byl získán pomocí nativní elektroforézy (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). I přesto není dodnes známá přesná stechiometrie pórů. Existují ale také studie, které tvrdí, že RTX cytotoxiny působí jako monomery (Menestrina, 1988).

V devadesátých letech proběhla řada studií RTX cytotoxinů na umělých lipidových membránách. Studie byly provedeny skupinou okolo Rolanda Benze. Charakterizovány byly pórotvorné účinky několika příbuzných RTX cytotoxinů schopných vazby na membránu bez potřeby receptoru. Výsledky těchto studií jsou shrnuty v tabulce 1.

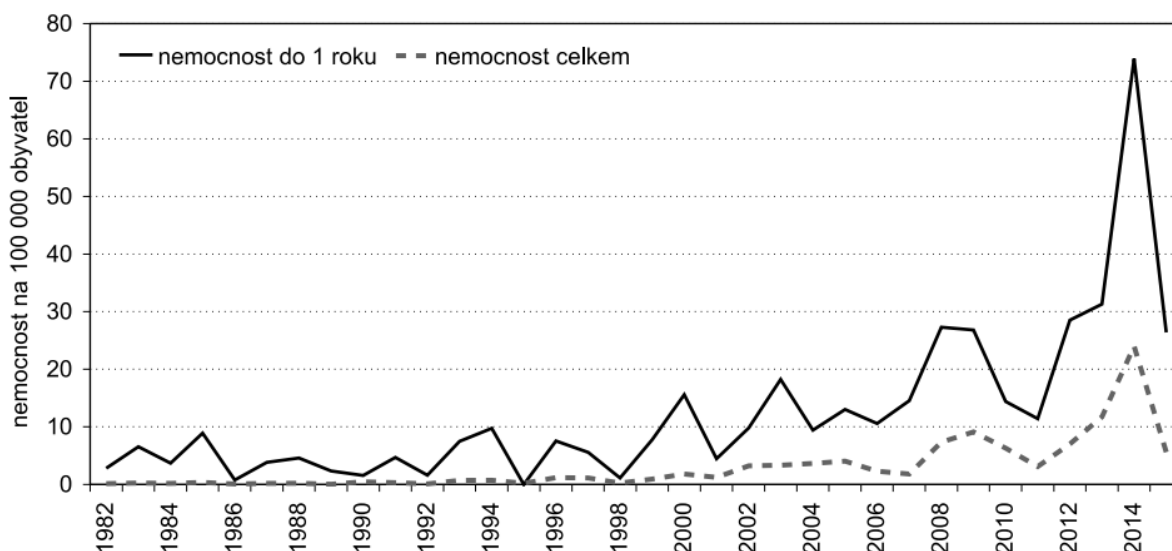
Tab. 1: Vlastnosti transmembránových pórů tvořených vybranými RTX cytotoxiny získané měřením pomocí černých lipidických membrán (charakteristika pórů proběhla v 0,15M KCl)

Organismus	RTX toxin	G [pS]	Iontová selektivita S _{kl/a} pro K ⁺ a Cl ⁻	Průměr póru [nm]	Reference
<i>E. coli</i>	HlyA	520	9	2,6	Benz <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> O157:H7	EhxA	550	10-15	2,6	Schmidt <i>et al.</i> , 1996
<i>A. pleuropneumoniae</i>	ApxI	540	5,7	2,4	Maier <i>et al.</i> , 1996
	ApxII	620	-	2,5	Maier <i>et al.</i> , 1996
	ApxIII	95	9,6	1,8	Maier <i>et al.</i> , 1996
<i>P. vulgaris</i>	HlyA	500	10	2,0	Benz <i>et al.</i> , 1994b
<i>M. morgani</i>	HlyA	520	9,5	2,0	Benz <i>et al.</i> , 1994b
<i>B. pertussis</i>	CyaA	10	10	0,6	Benz <i>et al.</i> , 1994a; Ehrmann <i>et al.</i> , 1991

V tabulce je vidět, že RTX hemolysiny tvoří ve většině případů póry s velmi podobnými parametry. To nasvědčuje tomu, že póry vznikají podobným mechanismem a mají podobné uspořádání. Póry tvořené RTX cytotoxiny jsou relativně velké póry o průměru kolem 2-3 nm a jsou silně selektivní pro kationty. Vzhledem k průměru póru by póry měly být neselektivní (volný průchod iontů pórem). Silná selektivita pro kationty je vysvětlována přítomností negativně nabitých aminokyselinových zbytků buď v ústí nebo lumen póru (Benz *et al.*, 1989, 1994b; Maier *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996). Vyjimku mezi RTX cytotoxiny tvoří CyaA *Bordetella pertussis*. CyaA tvoří výrazně menší póry. Důvodem je pravděpodobně přítomnost enzymatické AC domény a segmentu, který i připojuje k RTX hemolysinu.

3.2. *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je aerobní Gram-negativní kokobacilus. Jedná se o striktně lidský patogen způsobující dávivý kašel, též známý jako pertuse. *B. pertussis* je schopná koordinovaně produkovat několik faktorů virulence, které společným působením stojí za rozvinutím onemocnění. Faktory virulence *B. pertussis* jsou často děleny do dvou skupin na adhesiny a bakteriální toxiny. Transkripce genů podílejících se na patogenezí je regulována dvoukomponentovým systémem BvgAS, který zajišťuje optimální časování produkce jednotlivých faktorů virulence. Geny jsou regulovány jako odpověď na enviromentální stimuly (Seydlova *et al.*, 2017). *B. pertussis* je dobře přizpůsobená pro přežití v hostiteli pomocí modifikace a manipulace imunitní odpovědi. Mechanismus virulence *B. pertussis* se skládá z kaskády událostí iniciovaných adhezí bakterie na tracheální epitel. Jakmile dojde k adhezi, bakterie kolonizují dýchací cesty, kde odolávají obraným mechanismům hostitele. Příznaky pertuse se mezi jednotlivci liší. Typickým projevem je paroxysmálním kašel, který přetrvává týdny až měsíce. Onemocnění je často provázeno komplikacemi jako zápal plic, zánět středního ucha, encefalopatie, plicní hypertenze a v některých případech i selháním dýchacího systému a smrtí. Pertuse je nejnebezpečnější především u dětí do 5 let. Výskyt pertuse narůstá především v ekonomicky vyspělých zemích jako Austrálie, Kanada, Velká Británie a USA (Fedele *et al.*, 2013; Kilgore *et al.*, 2016). Podobný nárůst je vidět i České republice (Obr. 6) (Fabiánová *et al.*, 2016).



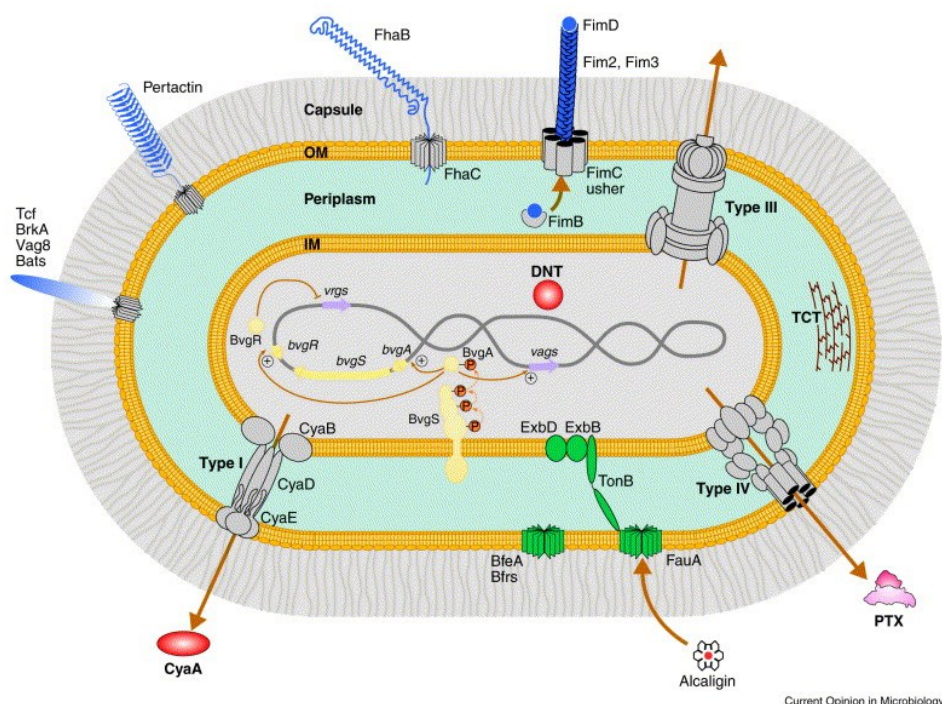
Obr. 6 : Výskyt pertuse v České republice mezi lety 1982-2015. (Převzato a upraveno podle Fabiánová *et al.*, 2016)

3.2.1. Faktory virulence *B. pertussis*

B. pertussis produkuje několik faktorů virulence, které společným působením umožňují účinnou kolonizaci hostitele (Obr. 7). První skupinou faktorů virulence jsou adheziny zodpovědné za přichycení bakterie k epitelu dýchacích cest. Adheziny jsou většinou povrchové struktury trvale přítomné na povrchu bakterie nebo jsou mezi prvními faktory virulence, jejichž produkce je při kolonizaci spuštěna. Při kolonizaci hraje významnou roli filamentózní hemagglutinin. FHA je sekretován na povrchu bakterie prostřednictvím pomocného proteinu FhaC. FHA zůstává vázan na povrch bakterie, kde funguje jako adhezín. Kromě adhezní funkce má FHA také imunomodulační vlastnosti, které mohou přispívat k potlačení vrozené i adaptivní imunity hostitele (Villarino Romero *et al.*, 2014). Dalším adhezínem jsou fimbrie (Fim). Fimbrie zodpovídají za vazbu k extracelulární matrix epiteliálních buněk dýchacích cest. Pertaktin se také podílí na adhezi bakterie. Poslední strukturou hrající roli v adhezi je lipopolysacharid (LPS). *B. pertussis* produkuje LPS s pentaacylovaným lipidem A (Fedele *et al.*, 2013).

Druhou skupinou faktorů virulence *B. pertussis* jsou bakteriální toxiny. Jedním z nejvýznamnějších je pertusový toxin (PT). Pertusový toxin je typický A-B toxin (Fedele *et al.*, 2013). Podjednotka A je ADP-ribosyltransferáza, podjednotka B zprostředkovává vazbu toxinu na cílovou buňku hostitele. Po vazbě toxinu dochází k jeho endocytóze. V endosomu je podjednotka A translokována do cytosolu, kde ADP-ribosyluje G-proteiny. ADP-ribosylací G-proteiny ztrácejí schopnost přenosu signálu. PT je sekretován z bakterie pomocí sekrečního

systému typu IV. Tracheální cytotoxin (TCT) je exotoxin produkovaný *B. pertussis* do prostředí. TCT hraje významnou roli především v časně fázi infekce přímým poškozením řasinkového epitelu. Třetím toxinem produkovaným *B. pertussis* je dermonekrotický toxin (DNT). DNT není sekretovaný ven z bakterie a jeho role v patogenezi není zcela jasná. Posledním toxinem je adenylát cyklázový toxin, o kterém je celá následující kapitola 3.3 (Fedele *et al.*, 2013; Locht *et al.*, 2001).



Obr.7: Faktory virulence *B. pertussis*. *B. pertussis* je Gram-negativní bakterie s vnitřní (IM) a vnější (OM) membránou, periplasmou a kapsulí. Adheziny Fim, FhaB a pertaktin jsou vyobrazeny v modré, toxiny PT, CyaA, DNT červeně, pomocné proteiny FhaC, FimB, FimC, sekreční systémy typu I, III a IV šedě. Hnědé šipky zobrazují směr exportu a importu faktorů virulence a sideroforů (převzato a upraven podle Locht *et al.*, 2001).

3.3. Adenylát cyklázový toxin

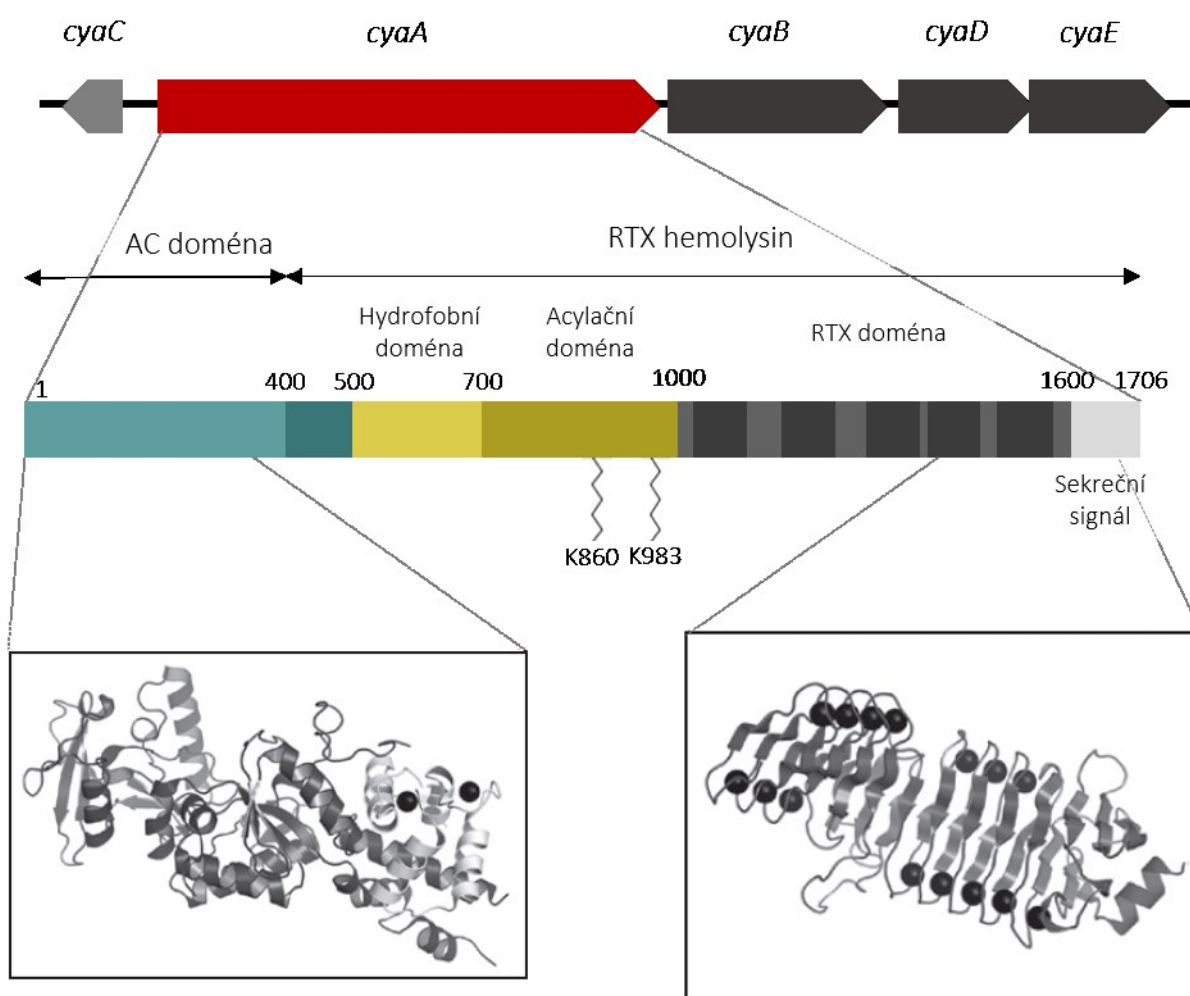
Adenylát cyklázový toxin (CyaA, ACT, AC-Hly) je bakteriální toxin patřící do skupiny RTX toxinů. CyaA je jedním z hlavních faktorů virulence patogenní bakterie *Bordetella pertussis*, původce dáivého kašle.

3.3.1. Struktura CyaA

Pět genů (*cyaCABDE*) nutných pro produkci a sekreci funkčního CyaA je kódováno společně v lokusu *cya* (Obr. 8). Gen *cyaA* kóduje samotný toxin, geny *cyaB*, *cyaD* a *cyaE* kódují proteiny zajišťující sekreci toxinu. Proteiny CyaB a CyaD jsou proteiny homologní proteinům HlyB a HlyD a mají stejnou funkci v sekreci toxinu. CyaE není homologní k TolC, ale hraje

jeho roli při sekreci CyaA (Glaser *et al.*, 1988). Poslední gen lokusu je *cyaC*, který je translatován v opačném směru než ostatní geny lokusu. Gen *cyaC* kóduje acyltransferázu, která je zodpovědná za posttranslační modifikaci mastnou kyselinou (Barry *et al.*, 1991). Acylace CyaA je nutná pro aktivaci neaktivní formy proCyaA, ve které je toxin produkován (Hackett *et al.*, 1995).

Molekula CyaA je tvořena 1706 aminokyselinovými zbytky a má molekulární hmotnost 177 kDa. CyaA je dělena do dvou hlavních domén. Na N-konci se nachází adenylát cyklázová doména (AC doména), která je tvořena přibližně 400 aminokyselinovými zbytky. Zbylých 1306 aminokyselinových zbytků je označováno jako tzv. RTX hemolysin. Ten je dále dělen do menších domén podle jejich funkce (Obr. 8).



Obr. 8: Organizace *cya* lokusu a primární struktury molekuly CyaA. Gen *cyaA* kóduje adenylát cyklázový toxin, geny *cyaBDE* kódují komponenty T1SS a gen *cyaC* kóduje acyltransferázu nutnou pro aktivaci toxinu. Na N-konci CyaA molekuly se nachází enzymatická AC doména se známou krystalovou strukturou (panel vlevo dole). RTX hemolysin obsahuje několik menších funkčních domén – hydrofobní, acylační a RTX. RTX doména váže do své struktury vápenaté ionty. Krystalová struktura části RTX domény je ukázána na panelu vpravo dole (Převzato a upraveno podle Guo *et al.*, 2005; Ladant a Ullmann, 1999, Motlová *et al.*, nepublikovaná data).

AC doména se skládá ze dvou menších částí T25 a T18. Pro aktivaci funkce AC domény je nutná vazba kalmodulinu (CaM). Ten se váže do části T18. V části T25 se nachází samotné katalytické místo zprostředkovávající přeměnu ATP na cAMP. Obě části AC domény jsou nezbytně nutné pro enzymatickou aktivitu toxinu (Glaser *et al.*, 1989; Ladant *et al.*, 1989). Na interakci mezi toxinem a kalmodulinem se podílí čtyři oblasti AC domény, které zajišťují svým tvarem vysokou afinitu kalmodulinu k toxinu. Hlavní roli v této interakci má tryptofan W242, který se dostává do kontaktu s hydrofobní kapsou kalmodulinu (Guo *et al.*, 2005).

RTX hemolysin se skládá z několika menších domén s různými funkcemi. Mezi aminokyselinovými zbytky 500-700 se nachází tzv. hydrofobní doména. V hydrofobní doméně je predikováno 5 amfipatických α -helixy, které se zanořují do membrány a tvoří transmembránový pór (Basler *et al.*, 2007; Benz *et al.*, 1994a; Osičková *et al.*, 1999; Rogel a Hanski, 1992). Segment 800-1000 se označuje jako acylační doména. Dochází zde k posttranslační aktivaci proCyaA acyltransferázou CyaC, která modifikuje toxin mastnou kyselinou na lysinech K860 a K983 (Hackett *et al.*, 1994, 1995). Acylace toxinu je nutná pro vazbu na receptor CD11b/CD18 (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Segment 1000-1600 obsahuje přibližně 40 RTX motivů. RTX motivy jsou organizovány do 5 bloků po 8-10 motivech. Bloky jsou odděleny flexibilními segmenty o 20-30 aminokyselinových zbytcích. Tato organizace je mezi RTX proteiny unikátní pro CyaA. RTX motivy váží do své struktury vápenaté kationty, což vede ke konformační změně segmentu a zaujmutí nativní konformace tzv. „ β -rollu“ (Bauche *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 1995). Na samém konci RTX segmentu se nachází tzv. „centrum skládání“, které iniciuje skládání celého segmentu do nativní konformace β -rollu (Bumba *et al.*, 2016). V oblasti RTX segmentu se také nachází vazebné místo pro receptor CD11b/CD18 (segment 1166-1281) (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003; Osicka *et al.*, 2015). Spolupráce všech segmentů RTX hemolysinu je nutná pro inserci toxinu do membrány a translokaci AC domény do cytosolu napadené buňky (Bellalou *et al.*, 1990). Na C-konci molekuly CyaA se nachází signální sekvence nutná pro sekreci toxinu pomocí sekrečního systému typu I (Šebo a Ladant, 1993).

3.3.2. Vazba toxinu na membránu

CyaA je schopný vazby na membrány širokého spektra buněk. Preferenčně se ale váže na specifický receptor, molekulu integrinu CD11b/CD18 (také známý jako $\alpha_M\beta_2$, CR3, Mac1), který se nachází převážně na makrofázích, neutrofilech a dendritických buňkách. Vazba toxinu na receptor je komplexní proces, který z velké části závisí na prostorovém uspořádání jak molekuly toxinu, tak molekuly receptoru. Molekula toxinu je schopná vazby na receptor pouze

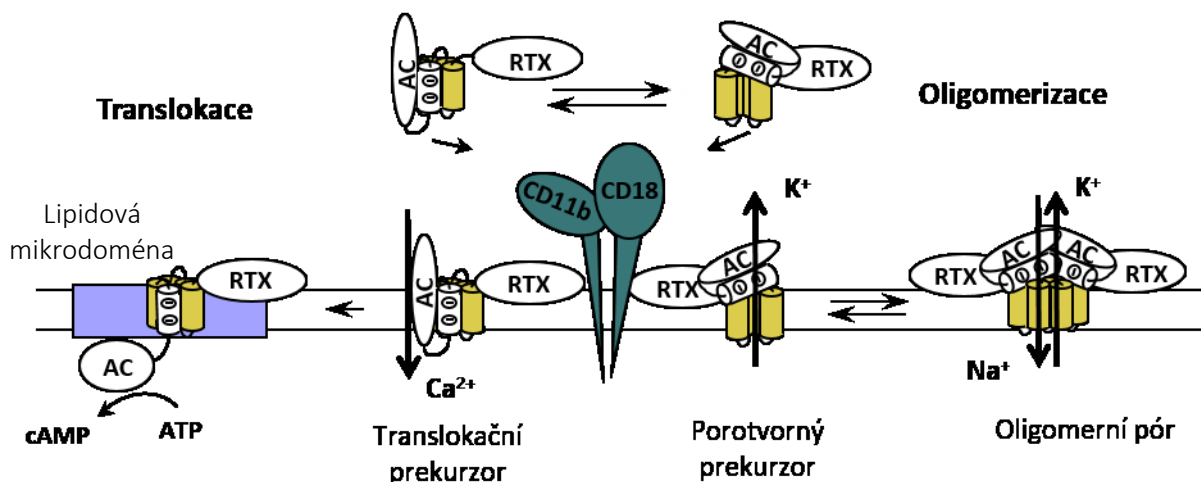
po navázání vápenatých kationtů (Guermónprez *et al.*, 2001). Vazba vápenatých iontů vede k zaujmutí nativní konformace β -rollu RTX segmentu, ale i zbytku molekuly. Vazebné místo pro receptor se nachází v RTX segmentu toxinu, konkrétně ve flexilním úseku mezi bloky II a III RTX motivů (1166-1281) (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Prostorové uspořádání receptoru je obdobně důležité. Integrin CD11b/CD18 patří do rodiny β 2 integrinů, které jsou zodpovědné za vazbu buněk imunitního systému a s tím spojenou signalizaci. β 2 integriny zaujímají tři možné konformace – tzv. „uzavřenou“, „intermediární“ a „otevřenou“ konformaci (Kinashi, 2006; Luo a Springer, 2006). CD11b/CD18 je silně N-glykosylovaný heterodimer. CyaA váže receptor v tzv. „uzavřené“ neaktivní konformaci. Pro vazbu jsou důležité glykanové řetězce nacházející se v C-koncové části CD11b podjednotky (Hasan *et al.*, 2015; Morova *et al.*, 2008). Změnou konformace receptoru dochází i k přeskupení glykanových řetězců. CyaA využívá několik glykanových řetězců pro vazbu receptoru. Odstanění několika řetězců vede ke snížení vazby toxinu. Vazba na neaktivní „uzavřenou“ formu receptoru je unikátní, ale pro toxin výhodné, neboť tato konformace receptoru vede k potlačení signalizačních drah vyvolávajících fagocytózu (Osicka *et al.*, 2015).

3.3.3. Funkce CyaA - pórtvorná aktivita CyaA a translokace AC domény

CyaA je toxin s dvojí funkcí. Současný model interakce CyaA s membránou, založený na mnoha nepřímých důkazech, předpokládá vznik dvou konformerů toxinu po inserci toxinu do membrány. Tyto konformery fungují jako prekurzory pro dvě odlišné funkce toxinu. Jedná se o tzv. translokační prekurzor, který umožňuje translokaci enzymově aktivní AC domény do cytosolu buněk, a tzv. pórtvorný prekurzor, který umožňuje tvorbu malého transmembránového póru selektivního pro kationty (Obr. 9). Oba prekurzory se vyskytují v určité rovnováze, kterou lze ovlivnit např. acylací neaktivní formy CyaA, teplotou, přítomností vápenatých iontů, vazbou protilátek nebo mutagenézí hydrofobní domény toxinu (Gray *et al.*, 2001; Osickova *et al.*, 2010; Osíčková *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 1995). Obě výsledné aktivity toxinu spolupracují za účelem vyvolání maximální cytotoxické aktivity toxinu (Basler *et al.*, 2006; Hewlett *et al.*, 2006).

Přesný mechanismus translokace AC domény zatím není znám. K translokaci dochází rychlým krokem nezávislým na endocytóze. K translokaci je potřebný negativní membránový potenciál na cytoplasmatické membráně (Otero *et al.*, 1995; Veneziano *et al.*, 2013). V nedávné době bylo publikováno několik studií, které naznačují, že roli v translokaci AC domény má unikátní segment 400-500, nacházející se mezi samotnou AC doménou a hydrofobní doménou

zodpovědnou za tvorbu pórů. Podrobnější přehled současných znalostí je v kapitole 3.3.4 (Role segmentu 400-500).



Obr. 9: Model nezávislého působení translokačního a pórotvorného prekurzoru toxinu CyaA a jejich interakce s membránou (převzato a upraveno podle Masin *et al.*, 2015).

Insertce translokačního prekurzoru vede k vytvoření nového typu póru, který umožňuje vstup vápenatých kationtů do cytosolu buňky z extacelulárního prostředí (Fišer *et al.*, 2007). Zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytosolu vede k aktivaci proteázy kalpain, která je schopná štěpit protein talin. Talin kotví integrinový receptor CD11b/CD18 k cytoskeletu buňky. Odstěpení receptoru od cytoskeletu vede k uvolnění komplexu toxin-receptor. Mobilní komplex se v membráně přesouvá do mikrodomén bohatých na cholesterol, kde konečně dochází k translokaci AC domény do cytosolu buňky (Bumba *et al.*, 2010). AC doména může být dále odštěpena do zbytku molekuly pomocí proteázy kalpain a uvolněna do cytosolu (Uribe *et al.*, 2013). Enzymatická aktivita AC domény je v cytosolu aktivována kalmodulinem. Aktivovaná AC doména s vysokou účinností konvertuje vnitrobuněčné ATP na cAMP.

Kombinace vstupu vápenatých kationtů pomocí póru tvořeného translokačním prekurzorem a úniku draselných kationtů z buňky vede ke zpomalení endocytózy toxinu. Díky tomu vzniká tzv. pozitivní zpětná vazba, která zvyšuje cytotoxickou aktivitu toxinu (Fiser *et al.*, 2012).

Paralelně s aktivitou translokačního prekurzoru se projevuje i aktivita tzv. pórotvorného prekurzoru. Po inserci pórotvorného prekurzoru do membrány dochází k oligomerizaci toxinu (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). Tím vznikají malé transmembránové póry (průměr 0,6-0,8 nm) selektivní pro kationty (Benz *et al.*, 1994a). Póry způsobují únik draselných iontů z buňky, který vede k aktivaci několika signálních kaskád uvnitř buňky (Fiser *et al.*, 2012; Wald *et al.*,

2014). Pórotvorná aktivita CyaA společně se signalizací pomocí TLR (z ang. Toll-like receptor) podporují aktivaci NALP3 inflamazomu, který aktivuje kaspázu 1. Aktivní kaspáza 1 katalyzuje aktivaci interleukinu IL-1 β , který hraje důležitou roli při infekci a zánětu. Aktivní kaspáza také navozuje programovanou buněčnou smrt, tzv. pyroptózu (Dunne *et al.*, 2010).

3.3.4. Role segmentu 400-500

O roli segmentu 400-500 v biologické aktivitě CyaA toho dodnes není příliš mnoho známo. Sekvenčně se jedná o unikátní segment nenacházející se v žádném z ostatních RTX cytotoxinů. Dřívější studie zabývající se interakcí toxinu s membránou ukázaly, že segment 1-489 se váže na membránu, zatímco kratší segment 1-384 (AC doména) vazby na membránu není schopen. Navíc bylo ukázáno, že delší segment 1-489 je schopen měnit svoji strukturu mezi rozpustnou formou a formou navázanou do membrány. Takovéto změny konformace jsou pro pórotvorné toxiny typické. Pokud byl z CyaA deletován pouze úsek 384-489, translokace AC domény neprobíhala vůbec, zato se dramaticky zvedla hemolytická aktivita CyaA (Karst *et al.*, 2012). Dále bylo také ukázáno, že delece 6-489 vede ke zvýšení hemolytické aktivity toxinu, pórotvorné aktivity toxinu a tvorbě pórů s vyšší vodivostí (Gray *et al.*, 2001; Masin *et al.*, 2013). Nedávno bylo také ukázáno, že krátký syntetický peptid 454-484 zaujímá α -helikální strukturu v prostředí membrány. Peptid interaguje s membránou obsahující negativně nabitě fosfolipidy a membránu destabilizuje (Subrini *et al.*, 2013).

4. Materiál a metody

4.1. Chemikálie a další materiál

4.1.1. Seznam použitého materiálu a chemikálií

- 5(6)-karboxyfluorescein (Sigma Aldrich)
- Akrylamid (Biochemical Corp.)
- Ampicilin (Biotika)
- Amoniumperoxodisulfát (Serva)
- Ampicilin (Biotika)
- Bacto-tryptone (Oxoid)
- Bromfenolová modř (Sigma Aldrich)
- Butanol (Fluka)
- Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
- Dekan (Sigma Aldrich)
- Diethylaminoethan-Sepharoza (Sigma Aldrich)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Fluka)
- Dimethylformamid
- Diolelylfosfatidylglycerol (Avanti Polar Lipids)
- Diolelylfosfatidylcholin (Avanti Polar Lipids)
- Diolelylfosfatidyletanolamin (Avanti Polar Lipids)
- Dithiotreitol (Stratagene)
- Dodecylsírán sodný (Serva)
- Ethanol 96% (Penta)
- Glycerol (Penta)
- Hovězí sérový albumin (Bio-Rad Laboratories)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Roth)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- Chlorid amonný (Lachema)
- Chlorid draselný (Lachema)
- Chlorid sodný (Lachema)
- Chlorid vápenatý (Lachema)
- Chloroform (Sigma Aldrich)
- Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (Sigma Aldrich)
- Kvasničný extrakt (Oxoid)
- Kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová (Fluka)
- Kyselina askorbová (Lach-Ner)
- Kyselina ethylendiaminotetraoctová (Lachema)
- Kyselina chloristá (Penta)
- Kyselina octová (Lachema)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Lachema)
- Metanol (Fluka)
- Močovina (Merck)
- Molybdenan amonný (Lach-Ner)
- Pentan (Sigma Aldrich)
- Phenyl-Sepharoza (Sigma Aldrich)
- Sephadex G-50 (Sigma Aldrich)
- Sírán sodný (Lachema)
- Sójový azolektin 11145 (Sigma Aldrich)

- Tetramethylethyldiamin (Serva)
- Thiamin (Sigma)
- Tris(hydroxymetyl)aminometan (Serva)
- TritonX-100 (Serva)

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty

4.1.2. Použité plasmidy

Plazmid pT7CACT1 (Osička *et al.*, 2000) o velikosti 8,8 kb nese gen *cyaA* kódující CyaA a gen *cyaC* kódující protein nezbytný k posttranslační modifikaci CyaA. Oba geny jsou pod kontrolou indukovatelného *lac* promotoru. Navíc plazmid nese i gen pro rezistenci k ampicilinu. Tento plazmid byl používán pro mutagenezi genu *cyaA* a k produkci CyaA.

4.1.3. Bakteriální kmeny

Pro intracelulární expresi CyaA byl používán bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 Blue (*E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'pro AB lac IqZ M15 Th10 (Tetr)]C*). Tento bakteriální kmen nese gen pro rezistenci na tetracyklin.

4.1.4. Kultivační média

LB médium (Luria-Bertani médium) – bacto-tryptone 10 g/l, kvasničný extrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,0

MDO médium – KH₂PO₄ 1 g/l, K₂HPO₄ 3 g/l, NH₄Cl 2 g/l, Na₂SO₄ 0,5 g/l, thiamin 10 mg/l, kvasničný extrakt 20 g/l, glycerol 20 g/l

Média byla sterilizována autoklávováním při tlaku 0,12 MPa po dobu 20 minut.

Pro přípravu pevného kultivačního média bylo do předem připraveného LB média před sterilizací přidáno 18 g/l bakteriálního agaru. Po sterilizaci a před kultivací bakterií byla do média přidána příslušná antibiotika podle potřeby.

4.2. Metody a pracovní postupy

4.2.1. Uchování bakteriálních kmenů

Kmen *Escherichia coli* XL1-Blue byl krátkodobě uchováván na Petriho miskách s pevným LB médiem s tetracyklinem. Dlouhodobě byl uchováván v glycerolu při -80°C (40% glycerol byl smíchán s kulturou narostlou do stacionární fáze v příslušném tekutém médiu v poměru (1:1). Bakteriální kmen vzniklý transformací příslušné plazmidové DNA do

kompetentních buněk *E. coli* byl krátkodobě uchován na Petriho miskách s pevným LB médiem při 4°C s příslušnými antibiotiky.

4.2.2. Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

Do 50 µl suspenze kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue byl přidán 1 µl plazmidové DNA a obsah byl opatrně zamíchán. Mikrozkuhavka se směsí byla umístěna na 5 minut na led, poté rychle přenesena do vodní lázně o 37°C na 5 minut a poté vrácena zpět na led na 2 minuty. Do mikrozkuhavky byl přidán 1 ml přehřátého LB média a mikrozkuhavky byly vloženy do vodní lázně o 37°C na 30 minut. Nakonec bylo 150 µl suspenze rozetřeno na agarovou LB plotnu s ampicilinem o výsledné koncentraci 150 µg/ml a plotna byla inkubována 12-16 hodin při 37°C.

4.2.3. Příprava močovinového extraktu toxinu

Použité roztoky:

TC pufr – 50 mM Tris-HCl, 0,2 mM CaCl₂, pH 8,0

Protokol vychází z publikace Osička *et al.*, 2000.

Několik bakteriálních kolonií nesoucí plasmid s rekombinantním CyaA bylo zaočkováno do 50 ml tekutého MDO média s ampicilinem (výsledná koncentrace 150 µg/ml). Za intenzivního třepání byla bakteriální kultura inkubována 10-16 hodin při 37°C. Následně bylo 5 ml suspenze přeočkováno do 500 ml MDO média s ampicilinem (150 µg/ml) přehřátého na 37°C. Bakteriální suspenze byla dále kultivována až do dosažení OD₆₀₀ = 0,6. Do kultury byl přidán roztok IPTG do výsledné koncentrace 1 mmol/l. Přidání IPTG vede k indukci exprese CyaA z LacZ operonu. Po přidání IPTG byla kultura inkubována za intenzivního třepání při 37°C po dobu 4 hodin. Poté byla kultura přenesena na led. Bakteriální kultura byla dále zcentrifugována při 6000xg, 10 minut při 4°C (Biofuge, Kendro). Pelet byl resuspendován v 10 ml TC pufru. Při expresi v *E. coli* se CyaA neuvolňuje do média, ale zůstává v cytoplasmě buněk v podobě inkluzních tělísek. Proto je nutné rozrušit buněčnou stěnu bakterií sonikací. Suspenze byla sonikována (4 minuty, výkon 50 W, 4°C) (Braun) což vedlo k rozrušení buněčných stěn. Dále byla suspenze opět centrifugována při 18 000xg po dobu 30 minut při 4°C (Sorvall OTD Combi, Du Pont Instruments). Supernatant byl následně odstraněn a membrány byly odmyty pufrům (50 mM Tris, 4M močovina, pH 8,0). K peletu bylo přidáno 4,8 g močoviny a 6 ml roztoku Tris-HCl (50mM, pH 8). Obsah zkuhavky byl pomalu promíchán po dobu 45 minut až do úplného rozpuštění močoviny. Nakonec byl obsah zkuhavky

zcentrifugován (18000xg, 30 minut). Supernatant (močovinový extrakt) obsahující extrahovaný CyaA byl uchováván při -20°C.

4.2.4. Purifikace toxinu chromatografií na DEAE-Sepharoze

Použité roztoky:

UTN-A pufr – 8 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH 8,0

UTN-B pufr – 8M močovina, 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8,0

Protokol pro purifikace pomocí DEAE-Sepharozy a Phenyl-Sepharozy vychází z publikace Karimova *et al.*, 1998.

Chromatografická kolona byla naplněna přibližně 10 ml suspenze DEAE-Sepharozy ve 20% etanolu. Etanol byl z kolony odstraněn přibližně 100 ml deionizované vody. Kolona byla ekvilibrována UTN-A pufrem až do ustálení pH v koloně (stejně jako pufr). Do připraveného močovinového extraktu byl přidán NaCl do výsledné koncentrace 50 mM. Upravený extrakt byl dále nanesen na kolonu, kde byl CyaA zachycen a většina ostatních proteinů byla odmyta ekvilibračním pufrem. Poté byl CyaA eluován pomocí UTN-B pufru s vyšší koncentrací NaCl (200 mM). Eluční frakce byly jímány po 2 ml. Průběžně u nich byla stanovována přibližná koncentrace proteinu pomocí metody Bradfordové (10 µl frakce a 90 µl činidla Bradfordové, kapitola 4.2.6.). Zastoupení jednotlivých proteinů ve frakcích bylo zjištěno pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) (kapitola 4.2.7.).

4.2.5. Purifikace toxinu chromatografií na Phenyl-Sepharoze

Použité roztoky:

TN-B pufr – 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0

UTE pufr – 8 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0

Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml gelu Phenyl-Sepharozy ve 20% etanolu. Kolona s chromatografickou náplní byla nejprve promyta deionizovanou vodou a následně ekvilibrována přibližně 20 ml TN-B pufrem. Vzorek s toxinem po purifikaci pomocí DEAE-Sepharozy, který byl zředěn 4x v TN-B pufrem a 3x nanesen na kolonu s Phenyl-Sepharozou. Následně byla kolona promyta 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8). Toxin byl z kolony eluován UTE pufrem, jednotlivé frakce byly jímány po 1 ml. Množství obsaženého proteinu bylo průběžně

přibližně stanoveno metodou Bradfordové (kapitola 4.2.6.). Zastoupení jednotlivých proteinů bylo zjištěno pomocí analýzy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, kapitola 4.2.7.).

4.2.6. Stanovení množství proteinu metodou Bradfordové

Použité roztoky:

Činidlo Bradfordové – 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 47% (v/v) etanol, 8,7% (v/v) H_3PO_4 .

Metoda Bradfordové je kolorimetrická metoda pro stanovení obsahu proteinu ve vzorku. Metoda využívá změnu absorbance barvy Coomassie Brilliant Blue R250. Jelikož je potřeba měřit absorbanci vzorků, je potřeba připravit sérii kalibračního standardu po 100 μl v roztoku používaném k přípravě vzorku tak, aby její rozsah koncentrací byl v rozmezí 10-100 μg proteinu/ml. V našem případě byl jako standard využit BSA o výchozí koncentraci 2 mg/ml. Dále byla také připravena ředící řada měřeného vzorku po 100 μl . Do jedné zkumavky bylo přidáno pouze 100 μl samotného pufru pro měření pozadí. Poté bylo do všech mikrozkušavek přidáno 900 μl činidla Bradfordové a vzorky byly důkladně promíchány na laboratorním přístroji vortex. Po 15 minutách inkubace vzorků při pokojové teplotě byla změřena absorbance při 595 nm. Nameřené hodnoty absorbancí byly vyneseny do grafu proti koncentraci BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Tímto způsobem byla sestavena kalibrační křivka, a podle ní byla určena koncentrace CyaA v jednotlivých vzorcích.

4.2.7. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Použité roztoky:

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE – 50 mM Tris-HCl (pH 6,8), DTT 100 mM, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, 10% (v/v) glycerol

Barvicí roztok pro SDS-PAGE – 225 ml metanol, 225 ml H_2O , 50 ml kyselina octová, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R250

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE – 250 ml metanol, 650 H_2O , 100 ml kyselina octová

Uchovávací roztok pro SDS-PAGE – 75 ml H_2O , 25 ml glycerol

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE 5% - 266 μl akrylamid, 1,23 ml H_2O , 200 μl Tris (1 M, pH 6,8), 60 μl SDS (10%), 20 μl APS (25%), 20 μl TEMED

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 7,5% - 1,24 ml akrylamid, 1,8 ml H₂O, 1,87 ml Tris (1 M, pH 8,8), 50 ul SDS (10%), 12,5 ul APS (25%), 12,5 ul TEMED

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu byla využita pro zjištění zastoupení jednotlivých proteinů při přípravě a purifikaci CyaA. K 15 µl močovinového extraktu (kapitola 4.2.3.) nebo purifikovaného proteinu (kapitoly 4.2.4. a 4.2.5.) bylo přidáno 5 µl 5x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE, vzorky byly promíchány a zahřáty na 100°C po dobu 5 minut. Následně byl připraven 7,5% rozdělovací gel a 5% zaostřovací gel. Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 1 V/cm (30 mA) po dobu 1 hodiny v tris-glycinovém pufru pH 8,3. Poté byl gel vyjmut z přístroje a obarven v barvicím roztoku s Coomassie blue R250. Následně byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku a po odbarvení byl přenesen do uchovávacího roztoku. Gely byly skladovány vysušené v celofánové fólii.

4.2.8. Černé lipidické membrány (Black lipid membrane – BLM)

Použité roztoky:

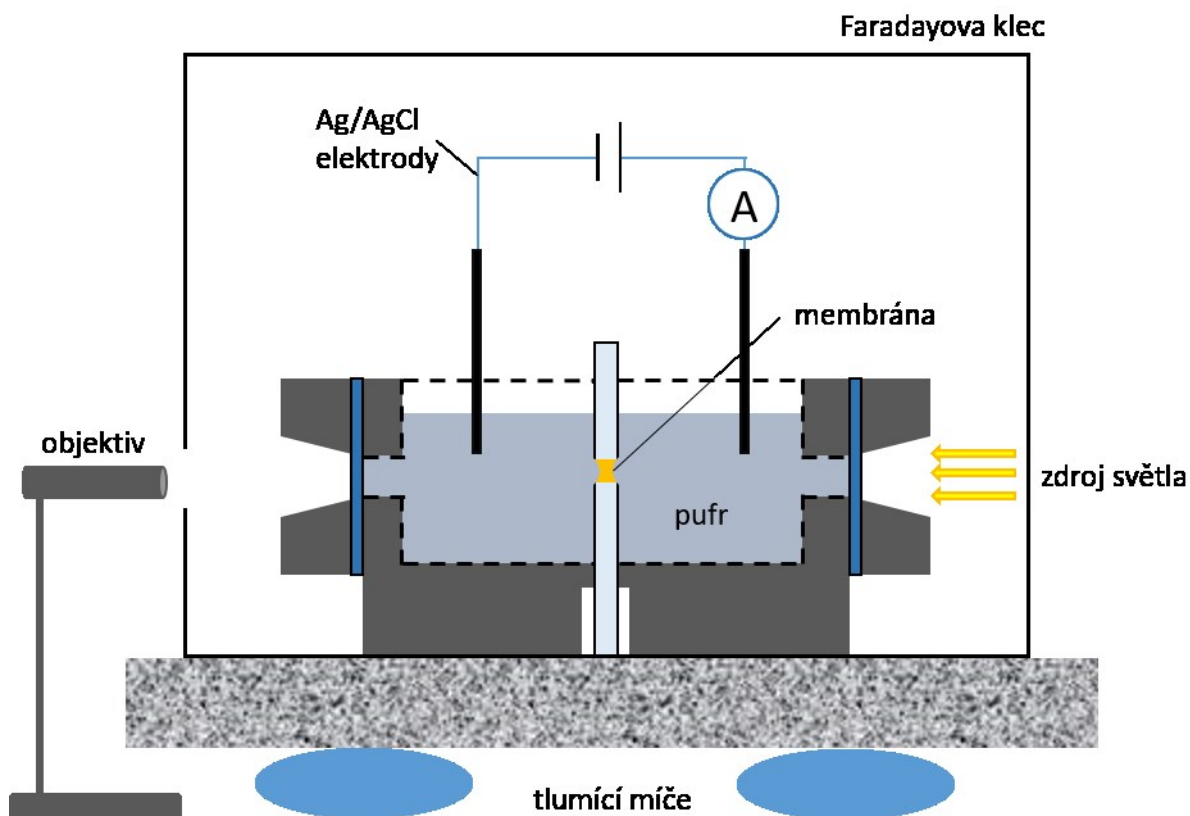
Měřicí pufr – 0,15 M KCl, 10 mM Tris, 2 mM CaCl₂, pH 7,4

Metoda černých lipidových membrán je technicky nenáročná metoda, která umožňuje velmi detailní sledování pórotvorné aktivity zkoumané látky. Metoda využívá znalosti fyzikálně chemických vlastností lipidových membrán. Jméno metoda získala díky interferenci odrážejícího se světla na rozhraní vody a lipidů. Když dojde ke ztenčení lipidové vrstvy na ¼ vlnové délky světla, membrána se zdá být černá (Tien a Dawidowicz, 1966). Metoda využívá tvorby planární membránové dvojvrstvy na apertuře v přepážce oddělující dva kyvetové prostory. Membrány mohou být tvořeny lipidy izolovanými z buněk nebo směsí syntetických fosfolipidů o známém složení.

Existují různé přístupy pro vytvoření membrány. První je Muellerova metoda (Mueller *et al.*, 1962). Lipidy, ze kterých bude tvořena membrána, jsou rozpuštěny v organickém rozpouštědle (nejčastěji dekan). Suspenze lipidů je následně nanášena přes aperturu v přepážce. Nevýhodou této metody je přítomnost rozpouštědla v hydrofobním jádře dvojvrstvy. Druhý přístup je Montal-Muellerova metoda. V tomto případě je nanášena monovrstva lipidů na povrch vodního pufru v obou kompartmentech. Poté jsou hladiny pufru sníženy pod úroveň otvoru v přepážce a opět zvednuty. Tím je vytvoří dvojvrstva přes otvor v přepážce. Velkou výhodou tohoto přístupu je možnost tvorby asymetrických dvojvrstev (Montal a Mueller, 1972). Lipidová membrána funguje jako perfektní izolátor. I malé narušení membrány lze lehce zaznamenat jako změnu elektrického proudu procházející přes membránu. Velkou výhodou

metody je možnost měnit podmínky na obou stranách membrány, jako je například aplikace napětí na membránu (což simuluje membránový potenciál na buňkách).

Aparatura pro BLM měření se skládá z teflonové komůrky (zakázková výroba Sipoch) se dvěma kyvetovými prostory oddělenými teflonovou přepážkou. V přepážce je apertura o ploše $0,6 \text{ mm}^2$. Membrána je vytvářena přes aperturu přepážky. Do obou kyvetových prostorů jsou zavedeny Ag/AgCl elektrody. Pomocí 100 GV/A zesilovače (MIT), záznamové PCI karty KPCI-3108 (Keithley Instruments) a specializovaného software BLM2 (vytvořený na míru na MFF UK v Praze Doc. RNDr. Jiřím Bokem, CSc.) je zaznamenáván elektrický proud procházející přes membránu. Záznam proudu je sledován a charakter aktivity sledované látky je vyhodnocován. Schéma aparatury je znázorněno na obr. 10.



Obr. 10: Schéma aparatury pro měření na černých lipidových membránách

Před každým měřením byla teflonová měřicí komůrka opakovaně důkladně vymyta destilovanou vodou a etanolem, čímž se odstranily případné nečistoty a zbytky lipidů. Aparatura byla poté vysušena pentanem. Teflonové přepážky byly uchovávány v etanolu a omyty obdobným způsobem. Po sestavení měřicí komůrky byl do obou kyvet přidán 1 ml

měřicího pufru. Symetrie elektrod byla ověřena před každým měřením a napětí na membráně bylo nastaveno na 50 mV. Roztok lipidů byl následně nanesen před aperturu v teflonové přepážce. Muellorovou metodou byla vytvořena membrána. Stabilita membrán a čistota komůrky byla ověřena vytvořením a úmyslnou destrukcí několika kontrolních membrán. Pokud několik membrán opakovaně bez problémů vydrželo přibližně půl hodiny, byl systém považován za připravený pro měření zkoumané látky. Membrány byly během celého experimentu také kontrolovány opticky. Sledovaná agens byla přidána do cis kyvety na výslednou koncentraci a obsah kyvety byl důkladně promíchán (optimálně bez porušení dvojvrstvy).

Pro analýzu záznamu proudu (I) byl použit program QuB (<http://www.qub.buffalo.edu/>), pomocí něhož byl zaznamenaný proud filtrován 10Hz filtrem, který odstraňuje značné množství šumu záznamu. V záznamu byly analyzovány tři typy informací – celková aktivita toxinu, vodivost jednotlivých pórů tvořených toxinem a doba života jednotlivých pórů.

Celková aktivita je veličina, která komplexně popisuje interakci toxinu s membránou. Pro měření je využita standardní koncentrace toxinu 1 nM.

Vodivost jednotlivých pórů se získává sledováním skokových změn elektrického proudu procházejícího přes membránu. Proud protékající membránou bez zabudovaného póru je považován za bazální hladinu. Každý skokový nárůst proudu je považován za otevření nebo zabudování póru. Rozdíl těchto hladin elektrického proudu slouží k výpočtu vodivosti jednotlivých pórů. Vodivost je vypočítána jako převrácená hodnota odporu, tedy podle vzorce

$$G = \frac{I}{U}$$

kde G je vodivost a má jednotky Siemens [S] = [Ω^{-1}], I je elektrický proud v ampérech [A] a U je napětí na elektrodách a tedy i na membráně vyjádřené ve voltech [V]. Hodnoty vodivosti jednotlivých pórů byly vyneseny v histogramu. Histogramy byly vytvářeny pomocí metody jádrového odhadu (Kernel Density Estimation – KDE). KDE je neparametrický způsob určení hustoty distribuce pravděpodobnosti náhodných proměnných. Tato metoda využívá vykreslení funkcí pro každý pozorovaný datový bod a jejich následný součet. Oproti standardnímu histogramu je výsledné vynesení hladké s větší citlivostí pro lokální maxima a minima. Výsledné vynesení pomocí KDE poskytuje mnoho bodů pro následné prokládání funkcí a výpočet sledovaných veličin (Murray Rosenblatt, 1956; Parzen, 1962).

Doba života jednotlivých pórů byla vypočítána z přibližně 1000 jednotlivých událostí minimálně z 10 membrán. Z naměřených dob otevření póru byl sestaven histogram. Histogramem byly následně proloženy dvě exponenciální funkce podle rovnice:

$$f(t) = \sum_{i=1}^2 \alpha_i e^{-(t+s)/\tau_i}$$

kde α vyjadřuje amplitudu exponenciální funkce ($\alpha_1 + \alpha_2 = 1$), t je čas, po který je pór otevřený [ms], s je posun exponenciální funkce [ms] (hodnota je dána použitým zesilovačem, jedná se o časové rozlišení aparatury, $s = 75$ ms) a τ je hodnota doby života póru. Díky velké citlivosti naší aparatury byly zaznamenávány i krátká otevření pórů. Z tohoto důvodu byl histogram prokládána dvěmi exponenciálními funkcemi, ze kterých byly následně vypočítány dvě hodnoty doby života jednotlivých pórů. Kratší doba života (pohybují se kolem 100 ms) odpovídá krátkým fluktuacím mezi otevřeným a zavřeným stavem póru. Delší doba života jednotlivých pórů popisuje stabilnější póry s nižší molekulární dynamikou.

4.2.9. Příprava lipozómů

Použité roztoky:

CF pufr – 50 mM 5(6)-karboxyfluorescein, 5 mM HEPES, pH 7,4

Měřicí pufr – 0,15 M KCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4

Do skleněných zábrusových zkumavek bylo přidáno 1,5 mg syntetických lipidů, případně azolektinu. Lipidy byly dále rozpuštěny ve 2 ml chloroformu. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky (INGOS RVO 400) do sucha při opatrném zahřívání na 37°C při tlaku 50-200 mbar. Odpařením rozpouštědla vznikl ve zkumavkách tenký lipidový film. V případě vytvoření zakaleného lipidového filmu, byly lipidy opětovně rozpuštěny ve směsi chloroform: metanol 2:1 (v/v) a odpařeny do sucha.

K lipidovému filmu byl přidán 1,5 ml CF pufru. Zkumavky byly opakovaně (šestkrát) zahřívány ve vodní lázni (37°C) po dobu 5 minut a intenzivně třepány na laboratorní přístroji vortex opatřeném platformou na zkumavky po dobu 10 minut. Tím vznikla suspenze vícevrstevných lipozómů. Pro získání jednovrstevných lipozómů byl použit přístroj LiposoFast (Avestin), kterým byla suspenze 11krát protažena přes filtr s otvory 100 nm. Volná sonda byla ze suspenze odstraněna gelovou filtrací na koloně se Sephadexem G-50. Sephadex G-50 byl předem hydratován po dobu 3 hodin při pokojové teplotě ve vnějším pufru. Tímto jsme získali

suspenzi liposomů, obsahující CF pufr, v měřicím pufru. Při filtraci byly sbírány jednotlivé frakce po cca 0,5 ml, ve kterých byla následně stanovena koncentrace fosfátu (kapitola 4.2.10.). Vybrané frakce byly naředěny měřicím pufrům na výslednou koncentraci fosfátu pro měření úniku sondy z lipozómů (kapitola 4.2.11.).

4.2.10. Stanovení koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů

Koncentrace fosfátu v suspenzi lipozómů byla stanovena kolorimetrickou reakcí, při které vzniká fosfomolybdenová modř. V několikrát destilovanou vodou vypláchnuté a následně důkladně vysušené skleněné zkumavce bylo smícháno 100 μ l suspenze připravených lipozómů a 0,5 ml 70% HClO_4 . Tato směs byla mineralizována v mineralizačním boxu 60 minut při 180°C. K mineralizovaným vzorkům bylo přidáno 3,4 ml deionizované vody a 0,5 ml 2,5% (w/v) roztoku molybdenanu amonného. Po důkladném promíchání směsi pomocí přístroje vortex, bylo do vzorků přidáno 0,5 ml 10% (w/v) roztoku kyseliny askorbové. Vzorky byly opět důkladně promíchány a následně inkubovány ve vodní lázni při 100°C po dobu 5 minut. Po inkubaci a ochlazení vzorků byla změřena absorbance (Beckman Coulter DU730) při 820 nm proti destilované vodě.

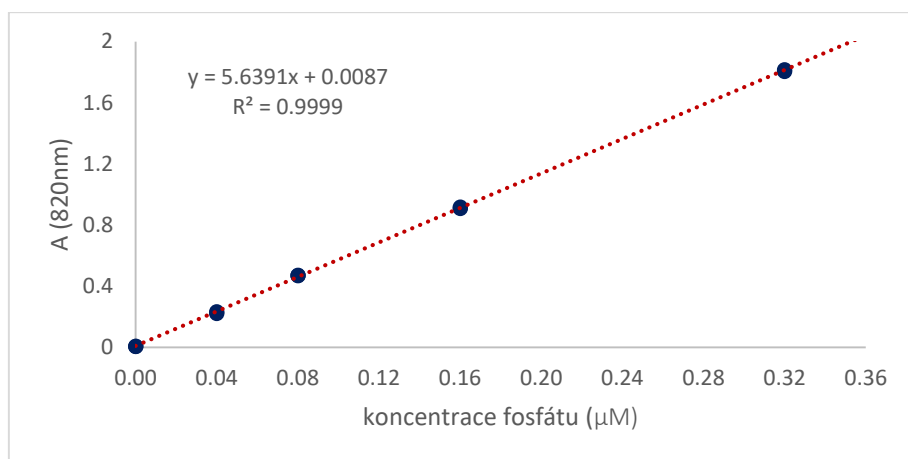
Koncentrace fosfátu ve vzorcích byla odečtena z kalibrační přímky. Kalibrační přímka byla získána měřením absorbance roztoků o známé koncentraci fosfátu připravených podle tabulky 2.

Tab. 2: Kalibrace stanovení koncentrace fosfátu

Koncentrace fosfátu ($\mu\text{mol/l}$)	0,2 mM zásobní roztok fosfátu (ml)	Deionizovaná voda (ml)
0	0	7
0,04	0,4	6,6
0,08	0,8	6,2
0,16	1,6	5,4
0,32	3,2	3,8

Ke standardům byl přidán 1 ml 70% HClO_4 a 1 ml 2,5% roztoku molybdenanu amonného. Standardy byly důkladně promíchány a poté k nim byla přidán 1 ml 10% kyseliny askorbové. Standardy byly inkubovány ve vodní lázni při 100°C po dobu 5 minut. Po zchlazení byla změřena jejich absorbance.

Pro každý pokus byla změřena nová kalibrační křivka (Obr. 11) (připravená z čestvě namíchaných roztoků molybdenanu amonného a kyseliny askorbové). Kalibrační řada byla vždy připravena v duplikátu a pro vytvoření kalibrační přímky byly použity průměry hodnot absorbance.



Obr. 11: Kalibrační přímka závislosti absorbance na koncentraci fosfátu

4.2.11. Únik fluorescenční sondy z lipozómů

Měření úniku fluorescenční sondy z liposomů nám umožňuje sledovat permeabilizační účinky zkoumaných látek na cílovou membránu a vzájemně je porovnávat. Do kyvet z křemenného skla o minimálním objemu 50 μl byla přidána suspenze liposomů o známé koncentraci fosfátu. Kyveta byla umístěna do přístroje Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Horiba). Vlnová délka excitačního zářezí byla 480 nm, intenzita emisního záření byla měřena při 515 nm. V kyvetovém prostoru byla udržována konstantní teplota 25°C plynulým prouděním vody. Při každém měření byla nejprve změřena basální hladina intenzity fluorescence (IF_0) (pozadí – volná sonda v suspenzi liposomů) po dobu přibližně 20 s. Následně bylo přidáno požadované množství sledované agens (vždy stejný objem 2 μl) a suspenze byla opatrně a důkladně promíchána automatickou pipetou. Na závěr experimentu byl do suspenze liposomů přidán TritonX-100 na výslednou koncentraci 0,02%, čímž bylo dosaženo úplné destrukce liposomů a uvolnění vškeré fluorescenční sondy, tedy k dosažení maximální intenzity fluorescence (IF_{max}). Hrubá data byla následně normalizována na maximum a vyjádřena v procentech lyze pomocí rovnice:

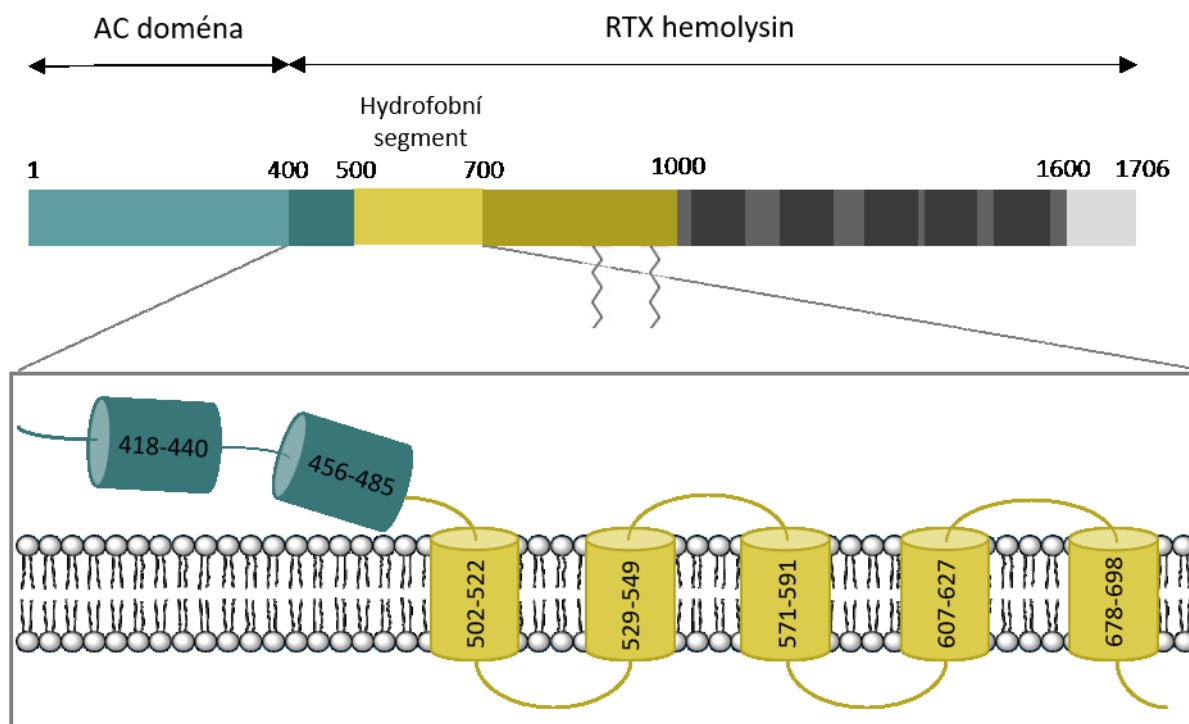
$$\% lyze = \frac{IF - IF_0}{IF_{max} - IF_0} \times 100$$

5. Výsledky

Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat roli segmentu 400-500 CyaA v interakci toxinu s membránou. Tato práce v mnohém navazuje na práce pocházející z naší laboratoře a další recentní publikace zabývající se tematikou CyaA.

5.1. Charakteristika pórotvorné aktivity mutantních toxinů s delecemi N-koncové části CyaA

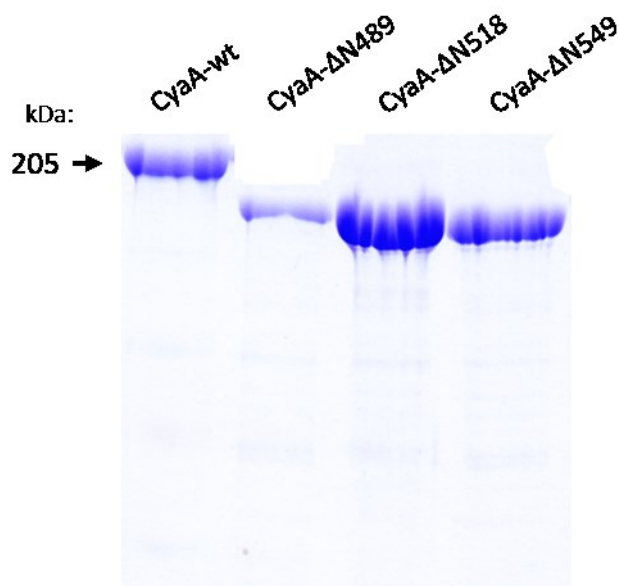
Současný model biologické aktivity CyaA popisuje dvě vzájemně kompetující konformace toxinu – tzv. translokační a pórotvorný prekurzor. Rovnováha mezi těmito konformacemi toxinu může být narušena různými způsoby – acylací neaktivní (neacylované) formy CyaA, teplotou, přítomností vápenatých iontů, vazbou protilátek nebo mutagenézí hydrofobní domény toxinu (Gray *et al.*, 2001; Osickova *et al.*, 2010; Osičková *et al.*, 1999; Otero *et al.*, 1995). Nejjednodušší způsob, jak odstranit tzv. translokační aktivitu toxinu je odstranění AC domény toxinu. V dřívějších studiích bylo ukázáno, že delece N-koncové části molekuly (6-489) vede ke zvýšené hemolytické aktivitě toxinu (Gray *et al.*, 2001). Odstranění segmentu 6-489, tedy AC domény a většiny spojujícího segmentu 400-500, případně ještě odstranění prvního predikovaného α -helixu hydrofobní domény (delece 6-518), vede k výraznému zvýšení hemolytické aktivity mutantních toxinů. Pokud je ale navíc odstraněn i druhý predikovaný α -helix hydrofobní domény (6-549), hemolytická aktivita se oproti intaktnímu toxinu sníží (Gray *et al.*, 2001). První z těchto delečních mutantních toxinů CyaA- Δ N489 (postrádající zbytky 6-489) byl již zkoumán ve větším detailu. Bylo ukázáno, že delece N-koncové části proteinu neovlivňuje vazbu toxinu na membránu erytrocytů. Dále byla zkoumána pórotvorná aktivita mutantního toxinu metodou BLM. Bylo ukázáno, že mutantní toxin má výrazně zvýšenou celkovou pórotvornou aktivitu. Navíc je toxin schopen tvořit póry s vyšší vodivostí (Masin *et al.*, 2013).



Obr. 12: Primární struktura CyaA a predikovaná sekundární struktura segmentu 400-500 a hydrofobní domény CyaA (převzato a upraveno podle Ladant a Ullmann, 1999; Osičková *et al.*, 1999).

V předešlých studiích byl pro měření na černých lipidových membránách používán jako elektrolyt roztok 1 M KCl. Pro všechny experimenty popsané v této práci byly podmínky lehce pozměněny - koncentrace soli byla snížena na 0,15 M KCl. Tyto podmínky lépe odpovídají fyziologickému prostředí. Póry tvořené CyaA v těchto podmínkách mají dostatečnou vodivost pro detekci. Měření na BLM tedy probíhá v roztoku o složení: 0,15 M KCl, 10 mM tris, 2 mM CaCl₂, pH 7,4. Vápník je přítomný, protože je nutný pro biologickou aktivitu toxinu. Lipidy použité pro experimenty byly vybrány v návaznosti na předchozí studie – byl použit lipidový izolát ze sóji (azolektin). Pro tvorbu membrán byla použita 3% (w/v) suspenze azolektinu rozpuštěného v dekanu a butanolu (9:1). Na membránu bylo aplikováno napětí 50 mV.

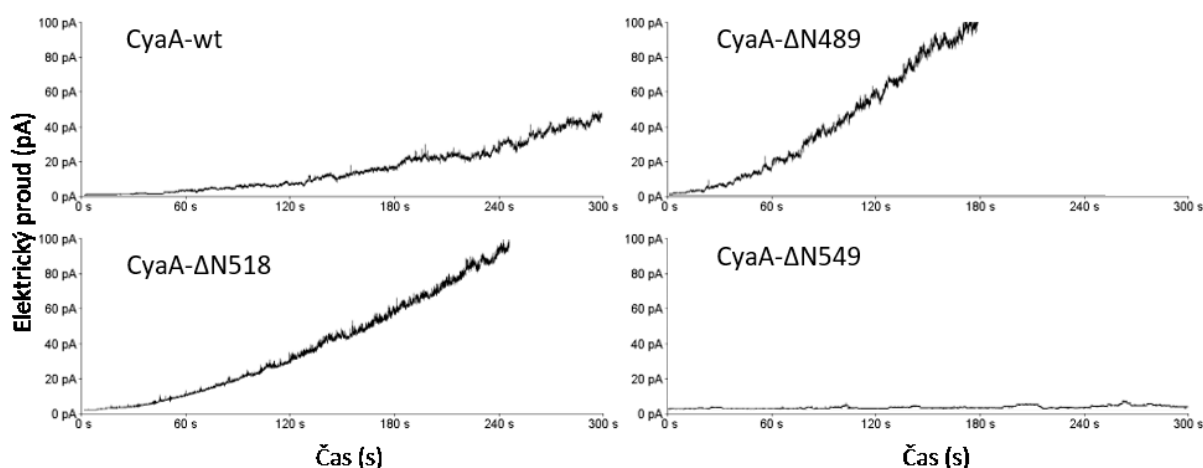
Pro sledování pórtvorné aktivity CyaA s různými delecemi N-koncových částí molekuly byly použity tři mutantní toxiny – CyaA-ΔN489 (chybí aminokyselinové zbytky 6-489), CyaA-ΔN518 (chybí aminokyselinové zbytky 6-518) a CyaA-ΔN549 (chybí aminokyselinové zbytky 6-549). CyaA-ΔN489 již byl na BLM charakterizován, konkrétně měřena celková aktivita mutantního toxinu a vodivost jednotlivých pórů. Tato měření však probíhala v roztoku 1 M KCl (Masin *et al.*, 2013). V této práci byl proto použit hlavně jako kontrola. Proteiny byly nejprve produkovány jako rekombinantní v bakterii *E. coli*, následně byly připraveny močovinné extrakty (kapitoly 4.2.3.) a purifikovány pomocí DEAE-Sepharozy (kapitola 4.2.4.). Purifikované proteiny jsou ukázány na obr. 13.



Obr. 13: SDS-PAGE gel s CyaA toxiny po purifikaci na DEAE-Sepharoze.

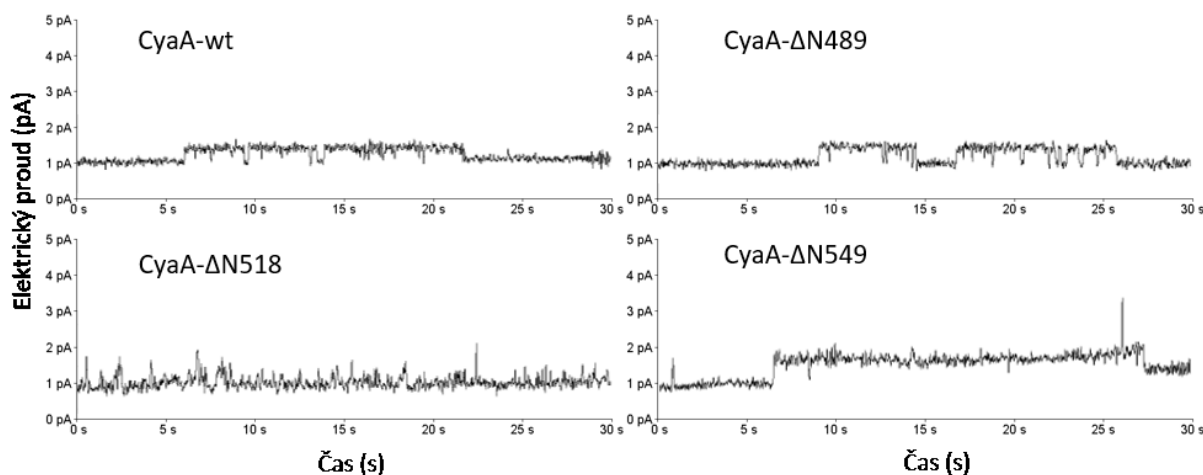
5.1.1. Charakterizace mutantních toxinů pomocí BLM

První charakteristika měřená na černých lipidových membránách byla celková aktivita toxinů. Jak můžeme vidět na obr. 14, celková membránová aktivita mutantních toxinů byla oproti intaktnímu CyaA ovlivněna, delece segmentu 6-518 vedla ke zvýšení celkové membránové aktivity toxinu. Naproti tomu membránová aktivita deleční varianty CyaA-ΔN549 byla výrazně snížena. Dříve měřená hemolytická aktivita tohoto toxinu byla také snížena oproti divokému typu toxinu (Gray *et al.*, 2001).



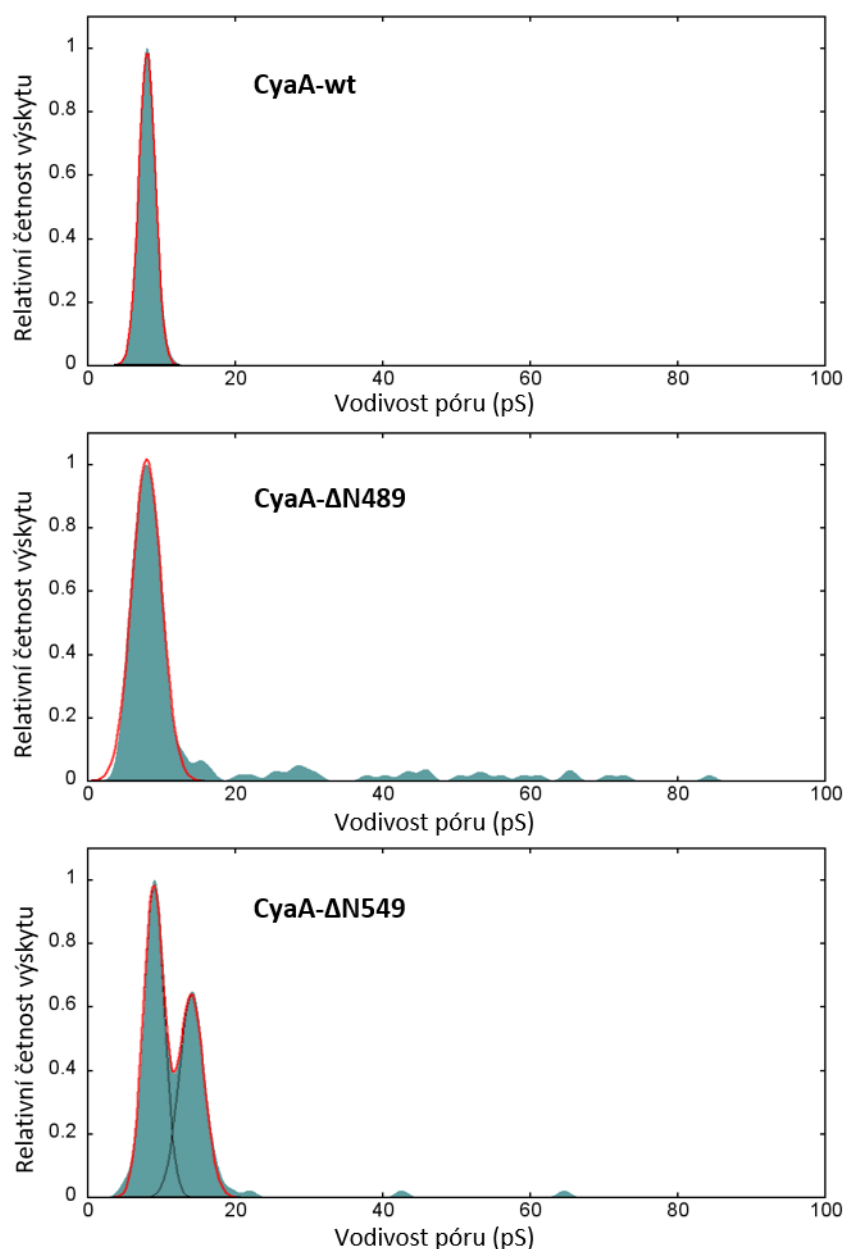
Obr. 14: Záznam celkové membránové aktivity sledovaných toxinů na BLM. Pro měření membránové aktivity byla použita koncentrace toxinů 1nM. Záznamy ukazují reprezentativní chování měřeného toxinu získané z alespoň deseti membrán.

Při bližším náhledu na chování jednotlivých toxinů na membráně je ale patrné, že delece CyaA-ΔN518 narušuje schopnost toxinu tvořit diskretní póry v membráně. Jednotlivé póry nebylo možné pozorovat ani při snížení koncentrace toxinu (záznam v obr. 15 byl získán při 10 pM koncentraci mutantního toxinu). Jak je patrné z obrázku 15, tento mutantní toxin pouze plynule destabilizuje membránu.



Obr. 15: Záznam jednotlivých pórů tvořených sledovanými toxiny. Záznamy ukazují reprezentativní ukázkou jednotlivých pórů s nejčastější vodivostí. Mutantní toxin CyaA-ΔN518 netvoří diskretní póry v membráně, pouze špatně charakterizovatelné výkyvy elektrického proudu. Použitá koncentrace toxinů byla 10 pM – 1 nM, podle membránové aktivity toxinů.

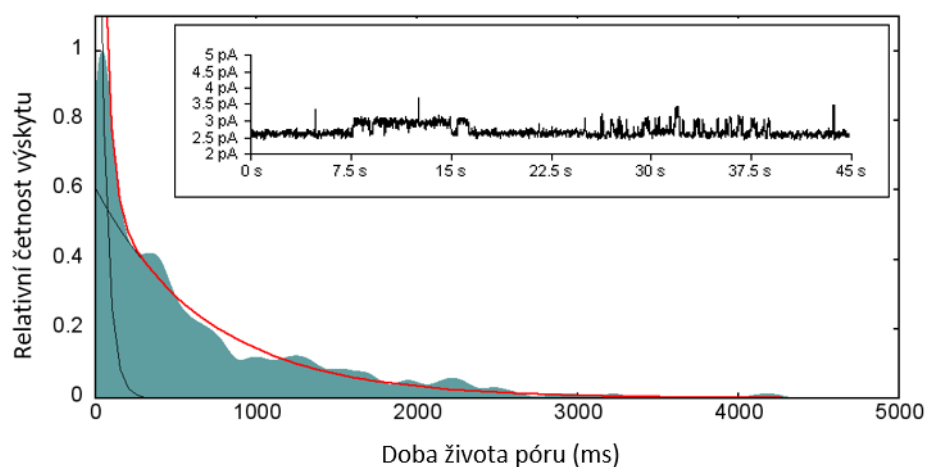
Díky nedefinovatelnému charakteru „pórů“ deleční mutantny CyaA-ΔN518 na BLM, další charakteristiky (vodivost jednotlivých pórů a doba života pórů) byly měřeny pouze pro mutantní toxiny CyaA-ΔN489 a CyaA-ΔN549. Z měření vodivosti jednotlivých pórů je vidět (obr. 16), že oba mutantní toxiny tvoří póry o stejné velikosti jako intaktní CyaA toxin. Mutantní toxin CyaA-ΔN489 byl schopen kromě pórů charakteristických pro intaktní CyaA (kolem 8 pS) tvořit i póry o vyšší vodivosti i když frekvence tvorby těchto „vyšších vodivostních forem“ byla velmi malá (obr. 16). Mutantní toxin CyaA-ΔN549 tvořil kromě pórů podobných intaktnímu CyaA (8,9 pS) póry o zvýšené vodivosti (14,1 pS), a to s téměř srovnatelnou frekvencí tvorby (obr. 16).



Obr. 16: Histogramy vodivostí pórů tvořených sledovanými toxiny. Oba mutantní toxiny tvoří póry s podobnou vodivostí jako intaktní CyaA. Mutantní toxin CyaA- Δ N489 navíc tvoří póry s širokým spektrem vodivostí, ale s nižší frekvencí tvorby. Mutantní toxin CyaA- Δ N549 kromě pórů podobných intaktnímu CyaA tvoří póry s lehce zvýšenou vodivostí, ale relativně vysokou frekvencí tvorby. Histogramy byly vždy vytvořeny z minimálně 100 jednotlivých událostí. Histogramy byla prokládána Gaussova funkce (červená čára) a hodnoty nejčastější vodivosti pórů byly uvedeny v histogramu. Použitá koncentrace toxinů byla 100 pM – 1nM.

Posledním parametrem použitým pro charakterizaci na černých lipidových membránách byla doba života póru. Z důvodů velké citlivosti naší aparatury byly u toxinů stanoveny dvě doby života. Na obr. 17 je ukázka histogramu doby života pórů a jejich vyhodnocování pro divoký typ toxinu společně se záznamem jeho chování na membráně. Ze záznamu je zjevné, že póry toxinu mohou tvořit dva typy molekul – molekuly s krátkou a delší dobou života. Z tohoto důvodu jsme pro výpočet doby života pórů zvolili proložení histogramů dvěma funkcemi, ze

kterých byly počítány jednotlivé hodnoty doby života a dále jejich průměrná hodnota (kapitola 4.2.8.).



Obr. 17: Histogram doby života pórů CyaA. V histogramu je uveden reprezentativní záznam chování pórů pro intaktní CyaA. CyaA tvoří dva typy pórů – póry s krátkou dobou života (pravá část záznamu) a delší dobou života (levá část záznamu). Histogramem jsou proloženy tři funkce – černé odpovídají jednotlivým dobám života, červená jejich součtu. Histogram byl vytvořen z minimálně 1000 jednotlivých událostí. Použitá koncentrace toxinu byla 10 pM – 100 pM.

Hodnoty doby života jednotlivých pórů byly vypočítány podle rovnice uvedené v kapitole 4.2.8. a jsou uvedeny v tabulce 3. Jak je patrné z výsledných hodnot v tabulce 3, doba života pórů mutantního toxinu CyaA-ΔN549 byla vyšší než pro intaktní toxin. Z ukázky chování jednotlivých molekul (obr.15) je patrné, že tento mutantní toxin tvoří stabilní póry s nízkou molekulární dynamikou.

Tab. 3: Hodnoty doby života pórů CyaA a mutantních toxinů. Všechny sledované toxiny tvoří dva typy molekul – molekuly s krátkou dobou života (τ_1) a molekuly s delší dobou života (τ_2). α_1 a α_2 vyjadřují amplitudu jednotlivých exponenciálních funkcí použitých pro výpočet doby života póru. Průměrná hodnota byla vypočítána podle vzorce v kapitole 4.2.8. Doba života byla pro každý toxin počítána z minimálně 1000 jednotlivých událostí. Koncentrace toxinů použitá pro měření byla 10 pM – 1nM.

	α_1	τ_1 (ms)	α_2	τ_2 (ms)	Průměr τ (ms)
CyaA-wt	0,46	45	0,54	694	660
CyaA-ΔN489	0,88	232	0,12	914	470
CyaA-ΔN549	0,91	55	0,09	2456	2013

Charakterizací interakce mutantních toxinů s membránou bylo zjištěno, že odstranění různých N-koncových částí CyaA (6-489 a 6-518) vede ke zvýšení pórtvorné aktivity toxinu na černých lipidových membránách připravených z azolektinu. Dále bylo ukázáno, že první předpovězený α -helix hydrofobní domény je nutný pro tvorbu dobře definovaných pórů. Odstranění prvních dvou α -helixů hydrofobní domény vedlo k výraznému snížení membránové

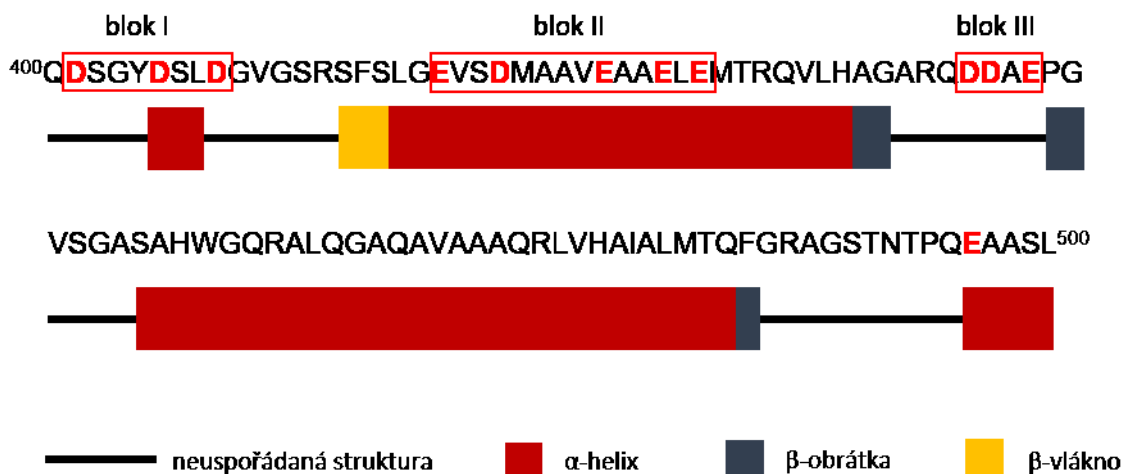
aktivity toxinu. Póry tvořené tímto mutantním toxinem (CyaA-ΔN549) měly podobnou vosivost jako póry tvořené intaktním CyaA, ale velmi stabilní.

5.2. Role negativně nabitých aminokyselinových zbytků v segmentu 400-500 v pórtvorné aktivitě CyaA

CyaA má ve své hydrofobní doméně předpovězeno pět transmembránových α -helixů. V dřívějších studiích bylo ukázáno, že negativně nabitě aminokyselinové zbytky hrají roli v aktivitách toxinu a to jak v translokaci AC domény, tak i v tvorbě pórů (Basler *et al.*, 2007; Osičková *et al.*, 1999). Na roli negativně nabitých aminokyselinových zbytků v pórtvorné aktivitě CyaA jsem se zaměřila i v segmentu 400-500.

5.2.1. Predikce sekundárních struktur v segmentu 400-500

Predikce sekundárních struktur v segmentu 400-500 byla provedena pomocí algoritmu SOPMA (Geourjon a Deléage, 1995) (Obr. 18). Predikce ukazuje, že v segmentu se mohou nacházet čtyři α -helixy. Dva delší helixy dlouhé 22 a 29 aminokyselinových zbytků (416-438 a 455-484) jsou dostatečně dlouhé k tomu, aby potenciálně byly transmembránové. Kratší α -helixy dostatečně dlouhé nejsou, ale mohly by hrát roli v interakci segmentu s membránou.

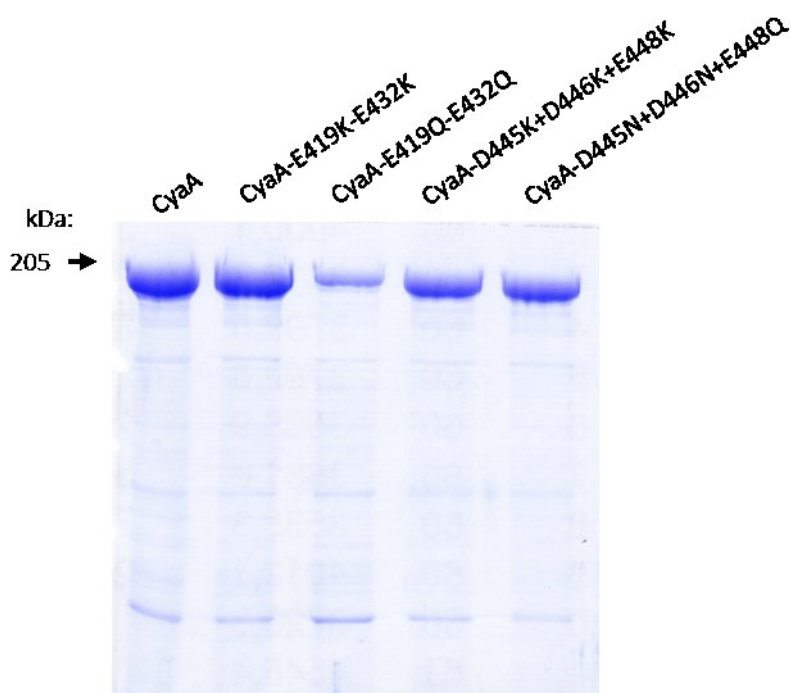


Obr. 18: Schematické zobrazení sekundárních struktur v segmentu 400-500 a jeho sekvence. Negativně nabitě aminokyselinové zbytky jsou v sekvenci označeny červeně, červené obdélníky značí tři bloky, ve kterých se v segmentu nacházejí.

V segmentu 400-500 se nachází několik negativně nabitých aminokyselinových zbytků, které by mohly mít vliv na biologickou aktivitu toxinu, jak to již bylo ukázáno u negativně nabitých zbytků kyseliny glutamové v hydrofobní doméně CyaA (Basler *et al.*, 2007; Osičková *et al.*, 1999). Negativně nabitě aminokyselinové zbytky se v segmentu nacházejí ve třech blocích (blok I – D401+D405+D408, blok II – E419+D422+E427+E430+E432, blok III –

D445+D446+E448) (Obr. 18). Pro studium jejich vlivu na aktivitu toxinu byly zkonstruovány mutantní toxiny, ve kterých byly aminokyselinové zbytky kyseliny asparagové a glutamové zaměněny za neutrální asparaginy a glutaminy nebo kladně nabitě lysiny. Mutageneze byla provedena Ing. Adrianou Osíčkovou, Ph.D. U mutantních toxinů byla změřena jejich vazba na membránu, translokace AC domény přes membránu a jejich hemolytická aktivita (měření bylo provedeno RNDr. Jiřím Mašínem, Ph.D.) (Masin *et al.*, 2016). Vazba toxinu a translokace nebyla ovlivněna záměnou negativně nabitých aminokyselinových zbytků za neutrální ani pozitivně nabitě aminokyselinové zbytky. Mutace v bloku I měly pouze malý vliv na hemolytickou aktivitu toxinů. Naproti tomu mutace v bloku II a III vedly k výraznému zvýšení hemolytické aktivity toxinů. Nejvyšší hemolytickou aktivitu vykazoval mutantní toxin s neutralizovaným nábojem v bloku III (CyaA-D445N+D446N+E448Q).

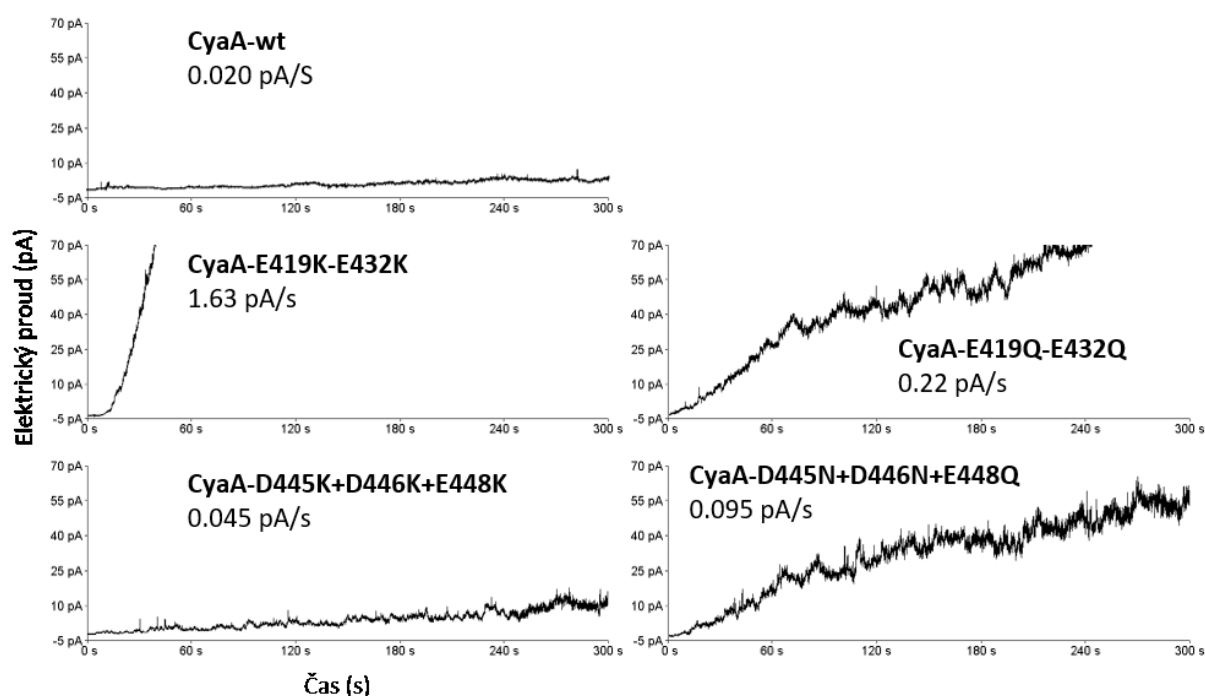
Čtyři mutantní toxiny byly vybrány pro podrobnější charakterizaci jejich pórtvorné aktivity metodou černých lipidových membrán – toxiny se záměnou negativně nabitých aminokyselinových zbytků v bloku II i III za neutrální i kladně nabitě aminokyselinové zbytky. Vybrané mutantní toxiny byly připraveny jako močovinnové extrakty (kapitola 4.2.3.) a následně purifikovány pomocí DEAE-Sepharozy a Phenyl-Sepharozy (kapitoly 4.2.4. a 4.2.5.). Purifikované toxiny byly vizualizovány pomocí SDS-PAGE gelu (Obr. 19).



Obr. 19: SDS-PAGE gel s CyaA a čtyřmi mutantními toxiny po purifikaci pomocí DEAE-Sepharozy a Phenyl-Sepharozy.

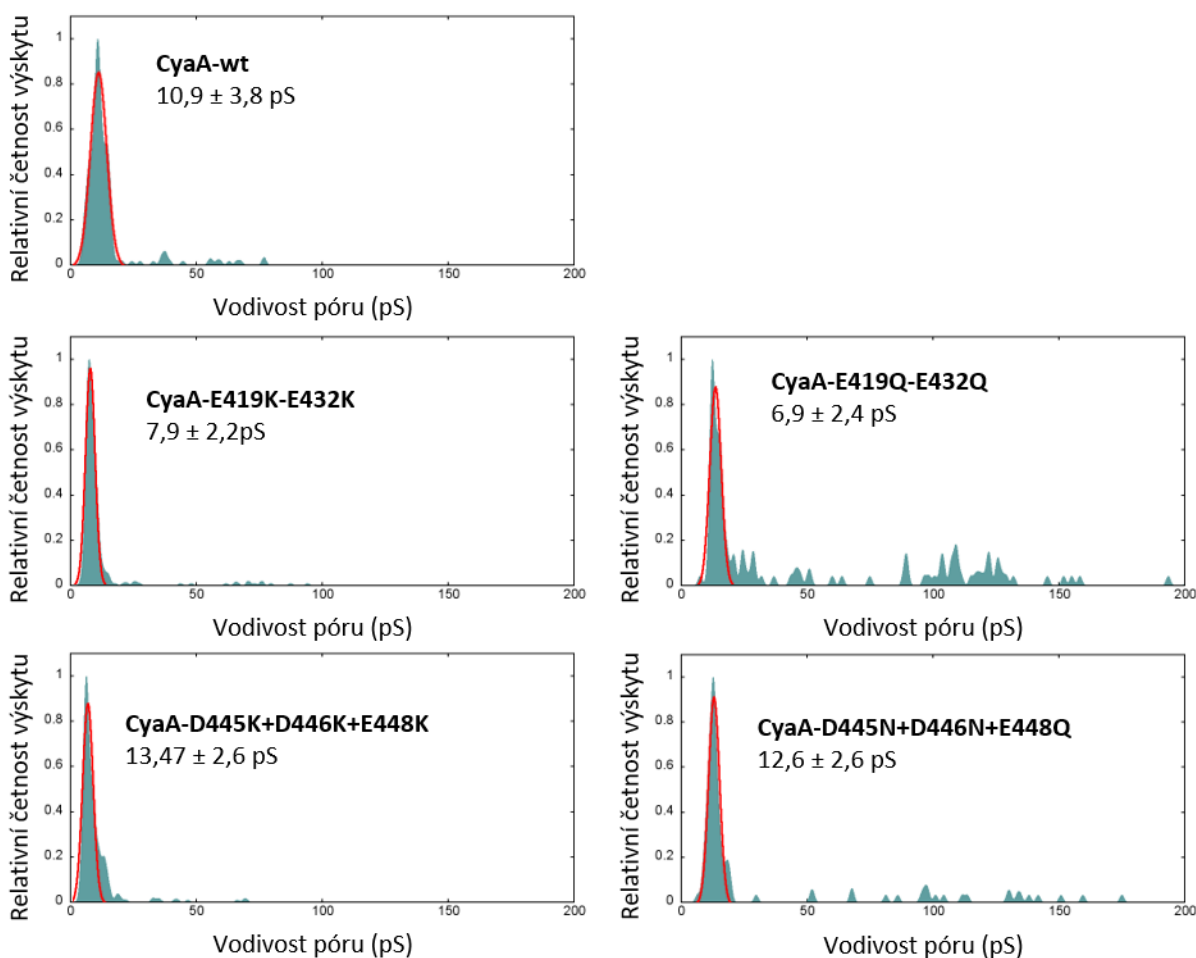
5.2.2. Charakterizace pórtvorné aktivity mutantních toxinů pomocí BLM

Pro podrobnější charakterizaci pórtvorné aktivity mutantních toxinů byla využita metoda černých lipidových membrán (BLM) (kapitola 4.2.8.). Pomocí BLM byly sledovány tři hlavní charakteristiky pórů – celková aktivita toxinu, vodivost jednotlivých pórů a doba života pórů. Membrána použitá pro charakterizaci toxinů byla tvořena azolektinem, tedy směsí lipidů izolovaných ze sóji. Jako elektrolyt byl použit roztok 0,15 M KCl, 10 mM tris, 2 mM CaCl₂, pH 7,4. Měření celkové membránové aktivity byla provedena při jednotné standardní koncentraci toxinu 1 nM. Na membránu bylo aplikováno napětí 50 mV. Měřením bylo ukázáno, že všechny mutantní toxiny mají oproti intaktnímu CyaA zvýšenou celkovou membránovou aktivitu (Obr. 20). Nejvyšší celkovou aktivitu vykazuje mutantní toxin CyaA-D419K-D332K.



Obr. 20: Záznam celkové membránové aktivity sledovaných toxinů na BLM. Pro měření membránové aktivity byla použita 1nM koncentrace toxinů. Záznamy ukazují reprezentativní chování měřeného toxinu získané z alespoň deseti membrán.

Dále byla charakterizována vodivost jednotlivých pórů tvořených mutantními toxiny. Vodivost pórů tvořených intaktním CyaA toxinem i mutantními toxiny se pohybovala v rozmezí mezi 7-14 pS. Mutantní toxiny s neutralizovaným nábojem v bloku II i III navíc tvořily póry o vyšší vodivosti i když s relativně malou frekvencí tvorby (obr. 21).



Obr. 21: Histogramy vodivosti pórů tvořených sledovanými toxiny. Mutantní toxiny se záměnou negativně nabitých aminokyselinových zbytků za neutrální tvoří kromě pórů podobných pórům intaktního CyaA navíc póry s širokým spektrem vodivosti, ale sníženou frekvencí tvorby. Záměna za kladně nabitě aminokyselinové zbytky neměla vliv na vodivost pórů. Histogramy byly vždy vytvořeny z minimálně 100 jednotlivých událostí. Histogramy byla prokládána Gaussova funkce (červená čára) a hodnoty nejčastější vodivosti pórů byly uvedeny v histogramu. Použitá koncentrace toxinů byla 100 pM – 1 nM.

Posledním charakterizovaným parametrem pórů u mutantních proteinů byla doba života pórů. Hodnoty doby života mutantních toxinů jsou shrnuty v tabulce 4.

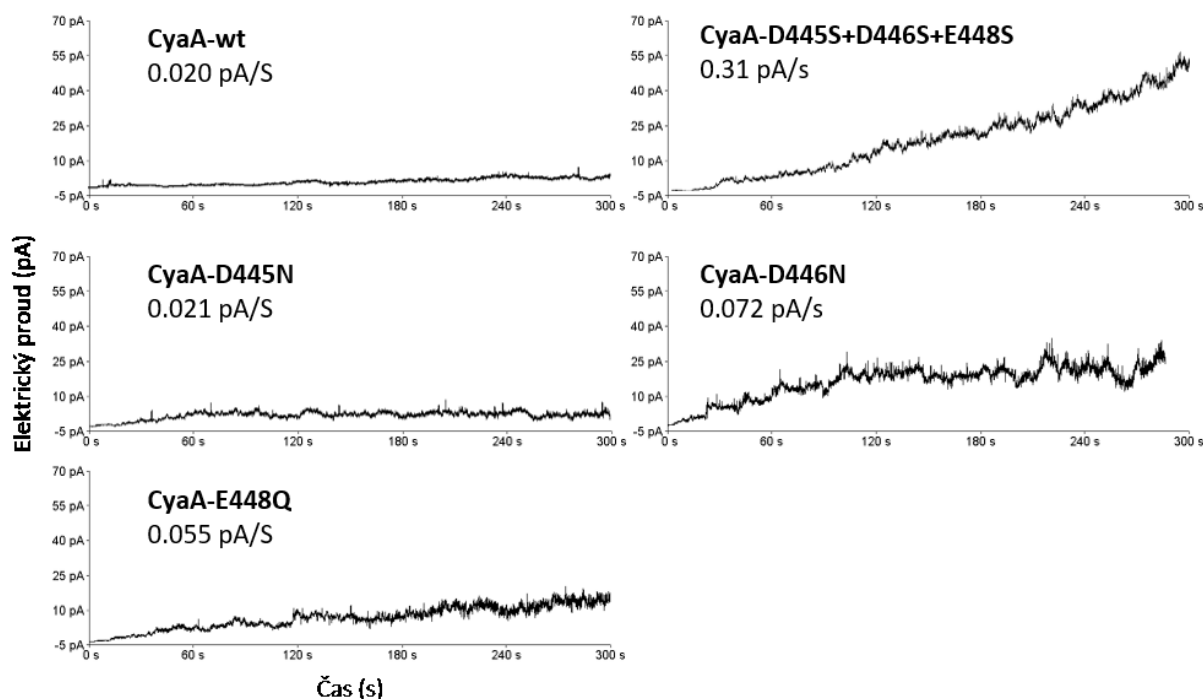
Tab. 4: Hodnoty doby života pórů CyaA a mutantních toxinů. Všechny sledované toxiny tvoří dva typy pórů – póry s krátkou dobou života (τ_1) a póry s delší dobou života (τ_2). α_1 a α_2 vyjadřují amplitudu jednotlivých exponenciálních funkcí použitých pro výpočet doby života póru. Průměrná hodnota byla vypočítána podle vzorce v kapitole 4.2.8. Doba života pórů byla pro každý toxin počítána z minimálně 1000 jednotlivých událostí. Použitá koncentrace toxinů byla 10 pM – 1 nM.

	α_1	τ_1 (ms)	α_2	τ_2 (ms)	Průměr τ (ms)
CyaA-wt	0,4	18	0,6	858	846
CyaA-E419K-E432K	0,83	176	0,17	1364	905
CyaA-E419Q-E432Q	0,92	53	0,08	2238	1770
CyaA-D445K+D446K+E448K	0,95	153	0,05	1225	471
CyaA-D445N+D446N+E448Q	0,76	107	0,24	1454	1199

Z tabulky 4 je patrné, že doba života pórů mutantních toxinů nebyla výrazně ovlivněna. Doba života pórů se pohybovala kolem 1000 ms. Vyjímkou byly dva mutantní toxiny, CyaA-E419K-E432K měl prodlouženou dobu života pórů na přibližně dvojnásobek a naopak CyaA-D445K+D446K+E448K měl dobu života pórů sniženou zhruba na polovinu, ve srovnání s intaktním CyaA.

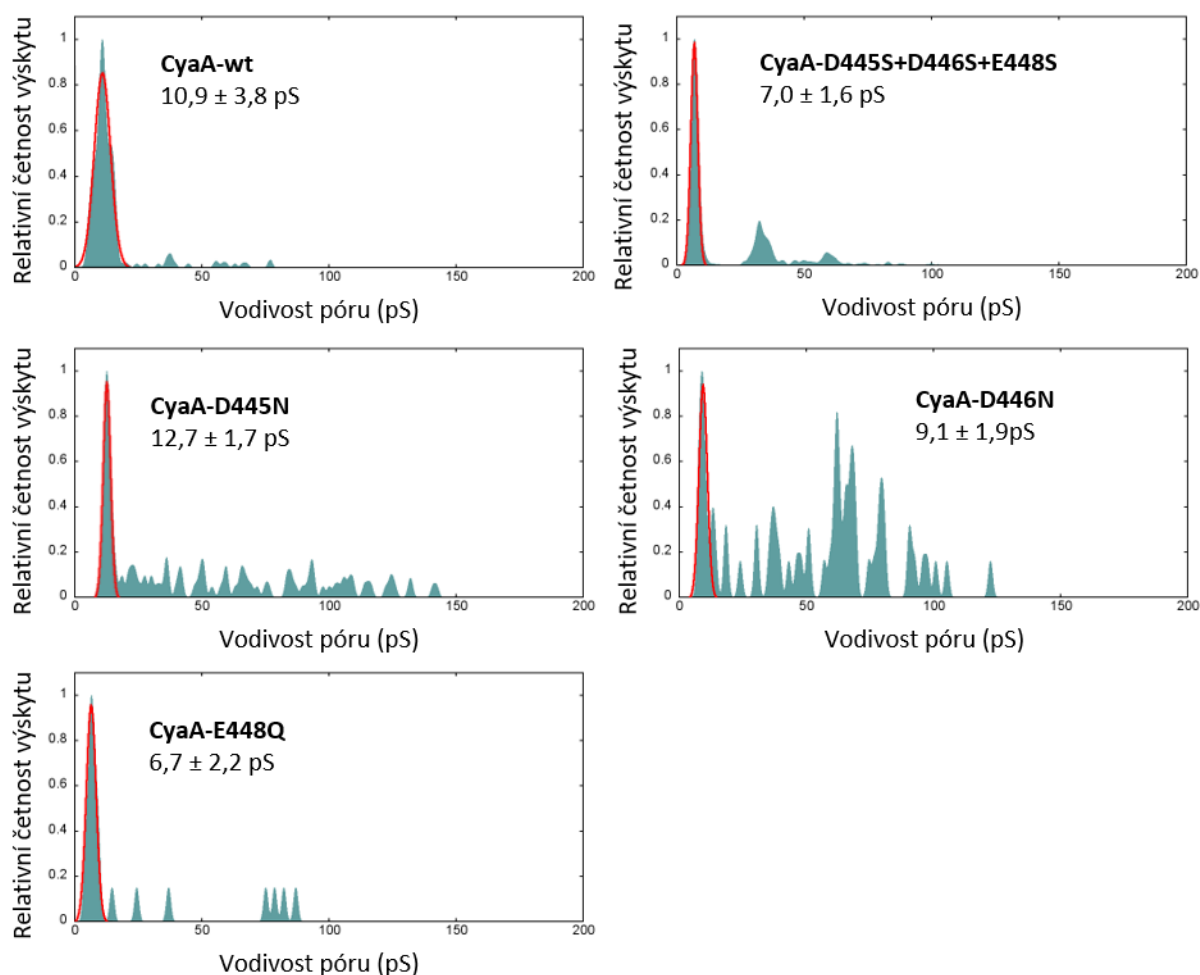
Mutantní toxin CyaA-D445N+D446N+E448Q vykazoval nejvyšší hemolytickou aktivitu a zároveň tvořil póry s vyšší vodivostí oproti intaktnímu CyaA toxinu. Proto byl tento toxin vybrán pro další podrobnější analýzu. Kromě záměny negativně nabitých aminokyselinových zbytků za asparagin a glutamin byla také provedena záměna za serin. Serin je také neutrální hydrofilní aminokyselina, ale díky své velikosti se v proteinové struktuře častěji vyskytuje zanořená dovnitř proteinu. Dále byly připraveny tři mutantní toxiny obsahující pouze jednu bodovou mutaci vždy zaměřenou na jeden negativně nabitý aminokyselinový zbytek. Dohromady tedy byly vytvořeny další čtyři mutantní toxiny – CyaA-D445S+D446S+E448S, CyaA-D445N, CyaA-D446N a CyaA-E448Q.

Charakterizace ukázala, že celková membránová aktivita je u všech mutantních toxinů zvýšena i když často pouze mírně (Obr. 22).



Obr. 22: Záznam celkové membránové aktivity sledovaných toxinů na BLM. Pro měření membránové aktivity byla použita 1nM koncentrace toxinů. Záznamy ukazují reprezentativní chování měřeného toxinu získané z alespoň deseti membrán.

Póry tvořené všemi mutantními toxiny vykazovaly zvýšenou vodivost (Obr. 23). V případě mutantního toxinu se záměnami za seriny v bloku III (CyaA- D445S+D446S+E448S), toxin tvořil kromě pórů se stejnou vodivostí jako intaktní CyaA také póry s vodivostí kolem 30 pS. V případě jednotlivých bodových mutací v bloku III, všechny mutantní toxiny tvořily póry s širokým spektrem vodivostí, i když každý toxin s jinou frekvencí tvorby.



Obr. 23: Histogramy vodivostí pórů tvořených sledovanými toxiny. Mutantní toxin CyaA-D445S+D446S+E448S tvořil kromě pórů se stejnou vodivostí jako intaktní CyaA toxin také póry s vodivostí kolem 30 pS. Mutantní toxiny s jednotlivými bodovým záměnami tvořily široké spektrum vodivostních stavů. Histogramy byly vždy vytvořeny z minimálně 100 jednotlivých událostí. Histogramy byla prokládána Gaussova funkce (červená čára) a hodnoty nejčastější vodivosti pórů byly uvedeny v histogramu. Použitá koncentrace toxinů byla 100 pM – 1nM.

Doba života pórů byla cílenou mutagenézí ovlivněna pouze minimálně. Jak je vidět v tabulce 5, póry tvořené mutantními toxiny měli dobu života podobnou jako intaktní CyaA toxin. Pouze mutantní toxin CyaA-D445N měl sníženou dobu života póru přibližně na polovinu.

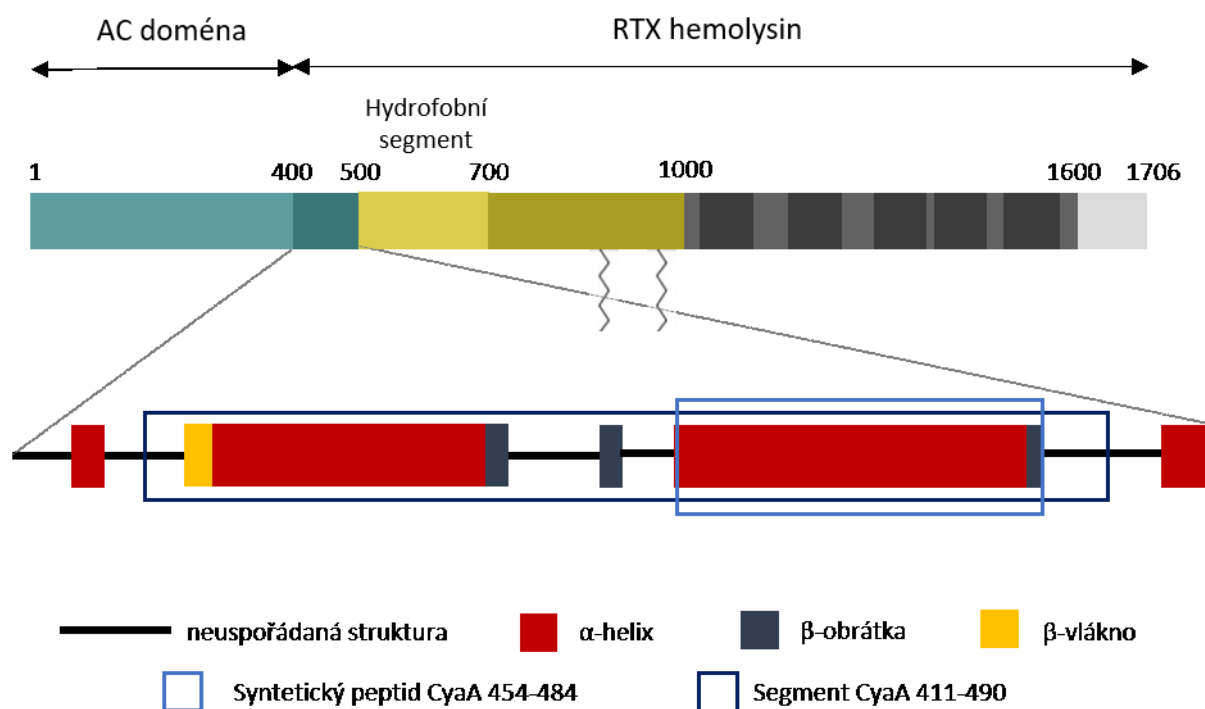
Tab. 5: Hodnoty doby života pórů CyaA a mutantních toxinů. Všechny sledované toxiny tvoří dva typy pórů – póry s krátkou dobou života (τ_1) a póry s delší dobou života (τ_2). α_1 a α_2 vyjadřují amplitudu jednotlivých exponenciálních funkcí použitých pro výpočet doby života póru. Průměrná hodnota byla vypočítána podle vzorce v kapitole 4.2.8. Doba života pórů byla pro každý toxin počítána z minimálně 1000 jednotlivých událostí. Použitá koncentrace toxinů byla 10 pM – 1 nM.

	α_1	τ_1 (ms)	α_2	τ_2 (ms)	Průměr τ (ms)
CyaA-wt	0,4	18	0,6	858	846
CyaA-D445S+D446S+E448S	0,57	72	0,43	663	589
CyaA-D445N	0,71	129	0,29	480	341
CyaA-D446N	0,91	82	0,09	1706	1175
CyaA-E448Q	0,81	114	0,19	1275	955

5.3. Interakce segmentu 400-500 s membránou

Struktura a funkce segmentu 400-500 již byla částečně zkoumána. Pro její studium byl využit krátký syntetický peptid se sekvencí odpovídající CyaA 454-484. Pomocí CD spekter bylo ukázáno, že tento krátký peptid zaujímá sekundární strukturu α -helixu, ale pouze v přítomnosti malých jednovrstevných liposomů tvořených fosfolipidy s negativním nábojem. Sledováním úniku fluorescenční sondy z liposomů bylo též ukázáno, že tento peptid má destabilizující účinky na membránu (Subrini *et al.*, 2013).

Naším cílem bylo se v první řadě detailněji podívat na charakter destabilizačního účinku peptidu CyaA 454-484 na černých lipidových membránách. Dále byl Mgr. Ladislavem Bumbou Ph.D. připraven delší segment CyaA 411-490, jehož interakci s membránou jsme chtěli prozkoumat. Delší segment 411-490 podle predikce sekundární struktury obsahuje dva α -helixy, které jsou dostatečně dlouhé, aby mohly být transmembránové (Obr. 24).



Obr. 24: Schematické znázornění primární struktury CyaA a predikované sekundární struktury segmentu 400-500. Ve schématu predikované sekundární struktury segmentu 400-500 jsou vyznačené dva konstrukty použité pro charakterizaci interakce segmentu s membránou – syntetický peptid 454-484 a segment 411-490.

5.3.1. Vliv lipidového složení membrány na membránovou aktivitu

Jak již bylo zmíněno, syntetický peptid CyaA 454-484 preferenčně destabilizuje membrány tvořené fosfolipidy s negativním nábojem. Pro další studium tohoto peptidu pomocí BLM bylo potřeba zavést nové lipidové systémy o definovaném složení. Složení zavedených systémů je uvedeno v tabulce 6.

Tab. 6: Lipidové složení směsí použitých pro měření na BLM i liposomech pro experimenty analyzující interakce segmentu 400-500 s membránou. V tabulce je kladen důraz hlavně na náboj výsledné membrány.

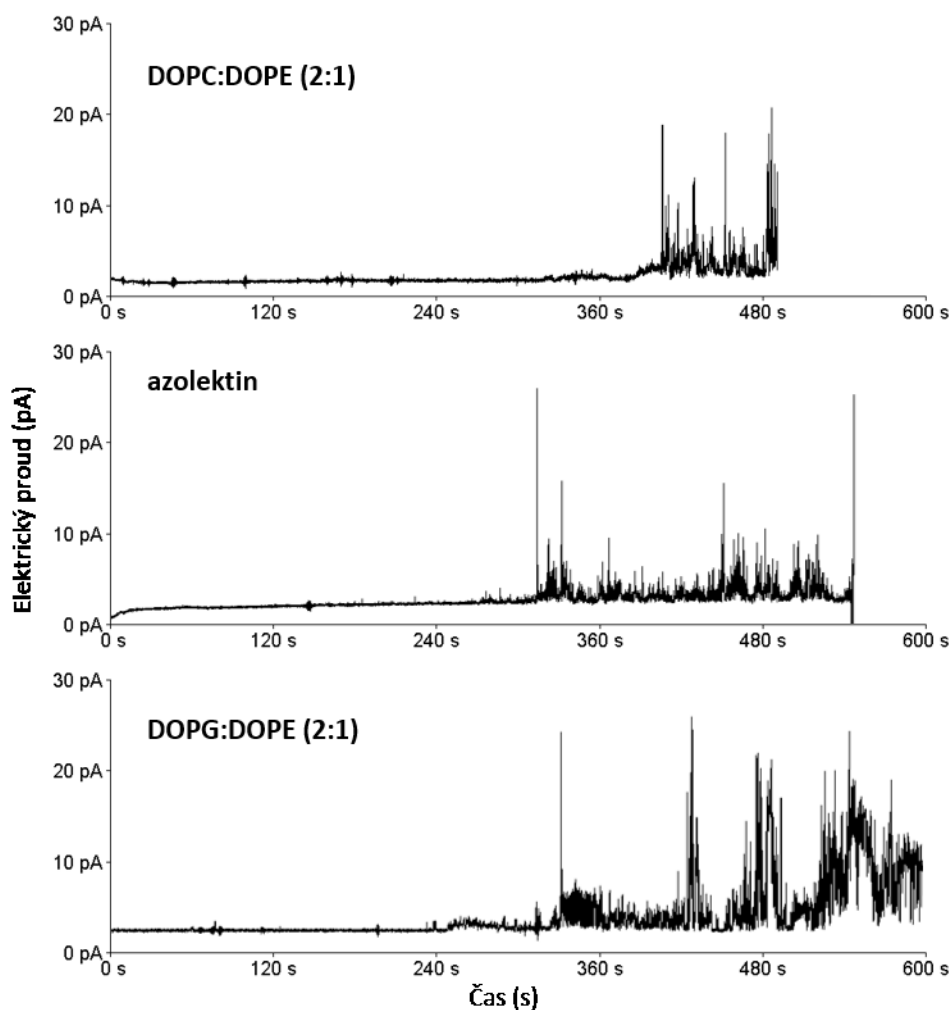
Lipidové složení	Náboj membrány
Dioleýlfosfatidylcholin:dioleýlfosfatidyletanolamin (DOPC:DOPE) (2:1)	neutrální
azolektin	20 % negativní
Dioleýlfosfatidylglycerol:dioleýlfosfatidyletanolamin (DOPG:DOPE) (2:1)	66 % negativní

Kromě systémů tvořených syntetickými fosfolipidy byl použit iazolektin. Azolektin je často využíván ve studiích na umělých lipidových membránách. Jeho složení ale není přesně známo. V Laboratoři fyziologie bakterií PřF UK byla RNDr. Gabrielou Seydlovou, Ph.D.

provedena analýza zastoupení polárních hlaviček a mastných kyselin v azolektinu. Výsledky ukázaly, že azolektin obsahuje přibližně 20 % fosfolipidů s negativním nábojem. Nejčastěji zastoupené mastné kyseliny jsou kyselina palmitová (16:0, 20 %), kyselina olejová (18:1, 16 %) a kyselina linolová (18:2, 50 %).

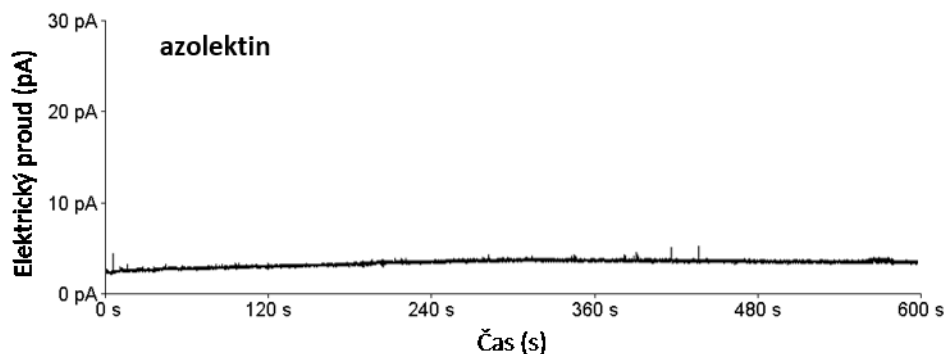
5.3.2. Charakterizace interakce syntetického peptidu CyaA 454-484 s membránou

Metodou černých lipidových membrán byla charakterizována celková membránová aktivita syntetického peptidu na membráně. Při použití standardní koncentrace používané pro měření aktivity celého toxinu (1 nM) se syntetický peptid zdál být na membráně neaktivní. Z tohoto důvodu byla postupně zvyšována použitá koncentrace peptidu. Výsledná koncentrace použitá pro měření byla 10 μ M. Jak je vidět ze záznamů, peptid je i přes relativně vysokou koncentraci použitou pro měření velmi málo membránově aktivní. Aktivita peptidu se na membráně projevuje až po přibližně 5 minutách záznamu. Syntetický peptid v membráně netvořil diskrétní póry, tak jak je tomu u CyaA. Interakce syntetického peptidu s membránou se projevovala krátkými výkyvy vodivosti. Tento charakter interakce je ale nesnadné kvantifikovat. Ze záznamů je patrné, že syntetický peptid s membránou interaguje a destabilizuje ji (Obr. 25).



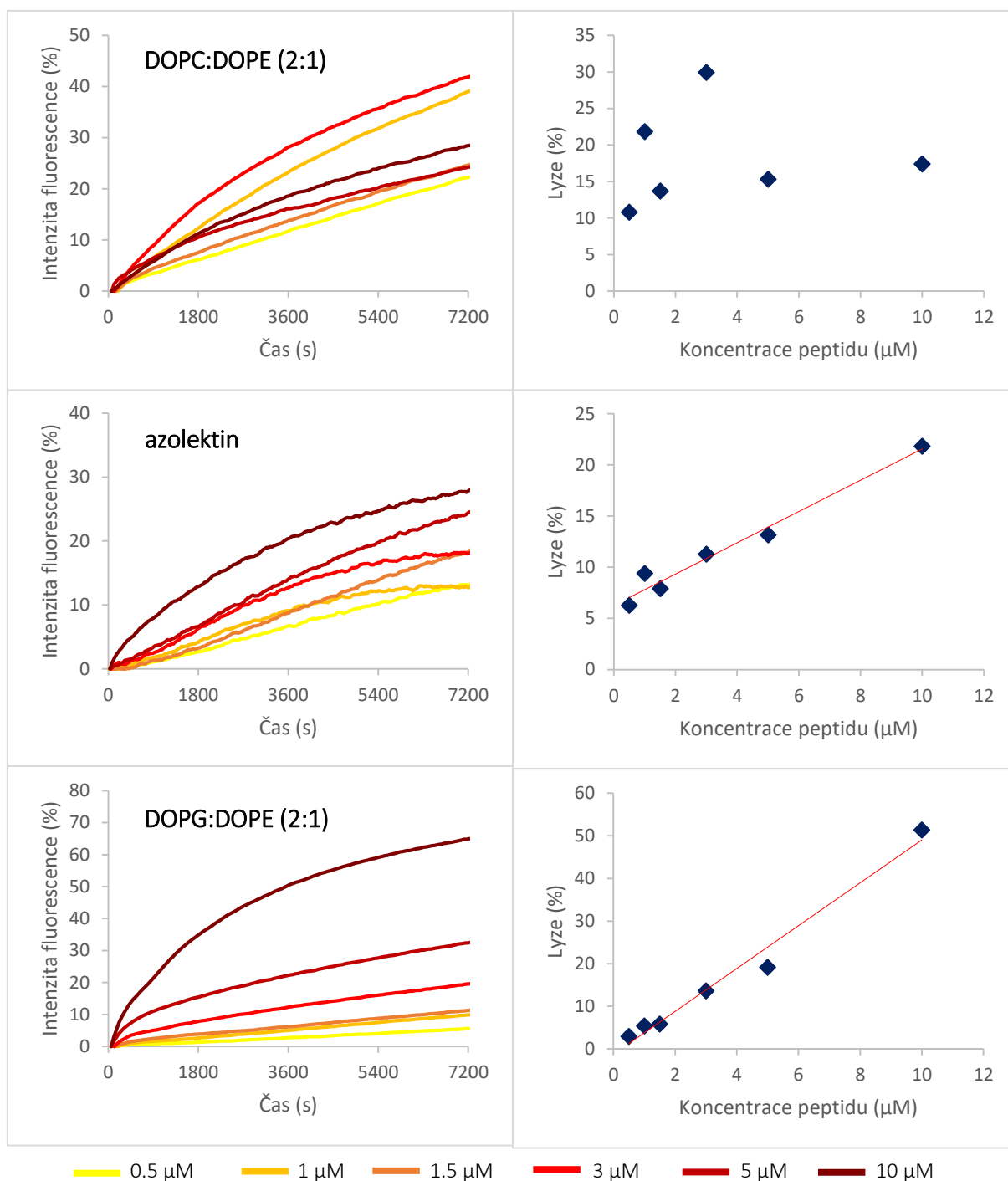
Obr. 25: Reprezentativní záznam chování syntetického peptidu CyaA 454-484 na membránách různého složení. Syntetický peptid v membráně netvoří diskrétní póry, má patrně pouze destabilizační účinek.

Pro měření byla jako negativní kontrola použita denaturace peptidu varem. Roztok obsahující peptid byl po ověření aktivity odebrán z BLM aparatury, inkubován 30 minut při 100°C a následně do aparatury vrácen. Aktivita peptidu byla opět změřena. Jak vidíme na obr. 26, syntetický peptid varem ztrácí schopnost destabilizovat membránu tvořenou azolektinem.



Obr. 26: Reprezentativní záznam měření membránové aktivity syntetického peptidu po denaturaci varem. Měření byla provedena i pro další dva lipidové systémy se stejným výsledkem (data nejsou uvedena).

Dále bylo chování syntetického peptidu sledováno na jednovrstevných liposomech s rozdílným fosfolipidovým složením (Tab. 6). Pro měření bylo použito šest koncentrací syntetického peptidu. Levý sloupec obr. 27 ukazuje záznamy lyze liposomů v závislosti na použité koncentraci syntetického peptidu. Pro sledování koncentrační závislosti lyze byla odečítána intenzita fluorescence po 1 hodině od začátku měření. Po jedné hodině měření stále dochází k nárůstu lyze u všech měřených lipozomů. Závislost procenta lyze liposomů na koncentraci peptidu byla vynesena do grafů (pravé panely, obr. 27). Jak je vidět, syntetický peptid destabilizuje všechny typy lipozomů, ale s různou aktivitou. Měřený únik fluorescenční sondy je nejvýraznější u lipozomů s převažujícím negativním nábojem na membráně. Z grafů napravo je také patrné, že přítomnost negativně nabitých fosfolipidů je nutná pro lineární závislost lyze liposomů na koncentraci peptidu.

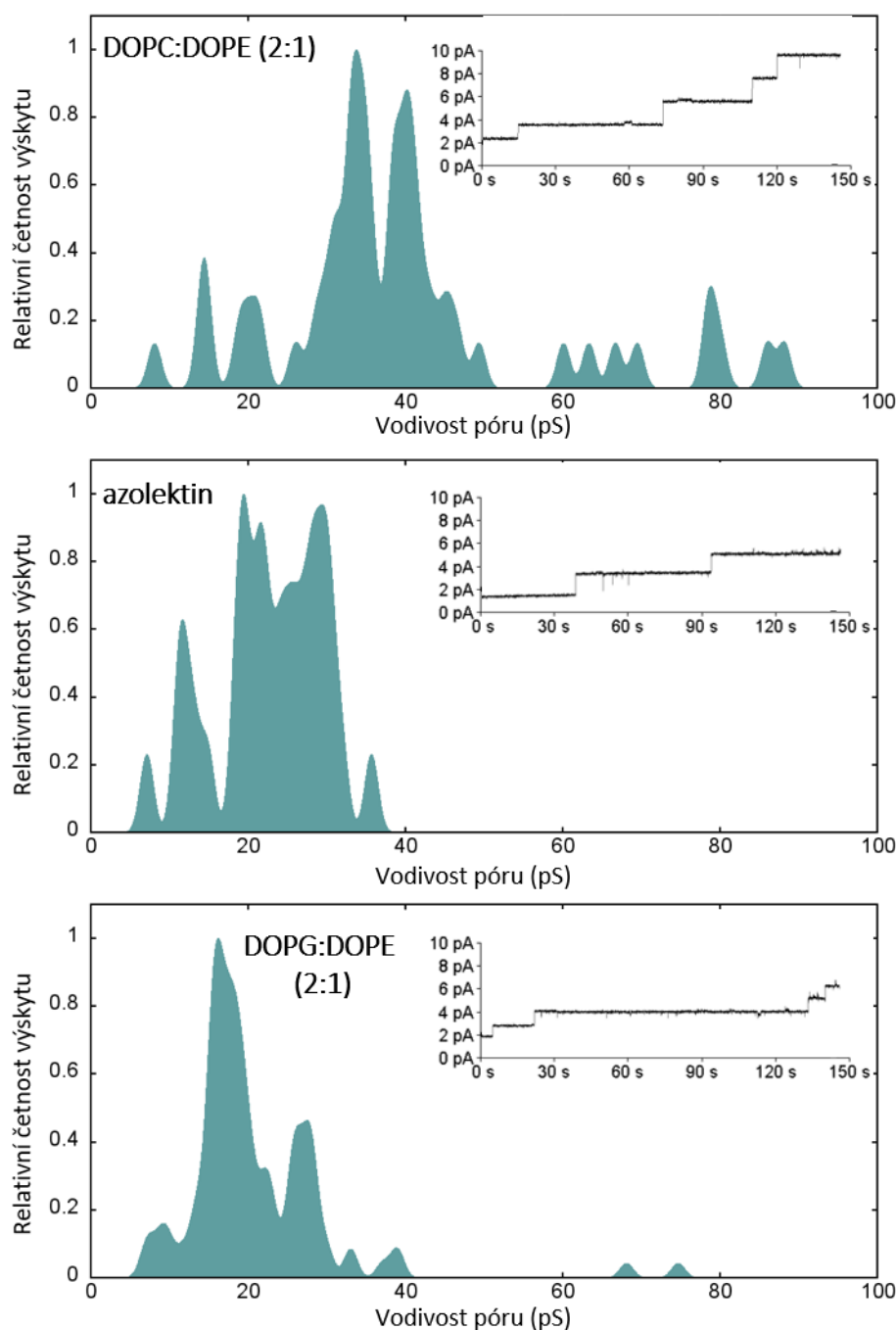


Obr. 27: Lyze liposomů různého fosfolipidového složení působením syntetického peptidu CyaA 454-484. Levý sloupec ukazuje reprezentativní záznamy úniku fluorescenční sondy z jednovrstevných liposomů. Měření byla provedena dvakrát, vždy v triplicátu. Použitá koncentrace syntetického peptidu je uvedena v legendě. Pravý sloupec ukazuje míru lyze po jedné hodině v závislosti na použité koncentraci peptidu. V případě liposomů tvořených azolektinem a DOPG:DOPE (2:1) je závislost lineární (červená spojnice trendu).

5.3.3. Charakterizace interakce segmentu 411-490 s membránou

Segmentu 411-490 byl připraven dr. Ladislaven Bumbou. Tento polypeptid byl exprimován jako fúzní protein s glutathion-S-transferázou, histidinovou kotvou a úsekem obsahujícím místo pro štěpení TEV (Tobacco Etch Virus) proteázou. Fúzní protein byl purifikován pomocí Ni-NTA Sepharozy. Eluovaná frakce byla štěpena TEV proteázou. Směs byla zakoncentrována pomocí ultrafiltračního disku (Amicon) propouštějící pouze polypeptidy do velikosti 10 kDa. Díky tomuto postupu byla získána rozpustná frakce CyaA 411-490 ve 2M močovíně (molekulární hmotnost 8,2 kDa).

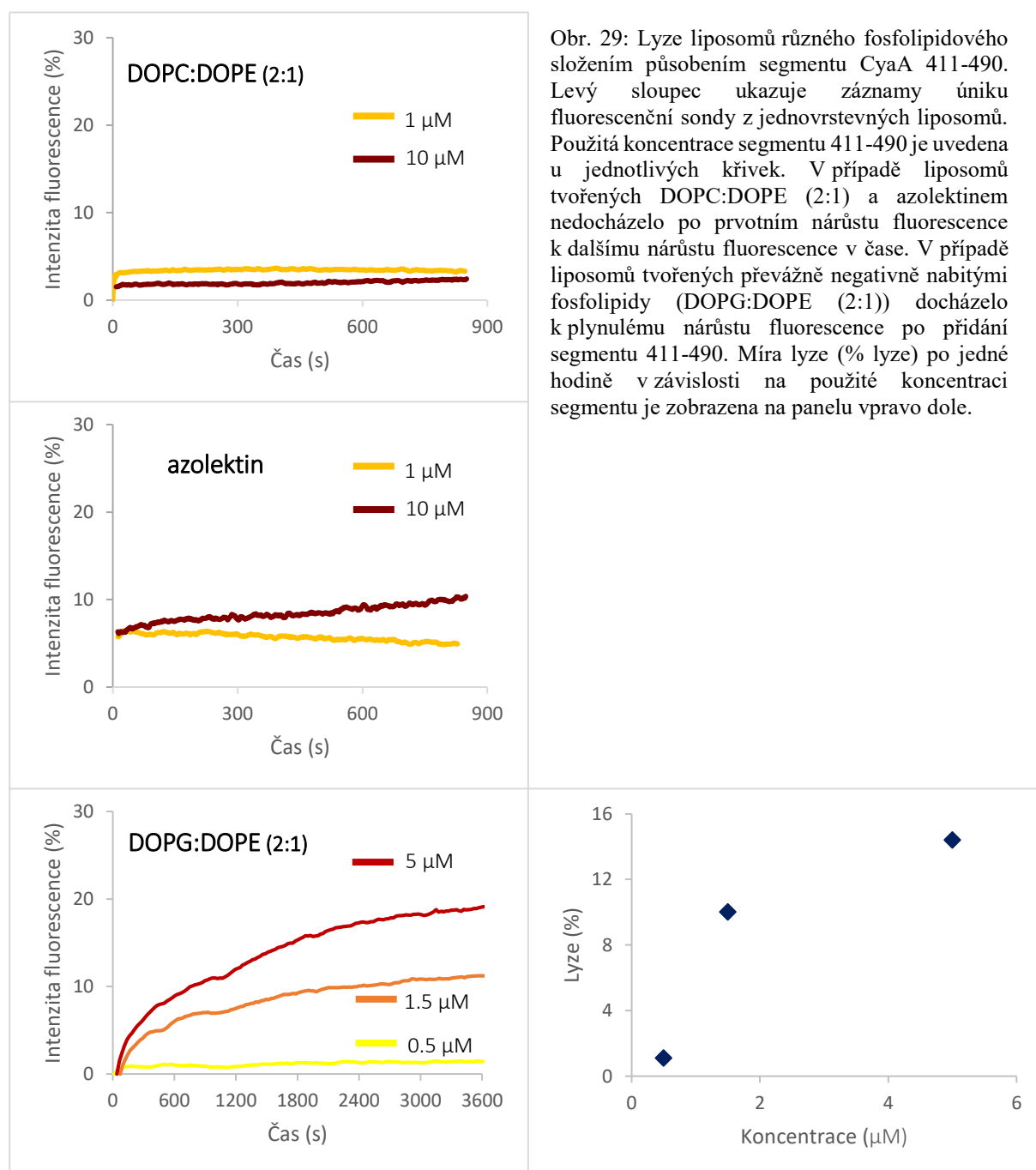
Membránová aktivita segmentu 411-490 byla dále charakterizována pomocí BLM a měřením úniku sondy z liposomů. Pro měření byly použity stejné lipidové systémy jako pro měření se syntetickým peptidem 454-484 (Tab. 6). Pro měření na BLM byla opět použita vysoká koncentrace polypeptidu (10 μ M). Segment 411-490 měl na planárních lipidových membránách relativně nízkou aktivitu. Tvořil velmi stabilní diskrétní póry s širším rozptylem vodivosti od 10 do 40 pS (Obr. 28).



Obr. 28: Histogramy vodivostí pórů tvořených segmentem CyaA 411-490 na membránách s různým fosfolipidovým složením. Segment 411-490 tvoří v mebráně velmi stabilní diskretní póry. Do histogramů jsou vloženy reprezentativní záznamy pórů tvořených segmentem 411-490.

Dále byla interakce segmentu 411-490 s membránou sledována měřením úniku fluorescenční sondy z liposomů o různém fosfolipidovém složení (Tab. 6). Pro měření byly použity různé koncentrace sledovaného segmentu (Obr. 29). Měření při 1 μ M a 10 μ M koncentraci ukázalo, že segment 411-490 způsobuje únik fluorescenční sondy pouze u liposomů tvořených převážně negativně nabitými fosfolipidy (DOPG:DOPE (2:1)). U liposomů s neutrálním povrchem nebo liposomů obsahujících pouze malou část negativně

nabitých fosfolipidů nedocházelo k výraznému úniku fluorescenční sondy po prvotním nárůstu před rozmícháním polypeptidu v kyvetě. Na převážně negativně nabitých liposomech způsoboval segment plynulý nárůst intenzity fluorescence i při nízkých koncentracích. Závislost úniku fluorescenční sondy na koncentraci segmentu však není lineární, tak jak tomu bylo u syntetického peptidu CyaA 454-484. Destabilizační schopnost segmentu 411-490, měřená jako únik fluorescenční sondy, je nižší než v případě syntetického peptidu CyaA 454-484. Nicméně je nutné podotknout, že se jedná o předběžné výsledky, neboť část pokusů byla provedena pouze jednou v triplicátu.



Obr. 29: Lyze liposomů různého fosfolipidového složení působením segmentu CyaA 411-490. Levý sloupec ukazuje záznamy úniku fluorescenční sondy z jednovrstevných liposomů. Použitá koncentrace segmentu 411-490 je uvedena u jednotlivých křivek. V případě liposomů tvořených DOPC:DOPE (2:1) a azolektinem nedocházelo po prvotním nárůstu fluorescence k dalšímu nárůstu fluorescence v čase. V případě liposomů tvořených převážně negativně nabitými fosfolipidy (DOPG:DOPE (2:1)) docházelo k plynulému nárůstu fluorescence po přidání segmentu 411-490. Míra lyze (% lyze) po jedné hodině v závislosti na použité koncentraci segmentu je zobrazena na panelu vpravo dole.

6. Diskuze

Faktory virulence umožňují bakteriím vstupovat do hostitelského organismu, interagovat s cílovými tkáněmi a čelit imunitní odpovědi hostitele. Díky nim jsou bakterie schopny kolonizovat hostitele. *Bordetella pertussis* produkuje celou řadu faktorů virulence – adheziny a toxiny. Adenylát cyklázový toxin je jejím klíčovým faktorem virulence, bez kterého je bakterie avirulentní, alespoň v myším modelu (Khelef *et al.*, 1992). Zkoumání CyaA je významné nejen z pohledu základního výzkumu, ale také kvůli možným aplikacím. CyaA je díky své schopnosti přímo translokovat svou adenylát cyklázovou doménu přes plasmatickou membránu cílové buňky vhodným proteinem pro biomedicínské využití, jako nástroj pro dopravu cizorodých antigenů do buněk, které následně prezentují tyto antigeny na svém povrchu (Sebo *et al.*, 2014). V současné době se také pracuje na vývoji nové generace vakcín proti pertusi obsahujících CyaA, proto je porozumění mechanismu působení toxinu na cílové buňky naprosto klíčové.

Cílem této diplomové práce bylo bližší zkoumání role segmentu 400-500 v interakci toxinu s membránou. Tato práce v mnohém navazuje na práci naší laboratoře stejně tak jako na další recentní studie zabývající se tímto tématem. Adenylát cyklázový toxin interaguje s membránou, kde tvoří diskrétní transmembránové póry. Za jejich tvorbu je zodpovědná hydrofobní doména nacházející se mezi aminokyselinovými zbytky 500-700 (Benz *et al.*, 1994a). Podle predikce sekundárních struktur se v hydrofobní doméně nachází pět transmembránových α -helixů, které jsou zodpovědné za tvorbu transmembránového póru (Osičková *et al.*, 1999). Póry tvořené CyaA jsou v porovnání s póry tvořenými dalšími RTX cytotoxiny malé a vykazují vyšší molekulární dynamiku (Benz *et al.*, 1994a; Masin *et al.*, 2013). Segment 400-500 je sekvenčně unikátní segment spojující AC doménu toxinu a jeho hydrofobní doménu, který se nenachází v žádném dalším RTX cytotoxinu. Jeho přesná role v biologické aktivitě toxinu není v současnosti známa.

Adenylát cyklázový toxin tvoří při vazbě na membránu dva vzájemně kompetující prekurzory, které vedou ke dvěma odlišným aktivitám toxinu – enzymatické aktivitě v cytosolu buňky po translokaci AC domény a pórtvorné aktivitě toxinu (Basler *et al.*, 2007; Masin *et al.*, 2015; Osičková *et al.*, 1999). Odstraněním N-koncové AC domény dojde k potlačení jedné z těchto aktivit - translokaci AC domény přes membránu. Bylo však ukázáno, že odstranění samotné AC domény nevede k žádné výrazné změně v druhé aktivitě toxinu, tvorbě transmembránových pórů (Iwaki *et al.*, 1995). Póry tvořené mutantním toxinem s deletovanou AC doménou (aminokyselinové zbytky 1-373) mají stejné vlastnosti jako póry tvořené

intaktním CyaA (Benz *et al.*, 1994a) Odstranění segmentu přiléhajícího k AC doméně (segment 400-500, aminokyselinové zbytky 6-489), který spojuje AC a hydrofobní domény toxinu, vede k výraznému zvýšení hemolytické a pórotvorné aktivity toxinu. Navíc dochází k tvorbě pórů s vyšší vodivostí (Gray *et al.*, 2001; Masin *et al.*, 2013). Též bylo nedávno ukázáno, že krátký syntetický peptid CyaA 454-484 má destabilizační účinek na membrány liposomů připravených ze syntetických fosfolipidů (Subrini *et al.*, 2013).

Moje výsledky, sledující pórotvornou aktivitu tří mutantních toxinů, kterým chybí různé velké N-koncové části toxinu, ukázaly, že odstranění téměř celého segmentu 400-500 spolu s přiléhajícím prvním předpovězeným α -helixem hydrofobní domény vede ke zvýšení pórotvorné aktivity mutantních toxinů. Odstranění i druhého předpovězeného α -helixu ale vede k výraznému snížení pórotvorné aktivity toxinu. Při podrobnějším zkoumání charakteru záznamu jednotlivých mutantních toxinů se ukázalo, že odstranění aminokyselinových zbytků 6-518 vedlo k narušení schopnosti toxinu tvořit dobře definované diskrétní póry. Tento mutantní toxin (CyaA- Δ N518) způsobuje plynulý nárůst vodivosti na membráně. Ten může být způsoben narušením celkové struktury transmembránového póru například jejím rozvolněním v důsledku odstranění klíčového aminokyselinového zbytku nutného pro strukturní integritu póru. Takovým zbytkem může být například negativně nabitý zbytek kyseliny glutamové v pozici 496. V dřívějších studiích, stejně tak i v části této diplomové práce byla totiž popsána důležitost negativně nabitých aminokyselinových zbytků pro správnou funkci toxinu. Bylo např. ukázáno, že celkovou změnou náboje helixu 3 může být zabráněno translokaci AC domény toxinu přes plasmatickou membránu (Basler *et al.*, 2007). I přesto že se tento aminokyselinový zbytek nenachází v prvním předpovězeném α -helixu tvořící transmembránový pór, je možné, že spojující segment 400-500 se podílí na struktuře transmembránového póru a tím může způsobovat malou vodivost CyaA pórů. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že odstranění spojujícího segmentu vede k tvorbě pórů s vyšší vodivostí (Masin *et al.*, 2013).

Odstranění dvou předpovězených α -helixů hydrofobní domény vedlo k tvorbě pórů se dvěma oddělenými vodivostními stavy a zvýšenou stabilitou póru. Nicméně frekvence tvorby pórů byla výrazně snížena. Snížení schopnosti tohoto mutantního toxinu tvořit póry však nebylo poměrně překvapivě dáno snížením inzerce CyaA- Δ N549 do membrány (Mašín *et al.*, nepublikováno). Tato naměřená data z BLM však plně neodpovídají jak našim (Mašín *et al.*, nepublikováno), tak dříve měřeným hemolytickým aktivitám mutantního toxinu na erythrocytech, kdy došlo ke snížení hemolytické aktivity CyaA- Δ N549 oproti intaktnímu CyaA

zhruba pouze na polovinu (Gray *et al.*, 2001). To je pravděpodobně dáno skutečností, že na černých lipidových membránách sledujeme pórtvornou aktivitu (otevření a zavření póru) jedné molekuly toxinu. Naopak, hemolytická (pórtvorná) aktivita CyaA na erytrocytech, spojená s uvolněním hemoglobinu, je koloidně osmotická lyze buňky, ke které dochází až po několika hodinách od vytvoření vlastního póru (Ehrmann *et al.*, 1992; Gray *et al.*, 1998), v němž důležitou roli může hrát také oligomerizace CyaA (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). Jak bylo dříve ukázáno, vyšší vodivostní stavy CyaA molekuly, stejně tak jako délka života póru mohou vést k dramatické změně hemolytické aktivity toxinu na erytrocytech (Basler *et al.*, 2007; Masin *et al.*, 2016). Póry tvořené mutantním toxinem CyaA-ΔN549 mohou potenciálně vznikat oligomerizací s jinou „membránovou konformací“ než je tomu u intaktního CyaA. Odstranění téměř poloviny α -helixů podílejících se na tvorbě CyaA póru společně se segmentem 400-500 může vést k narušení míst interakce mezi jednotlivými helixy a vzniku nových uspořádání v membráně.

V hydrofobní doméně CyaA bylo předpovězeno pět transmembránových α -helixů, tvořících transmembránový pór (Osičková *et al.*, 1999). Role několika helixů již byla podrobněji zkoumána. Konkrétně se studie zaměřily na negativně nabitě aminokyselinové zbytky, které se v těchto helixech nacházejí (Basler *et al.*, 2007; Osičková *et al.*, 1999). V těchto studiích bylo ukázáno že negativní náboj helixů je nutný pro translokaci AC domény toxinu přes cytoplasmatickou membránu. Přesný mechanismus translokace je v současné době stále neobjasněn. Je známo, že pro translokaci AC domény je nutný membránový potenciál a celkový kladný náboj na jejím povrchu (Otero *et al.*, 1995). Z těchto výsledků vznikla hypotéza, že negativní náboj na helixech hydrofobní domény napomáhá translokaci AC domény pomocí elektrostatických interakcí. Změna celkového náboje helixů 1 a 3 totiž vedla k úplné blokaci translokace (Basler *et al.*, 2007; Osičková *et al.*, 1999).

Role negativně nabitých aminokyselinových zbytků v segmentu 400-500 byla zkoumána cílenou mutagenézí. Negativní aminokyselinové zbytky se v segmentu nacházejí ve třech blocích. Záměna aminokyselinových zbytků v bloku II a III vedlo ke zvýšené hemolytické aktivitě mutantních toxinů. Co však bylo velmi překvapivé, translokace AC domény přes membránu nebyla mutagenézí ovlivněna u žádného z mutantních toxinů (Masin *et al.*, 2016).

Zkoumání pórtvorné aktivity mutantních toxinů ukázalo, že záměna negativně nabitých aminokyselinových zbytků za neutrální nebo kladně nabitě zbytky vedla ke zvýšení celkové membránové aktivity mutantních toxinů. Celková membránová aktivita toxinů komplexně popisuje interakci toxinu s membránou. Je součinem vodivosti jednotlivých pórů, doby života

pórů a frekvence tvorby pórů. Stanovení prvních dvou z těchto parametrů nám umožňuje vyjádřit i třetí parametr, tedy frekvenci tvorby pórů. Mutantní toxiny, kde došlo mutagenézí ke změně náboje v segmentu 400-500 na kladný, vykazovaly především zvýšenou frekvenci tvorby pórů. To je významné hlavně u toxinu CyaA-E419K-E432K, kde byla celková membránová aktivita zvýšena téměř 100x, zatímco ostatní parametry póru byly srovnatelné s parametry póru tvořeného intaktním CyaA. U mutantních toxinů s neutralizovaným nábojem došlo jednak k tvorbě pórů podobným intaktnímu toxinu, tak i tvorbě pórů s vyšší vodivostí. Došlo také ke zvýšení frekvence tvorby pórů. Zkoumání jednotlivých bodových mutací s neutrálními aminokyselinovými zbytky v bloku III ukázalo, že zvýšená celková membránová aktivita je aditivním efektem všech tří zásahových míst. Nicméně záměna jednotlivých aminokyselinových zbytků byla dostačující pro tvorbu pórů s vyšší vodivostí (Masin *et al.*, 2016).

Závěrem této studie tedy bylo to, že negativně nabitě aminokyselinové zbytky se nepodílejí na translokaci AC domény toxinu, jako je tomu u negativně nabitých aminokyselin hydrofobní domény, ale hrají roli v pórotvorné aktivitě toxinu. Jejich záměnou by mohlo docházet k rozvolnění struktury transmembránového póru. Naše hypotéza, se kterou dále pracujeme je taková, že segment 400-500 může regulovat průměr vzniklého póru, a to dosud neznámým mechanismem (Masin *et al.*, 2016). Póry tvořené CyaA mají relativně malý průměr, kolem 0,6 nm (Ehrmann *et al.*, 1992) v porovnání s dalšími charakterizovanými póry tvořenými jinými RTX cytotoxiny, které tvoří póry o průměru kolem 2 nm (Benz *et al.*, 1989, 1994b; Maier *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1996). Důvodem je pravděpodobně právě přítomnost segmentu 400-500 jehož homolog se v žádném z dalších RTX cytotoxinů nenachází.

Nedávno bylo ukázáno, že krátký synteticky připravený peptid CyaA 454-484 interaguje s membránou a destabilizuje ji (Subrini *et al.*, 2013). Tyto pokusy byly prováděny na liposomech s různým lipidovým složením. Bylo zjištěno, že syntetický peptid preferenčně interaguje s membránami připravenými z negativně nabitých fosfolipidů. Pro potřebu studia vlivu náboje polárních hlaviček fosfolipidů na aktivitu CyaA bylo nutno zavést nové systémy o rozdílném lipidovém složení. V našich i dalších experimentech s umělými lipidovými systémy se převážně používá azolektin (Azolektin 11145, Sigma Aldrich), tedy lipidový izolát ze sóji. Tento typ azolektinu se používá historicky proto, neboť CyaA je na něm velmi aktivní (relativně k fosfolipidům o definovaném složení) (Benz *et al.*, 1994a; Mašín *et al.*, 2004). Analýza kompozice polární hlavičky i mastných kyselin provedená v Laboratoři fyziologie bakterií ukázala, že v námi používaném azolektinu se nachází široké spektrum fosfolipidů

z nichž 20% má polární hlavičku s negativním nábojem. Z tohoto důvodu bylo potřeba zavést nové systémy o definovém fosfolipidovém složení. Jako polární hlavičky byly vybrány fosfatidylcholin (PC) pro neutrální membrány a fosfatidylglycerol (PG) pro membrány s negativním nábojem. Dále byl do obou systémů přidán fosfatidyletanolamin (PE). PE netvoří dvojvrstvu (nachází se v tzv. hexagonální fázi II) a podporuje negativní zakřivení membrány (Rojko a Anderluh, 2015; Yeagle, 1989). PE byl do směsí přidáván především z důvodu zvýšení komplexnosti membrány. Jak bylo ukázáno defekty v povrchu membrán způsobené různorodostí fosfolipidového složení usnadňují inzerci PFT do membrány (Rojko a Anderluh, 2015). Vliv DOPE na aktivitu CyaA již byl zkoumán a bylo ukázáno, že jeho přítomnost vede ke zvýšení destabilizačního účinku CyaA na liposomech (Martín *et al.*, 2004). Jako mastná kyselina byla vybrána kyselina olejová (18:1). Tato mastná kyselina je biologicky relevantní pro měření CyaA. Při experimentech s umělými membránovými systémy jsou často používány diphytanoly, které se primárně vyskytují v membráně *Archaea* (Tornabene a Langworthy, 1979). Nicméně bylo ukázáno, že fluidita membrány a délka mastné kyseliny může hrát roli ve vlastnostech pórů tvořených toxiny (Rojko a Anderluh, 2015). Tato skutečnost byla také pro CyaA ukázána v diplomové práci Mgr. Roberta Rädische (2016). Membrány tvořené směsí syntetických fosfolipidů DOPC:DOPE a DOPG:DOPE byly velmi stabilní. Póry CyaA byly na těchto membránách charakterizovány (data nejsou ukázána) a vykazují parametry podobné pórům sledovaným na membránách tvořených azolektinem. Tyto dva nové lipidové systémy byly shledány vhodnými pro zkoumání interakce segmentu 400-500 s membránou s různým povrchovým nábojem. Pro charakterizaci byly využity dvě metody – černé lipidové membrány, pro sledování charakteru vzniklého póru, a dále měření úniku fluorescenční sondy z liposomů, které ukazuje pouze obecně destabilizaci membrány (destrukci membrány liposomů). Pro obě metody byly použity co nejvíce srovnatelné podmínky – bylo použito stejné lipidové složení a stejný elektrolyt. Přesto jsou mezi těmito metodami zjevné rozdíly, které hrají roli při interpretaci výsledků. Jednou z výhod metody BLM je možnost aplikace elektrického potenciálu na membrány. Elektrický potenciál se na liposomech nenachází, což může mít vliv na interakci CyaA s membránou (Martín *et al.*, 2004; Otero *et al.*, 1995). Dále se ale liší samotné membrány jednotlivých systémů. V případě BLM se membrána vytváří ze suspenze lipidů rozpuštěných v organickém rozpouštědle. Použitý butanol pravděpodobně přechází do vodné fáze, dekan ale v membráně zůstává a tvoří její hydrofobní jádro (Montal a Mueller, 1972). Díky přítomnosti rozpouštědla nedochází k vytváření lipidových mikrodomén. Rozhraní lipidových mikrodomén často funguje jako místo inserce toxinu do membrány (Rojko a Anderluh, 2015). V případě CyaA dochází v prostředí mikrodomén k translokaci AC domény

přes membránu (Bumba *et al.*, 2010). Membrány liposomů jsou připravovány bez rozpouštědla, tedy obsahují lipidové mikrodomény. Další rozdílem je zakřivení membrány. Liposomy jsou kulaté váčky, nicméně při průměru váčku 100 nm je zakřivení membrány v porovnání s planární membránou zanedbatelné. Posledním a asi nejdůležitějším rozdílem mezi provedenými pokusy je koncentrace použitých látek pro jednotlivá měření. Pro obě měření byla použita koncentrace sledovaných látek v řádu μM . Nicméně plocha dostupné membrány se mezi jednotlivými systémy značně lišila. V případě BLM je plocha membrány přibližně $0,5 \text{ mm}^2$, v případě liposomů je povrch membrán až několik desítek mm^2 . Při interpretaci dat je tedy vhodné zohlednit poměr zkoumané látky a plochy membrány.

Nejprve byla zkoumána interakce krátkého syntetického peptidu CyaA 454-484 s membránou. Pokud se zaměříme na samotné výsledky, oběma metodami bylo ukázáno, že syntetický peptid CyaA 454-484 interaguje s membránou. Charakter této interakce měřený na BLM je nicméně špatně charakterizovatelný co do vlastností pórů (vodivost pórů, doba života pórů), neboť se projevuje pouze krátkými výkyvy vodivosti. Aktivita syntetického peptidu byla na BLM velmi malá, proto je těžké posoudit případnou preferenci k lipidovému složení membrány. Při měření úniku fluorescenční sondy z liposomů se projevil zjevný vliv složení membrány na aktivitu syntetického peptidu. Při nízkých koncentracích syntetický peptid způsoboval srovnatelný únik fluorescenční sondy bez ohledu na náboj membrány. Na membránách tvořených neutrálními fosfolipidy nedocházelo se stoupající koncentrací syntetického peptidu k výraznému nárůstu lyze liposomů. V případě liposomů s částečným a převažujícím negativním nábojem docházelo k lineárnímu nárůstu procenta lyze liposomů po jedné hodině se zvyšující se koncentrací syntetického peptidu.

Pro interpretaci těchto výsledků je dobré se zaměřit pouze na strukturu tohoto syntetického peptidu. Jedná se o krátký peptid tvořený 30 aminokyselinovými zbytky, který v membránovém prostředí zaujímá α -helikální strukturu (Subrini *et al.*, 2013). Velmi podobnou strukturu mají některé antimikrobiální peptidy, jejichž mechanismus interakce s membránou je v mnohých případech dobře popsán. Při studiu dvou α -helikálních antimikrobiálních peptidů, konkrétně melitinu a magaininu, bylo ukázáno, že orientace peptidu vůči membráně značně závisí na fosfolipidovém složení membrány, ale hlavně na poměru peptid:lipid (Ludtke *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2001). V případě malého množství peptidu docházelo pouze k vazbě peptidu na membránu a zaujmutí paralelního uspořádání s membránou. V tomto případě nedocházelo k inserci peptidu do membrány a tvorbě transmembránového póru. Při zvýšení poměru peptid:lipid docházelo k inserci peptidu do membrány a vytvoření transmembránové póru.

Kromě poměru peptid:lipid měl ale na aktivitu peptidu také vliv lipidové složení membrány, především délka řetězců mastných kyselin (Yang *et al.*, 2001). V dřívější studii zabývající se syntetickým peptidem CyaA 454-484 bylo předpovězeno, že peptid je orientován paralelně s membránou a že se zanořuje do vnějšího listu membrány (Subrini *et al.*, 2013). Kombinací mnoha získaných výsledků z BLM a měření na liposomech je možno dále diskutovat možný mechanismus interakce syntetického peptidu s membránou. Syntetický peptid CyaA 454-484 je schopen interakce s membránou bez ohledu na náboj membrány, jak je to vidět při nízkých koncentracích peptidu při měření úniku sondy z liposomů a v záznamech z měření pomocí BLM. Negativně nabitě fosfolipidové hlavičky ale pravděpodobně usnadňují nebo dokonce zprostředkovávají případnou interakci mezi jednotlivými molekulami peptidu, což by mohlo vést k vytváření potenciálně stabilnějších nebo větších narušení membrány, tedy zvýšení úniku fluorescenční sondy z liposomů. Peptid by také mohl využívat rozhraní lipidových mikrodomén v membráně liposomů pro svou inserci do membrány. To by vysvětlovalo velmi nízkou aktivitu peptidu pozorovanou na BLM. Jak již bylo diskutováno, mikrodomény se v membráně BLM nenacházejí.

V další části studia interakce segmentu 400-500 s plasmatickou membránou jsem se zabývala segmentem CyaA 411-490. Podle predikce sekundárních struktur je segment tvořen dvěma delšími α -helixy spojenými flexibilním úsekem. Pomocí CD spekter bylo ukázáno, že segment opravdu zaujímá α -helikální strukturu a že je schopen se vázat do membrány připravené z azolektinu s příměsí cholesterolu (Masin *et al.*, 2016). Mé experimenty ukázaly, že segment 411-490 s malou frekvencí tvořil velmi stabilní transmembránové póry v planárních membránách. Tyto transmembránové póry měly široký rozptyl vodivosti. Takového chování může naznačovat vznik toroidního póru, tak jako to bylo popsáno například u magaininu (Duclohier *et al.*, 1989; Ludtke *et al.*, 1996). Pokud byla ale interakce segmentu 411-490 s membránou měřena pomocí úniku fluorescenční sondy, schopnost segmentu destabilizovat membrány byla velmi nízká. V případě neutrálních membrán a membrán s malým částečným negativním nábojem, segment nebyl schopen vyvolávat trvalý nárůst fluorescence po prvotním přidání segmentu k liposomům. Plynulý nárůst fluorescence bylo možno pozorovat pouze na liposomech s převažujícím negativním nábojem na membráně. Podobně jako u syntetického peptidu, je možno spekulovat, že právě negativně nabitě hlavičky fosfolipidů by mohly hrát roli v interakci mezi jednotlivými molekulami segmentu 411-490. Pokud se vrátíme k roli poměru peptid:lipid popisovanému u antimikrobiálních peptidů (Yang *et al.*, 2001), můžeme zkusit vysvětlit nízkou destabilizační aktivitu segmentu. Charakteristika interakce segmentu

s membránou ukázala, že segment tvoří definované velmi stabilní póry s relativně velkým rozptylem vodivosti. Na tvorbě těchto pórů se může podílet několik vzájemně interagujících molekul. Pokud dochází z destabilizaci liposomů stejným principem, tedy tvorbou pórů z několika molekul, nízká míra lyze liposomů není překvapivá. Segment se pravděpodobně váže na membránu liposomů, ale pouze na části liposomů je molekul segmentu dostatečné množství pro vytvoření transmembránového póru, který by způsobil únik sondy. Pro společnou agregaci několika molekul segmentu může být také nutná přítomnost negativně nabitých hlaviček fosfolipidů.

Ve své práci jsem ukázala, že segment 400-500 je schopen interakce s membránou. Za tuto interakci je patrně zodpovědná hlavně jeho C-koncová část. Interakce preferenčně probíhá na membránách tvořených fosfolipidy s negativním nábojem. Negativní náboj se ale na povrchu eukaryotických buněk za normálních okolností nevyskytuje. Nicméně bylo ukázáno, že CyaA má schopnost narušovat fosfolipidovou asymetrii vnitřního a vnějšího listu membrány přesunem jednotlivých fosfolipidů (Martín *et al.*, 2004), případně způsobuje velmi rychlou apoptózu (Ahmad *et al.*, 2016; Khelef *et al.*, 1993), při které dochází k přesunu negativně nabitého fosfatidylserinu do vnějšího listu membrány. Mnou získané výsledky (nejsou ukázány) z měření pórotvorné aktivity na membránách s definovaným složením ukazují, že póry tvořené intaktním CyaA toxinem na membránách s negativním nábojem mají výrazně vyšší molekulární stabilitu a mírně zvýšenou vodivost. Můžeme tedy spekulovat, že CyaA svým působením způsobuje přesun negativně nabitých fosfolipidů do vnějšího listu membrány a tím může zvyšovat svoji pórotvornou a tím i cytotoxickou aktivitu na cílových buňkách (Basler *et al.*, 2006; Hewlett *et al.*, 2006).

7. Souhrn

- ukázala jsem, že delece N-koncových 518 aminokyselinových zbytků vedla ke ztrátě schopnosti CyaA tvořit definované póry
- ukázala jsem, že delece N-koncových 549 aminokyselinových zbytků vedla k dramatickému snížení membránové aktivity CyaA, tvorbě vyšších vodivostních stavů póru a také tvorbě pórů s delší dobou života, v porovnání s intaktním toxinem
- ukázala jsem, že záměny negativně nabitých aminokyselin v segmentu spojující AC doménu a tzv. RTX hemolyzin za neutrální, případně pozitivně nabitě, vedly ke zvýšené frekvenci tvorby pórů, případně k tvorbě vyšších vodivostních stavů pórů
- ukázala jsem, že peptid CyaA 454-484 způsobuje únik fluorescenční sondy z liposomů a také způsobuje tvorbu špatně definovaných „událostí“ (co do charakteristiky póru) na černých lipidových membránách
- ukázala jsem, že segment 411-490 způsobuje únik fluorescenční sondy z liposomů a také tvorbu vysoce stabilních pórů na černých lipidových membránách

8. Seznam literatury:

- Ahmad, J.N., Cerny, O., Linhartova, I., Masin, J., Osicka, R., a Sebo, P. (2016). cAMP signalling of Bordetella adenylate cyclase toxin through the SHP-1 phosphatase activates the BimEL-Bax pro-apoptotic cascade in phagocytes. *Cell. Microbiol.* 18, 384–398.
- Bakás, L., Veiga, M.P., Soloaga, A., Ostolaza, H., a Goñi, F.M. (1998). Calcium-dependent conformation of *E. coli* α -haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 225–234.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., a Goodwin, M.S.M. (1991). Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* 173, 720–726.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R., a Sebo, P. (2006). Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect. Immun.* 74, 2207–2214.
- Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P., a Osicka, R. (2007). Segments Crucial for Membrane Translocation and Pore-forming Activity of Bordetella Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 12419–12429.
- Bauche, C., Chenal, A., Knapp, O., Bodenreider, C., Benz, R., Chaffotte, A., a Ladant, D. (2006). Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* 281, 16914–16926.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., a McKay, D.B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *EMBO J.* 12, 3357–3364.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., a Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase. *Infect. Immun.* 58, 3242–3247.
- Benz, R. (2016). Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1858, 526–537.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W., a Goebel, W. (1989). Pore Formation by the *Escherichia coli* Hemolysin: Evidence for an Association-Dissociation Equilibrium of the Pore-Forming Aggregates. *Infect. Immun.* 57, 887–895.
- Benz, R., Döbereiner, A., Ludwig, A., a Goebel, W. (1992). Haemolysin of *Escherichia coli*: Comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol. Immunology* 105, 55–62.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., a Sebo, P. (1994a). 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.
- Benz, R., Hardie, K.R., a Hughes, C. (1994b). Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Eur. J. Biochem.* 220, 339–347.
- Benz, R., Maier, E., Bauer, S., a Ludwig, A. (2014). The Deletion of Several Amino Acid Stretches of *Escherichia coli* Alpha- Hemolysin (HlyA) Suggests That the Channel-Forming Domain Contains. *PLoS One* 9, 1–26.
- Bezrukov, S.M., a Kasianowicz, J.J. (1993). Current noise reveals protonation kinetics and number of ionizable sites in an open protein ion channel. *Phys. Rev. Lett.* 70, 2352–2355.
- Bhakdi, S., a Tranum-Jensen, J. (1991). Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55, 733–751.
- Bischofberger, M., Iacovache, I., a van der Goot, F.G. (2012). Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe* 12, 266–275.

- Boehm, D.F., Welch, R.A., a Snyder, I.S. (1990). Calcium Is Required for Binding of Escherichia coli Hemolysin (HlyA) to Erythrocyte Membranes. *Infect. Immun.* 58, 1951–1958.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., a Sebo, P. (2010). Bordetella adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog.* 6, e1000901.
- 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 Beta-Rolls Ratchets Translocation of RTX Proteins through Type I Secretion Ducts. *Mol. Cell* 62, 47–62.
- del Castillo, F.J., Leal, S.C., Moreno, F., a del Castillo, I. (1997). The Escherichia coli K-12 sheA gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol. Microbiol.* 25, 107–115.
- Confer, D., a Eaton, J. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* (80-.). 217, 948–950.
- Duclohier, H., Molle, G., a Spach, G. (1989). Antimicrobial peptide magainin I from Xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers. *Biophys. J.* 56, 1017–1021.
- Dunne, A., Ross, P.J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C.E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P., a Mills, K.H.G. (2010). Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against Bordetella pertussis. *J. Immunol.* 185, 1711–1719.
- Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Gordon, V.M., Gray, L.S., a Hewlett, E.L. (1991). Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *FEBS Lett.* 278, 79–83.
- Ehrmann, I.E., Weiss, A.A., Goodwin, M.S., Gray, M.C., Barry, E., a Hewlett, E.L. (1992). Enzymatic activity of adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis is not required for hemolysis. *FEBS Lett.* 304, 51–56.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., a Leclerc, C. (2003). Interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278, 38514–38521.
- Fabiánová, K., Zavadilová, J., Šebestová, H., Gašpárek, M., a Kříž, B. (2016). Syndrom dávivého kašle. Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2015 – epidemiologická situace. *Zprávy CEM (SZÚ Praha)*.
- Fedele, G., Bianco, M., a Ausiello, C.M. (2013). The virulence factors of bordetella pertussis: Talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* 61, 445–457.
- Fiser, R., Masin, J., Bumba, L., Pospisilova, E., Fayolle, C., Basler, M., Sadilkova, L., Adkins, I., Kamanova, J., Cerny, J., et al. (2012). Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. *PLoS Pathog.* 8, e1002580.
- Fišer, R., Mašín, J., Basler, M., Krůšek, J., Špuláková, V., Konopásek, I., a Šebo, 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.
- Gentschev, I., a Goebel, W. (1992). Topological and functional studies on HlyB of Escherichia coli. *MGG Mol. Gen. Genet.* 232, 40–48.
- Geourjon, C., a Deléage, G. (1995). Sopma: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* 11, 681–684.
- Gilbert, R.J.C., Serra, M.D., Froelich, C.J., Wallace, M.I., a Anderluh, G. (2014). Membrane pore formation at protein-lipid interfaces. *Trends Biochem. Sci.* 39, 510–516.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., a Danchin, A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *EMBO J.* 7, 3997–4004.
- Glaser, P., Elmaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Bâzu, O., a 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.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L., a Hewlett, E. (1998). Distinct Mechanisms for K⁺ Efflux, Intoxication, and Hemolysis by *Bordetella pertussis* AC Toxin. *J. Biol. Chem.* 273, 18260–18267.
- Gray, M.C., Lee, S.J., Gray, L.S., Zaretzky, F.R., Otero, a S., Szabo, G., a Hewlett, E.L. (2001). Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J. Bacteriol.* 183, 5904–5910.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., a Leclerc, C. (2001). The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the alphaMbeta2 Integrin (Cd11b/Cd18). *J. Exp. Med.* 193, 1035–1044.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., a Tang, W.-J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *EMBO J.* 24, 3190–3201.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D., a Hewlett, E. (1994). Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* (80-). 266, 433–435.
- Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., a Sebo, P. (1995). Hemolytic, but Not Cell-invasive Activity, of Adenylate Cyclase Toxin Is Selectively Affected by Differential Fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 20250–20253.
- Hasan, S., Osickova, A., Bumba, L., Novák, P., Sebo, P., a Osicka, R. (2015). Interaction of *Bordetella* adenylate cyclase toxin with complement receptor 3 involves multivalent glycan binding. *FEBS Lett.* 589, 374–379.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M., a Gray, M.C. (2006). Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol. Microbiol.* 59, 447–459.
- Hotze, E.M., a Tweten, R.K. (2012). Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1028–1038.
- Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C., a Koronakis, V. (2001). Membrane Interaction of *Escherichia coli* Hemolysin: Flotation and Insertion-Dependent Labeling by Phospholipid Vesicles. *J. Bacteriol.* 183, 5364–5370.
- Chakraborty, T., Schmid, A., Notermans, S., a Benz, R. (1990). Aerolysin of *Aeromonas sobria*: evidence for formation of ion-permeable channels and comparison with alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 58, 2127–2132.
- Iwaki, M., Ullmann, a, a Sebo, P. (1995). Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol. Microbiol.* 17, 1015–1024.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C., a Ladant, D. (1998). Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: Implication for the in vivo delivery of CD8⁺ T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 12532–12537.
- Karst, J.C., Barker, R., Devi, U., Swann, M.J., Davi, M., Roser, S.J., Ladant, D., a Chenal, A. (2012). Identification of a region that assists membrane insertion and translocation of the catalytic domain of *Bordetella pertussis* CyaA toxin. *J. Biol. Chem.* 287, 9200–9212.
- Khelef, N., Sakamoto, H., a Guiso, N. (1992). Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb. Pathog.* 12, 227–235.
- Khelef, N., Zychlinsky, A., a Guisol, N. (1993). *Bordetella pertussis* Induces Apoptosis in Macrophages : Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin. *61*, 4064–4071.
- Kilgore, P.E., Salim, A.M., Zervos, M.J., a Schmitt, H.J. (2016). Pertussis: Microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 449–486.

- Kinashi, T. (2006). Adhere Upright: A Switchblade-like Extension of Beta2 Integrins. *Immunity* 25, 521–522.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I., a Koronakis, V. (1995). Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol. Microbiol.* 16, 87–96.
- Koronakis, V., Hughes, C., a Koronakis, E. (1991). Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both *Escherichia coli* membranes. *EMBO J.* 10, 3263–3272.
- Koronakis, V., Hughes, C., a Koronakis, E. (1993). ATPase activity and ATP/ADP-induced conformational change in the soluble domain of the bacterial protein translocator HlyB. *Mol. Microbiol.* 8, 1163–1175.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., a Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
- Ladant, D., a Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7, 172–176.
- Ladant, D., Michelson, S., Sarfati, R., Gilles, A.M., Predeleanu, R., a Barzu, O. (1989). Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 264, 4015–4020.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R., a Korostoff, J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol.* 7, 356–361.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., HejnováHolubová, J., Sadílková, L., et al. (2010). RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076–1112.
- Locht, C., Antoine, R., a Jacob-Dubuisson, F. (2001). *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 82–89.
- Ludtke, S.J., He, K., Wu, Y., a Huang, H.W. (1994). Cooperative membrane insertion of magainin correlated with its cytolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1190, 181–184.
- Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., a Huang, H.W. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* 35, 13723–13728.
- Ludwig, A., Schmid, A., Benz, R., a Goebel, W. (1991). Mutations affecting pore formation by haemolysin from *Escherichia coli*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 226–226, 198–208.
- Ludwig, A., Benz, R., a Goebel, W. (1993). Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *MGG Mol. Gen. Genet.* 241–241, 89–96.
- Ludwig, A., Bauer, S., Benz, R., Bergmann, B., a Goebel, W. (1999). Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 31, 557–567.
- Luo, B.H., a Springer, T.A. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 579–586.
- Maier, E., Reinhard, N., Benz, R., a Frey, J. (1996). Channel-Forming Activity and Channel Size of the RTX Toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 64, 4415–4423.
- Martín, C., Requero, M.-A., Masin, J., Konopasek, I., Goñi, F.M., Sebo, P., a Ostolaza, H. (2004). Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J. Bacteriol.* 186, 3760–3765.
- Masin, J., Fiser, R., Linhartova, I., Osicka, R., Bumba, L., Hewlett, E.L., Benz, R., a Sebo, P. (2013). Differences in purinergic amplification of osmotic cell lysis by the pore-forming RTX toxins *bordetella pertussis* CyaA and *actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: The role of pore size. *Infect. Immun.* 81, 4571–4582.
- Masin, J., Osicka, R., Bumba, L., a Sebo, P. (2015). *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique

combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. *Pathog. Dis.* 73, ftv075.

Masin, J., Osickova, A., Sukova, A., Fiser, R., Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osicka, R., a 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.

Mašín, J., Konopásek, I., Svobodová, J., a Šebo, P. (2004). Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1660, 144–154.

Menestrina, G. (1988). *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett.* 232, 217–220.

Montal, M., a Mueller, P. (1972). Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 3561–3566.

Morova, J., Osicka, R., Masin, J., a Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5355–5360.

Mueller, M., Grauschopf, U., Maier, T., Glockshuber, R., a Ban, N. (2009). The structure of a cytolytic α -helical toxin pore reveals its assembly mechanism. *Nature* 459, 726–730.

Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., a Wescott, W.C. (1962). Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* 194, 979–980.

Murray Rosenblatt (1956). Remarks on Some Nonparametric Estimates of a Density Function. *Ann. Math. Stat. Volume 27*, 832–837.

Osicka, R., Osickova, A., Hasan, S., Bumba, L., Cerny, J., a Sebo, P. (2015). Bordetella adenylate cyclase toxin is a unique ligand of the integrin complement receptor 3. *Elife* 4, e10766.

Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R., a Sebo, P. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol. Microbiol.* 75, 1550–1562.

Osička, R., Osičková, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C., a Šebo, P. (2000). Delivery of CD8⁺ T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by Bordetella pertussis adenylate cyclase: Delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect. Immun.* 68, 247–256.

Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R., a Šebo, P. (1999). An amphipathic α -helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J. Biol. Chem.* 274, 37644–37650.

Ostolaza, H., Soloaga, A., a Goni, F.M. (1995). The Binding of Divalent Cations to *Escherichia coli* alpha-Haemolysin. *Eur. J. Biochem.* 228, 39–44.

Otero, A.S., Xiao, Y.B., Gray, M.C., Szabo, G., a Hewlett, E.L. (1995). Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin. *J. Biol. Chem.* 270, 9695–9697.

Parzen, E. (1962). On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *Ann. Math. Stat.* 33, 1065–1076.

Pimenta, A., Young, J., Holland, I., a Blight, M. (1999). Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the *E. coli* haemolysin translocator. *Mol. Gen. Genet.* 261, 122–132.

Rädisch, R. (2016). Pórotyvné vlastnosti toxinu CyaA bakterie Bordetella pertussis a složení membránové dvojvrstvy, Diplomová práce. Univerzita Karlova.

von Rhein, C., Bauer, S., López Sanjurjo, E.J., Benz, R., Goebel, W., a Ludwig, A. (2009). ClyA cytolysin from Salmonella: Distribution within the genus, regulation of expression by SlyA, and pore-forming characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 21–35.

- Rogel, A., a Hanski, E. (1992). Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 22599–22605.
- Rojko, N., a Anderluh, G. (2015). How Lipid Membranes Affect Pore Forming Toxin Activity. *Acc. Chem. Res.* 48, 3073–3079.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., a Ladant, D. (1995). Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin: Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270, 26370–26376.
- Sanchez-Magraner, L., Viguera, A.R., Garcia-Pacios, M., Garcillan, M.P., Arrondo, J.-L.R., de la Cruz, F., Goni, F.M., a Ostolaza, H. (2007). The Calcium-binding C-terminal Domain of *Escherichia coli* -Hemolysin Is a Major Determinant in the Surface-active Properties of the Protein. *J. Biol. Chem.* 282, 11827–11835.
- Sánchez-Magraner, L., Cortajarena, A.L., García-Pacios, M., Arrondo, J.-L.R., Agirre, J., Guérin, D.M.A., Goñi, F.M., a Ostolaza, H. (2010). Interdomain Ca^{2+} effects in *Escherichia coli* alpha-haemolysin: Ca^{2+} binding to the C-terminal domain stabilizes both C- and N-terminal domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1225–1233.
- Saron, M.F., Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., a Leclerc, C. (1997). Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 3314–3319.
- Sebo, P., Osicka, R., a Masin, J. (2014). Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 13, 1215–1227.
- Seydlova, G., Beranova, J., Bibova, I., Dienstbier, A., Drzmisek, J., Masin, J., Fiser, R., Konopasek, I., a Vecerek, B. (2017). The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J. Biol. Chem.* jbc.M117.781559.
- Schindel, C., Zitzer, A., Schulte, B., Gerhards, A., Stanley, P., Hughes, C., Koronakis, V., Bhakdi, S., a Palmer, M. (2001). Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. *Eur. J. Biochem.* 268, 800–808.
- Schmidt, H., Maier, E., Karch, H., a Benz, R. (1996). Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Eur. J. Biochem.* 241, 594–601.
- Soloaga, A., Ramírez, J.M., a Goñi, F.M. (1998). Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of *Escherichia coli* alpha-hemolysin, a protein stable in 6 M urea. *Biochemistry* 37, 6387–6393.
- Song, L., Hobough, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., a Gouaux, J.E. (1996). Structure of Staphylococcal alpha-Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* (80-.). 274, 1859–1865.
- Sotomayor-Pérez, A.-C., Ladant, D., a Chenal, A. (2014). Disorder-to-Order Transition in the CyaA Toxin RTX Domain: Implications for Toxin Secretion. *Toxins (Basel)*. 7, 1–20.
- Stanley, P., Koronakis, V., a Hughes, C. (1991). Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5, 2391–2403.
- Stanley, P., Packman, L., Koronakis, V., a Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* (80-.). 266, 1992–1996.
- Subrini, O., Sotomayor-Pérez, A.-C., Hessel, A., Spiaczka-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.
- Szabo, G., Gray, M., a Hewlett, E. (1994). Adenylate-cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayer in a calcium-dependent and polarity-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 269, 22496–22499.

- Šebo, P., a Ladant, D. (1993). Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol. Microbiol.* 9, 999–1009.
- Thanassi, D.G., a Hultgren, S.J. (2000). Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 420–430.
- Thomas, S., Holland, I.B., a Schmitt, L. (2014). The Type 1 secretion pathway — The hemolysin system and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 1629–1641.
- Tien, H.T., a Dawidowicz, E.A. (1966). Black lipid films in aqueous media: A new type of interfacial phenomenon. *J. Colloid Interface Sci.* 22, 438–453.
- Tornabene, T., a Langworthy, T. (1979). Diphytanyl and dibiphytanyl glycerol ether lipids of methanogenic archaeobacteria. *Science* (80-.). 203.
- Uribe, K.B., Ettxebarria, A., Martín, C., a Ostolaza, H. (2013). Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *PLoS One* 8, e67648.
- Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J.-M., Ladant, D., a Chopineau, J. (2013). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20473–20478.
- Villarino Romero, R., Osicka, R., a Sebo, P. (2014). Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: a key adhesin with immunomodulatory properties? *Future Microbiol.* 9, 1339–1360.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., a Sebo, P. (2009). Oligomerization is involved in pore formation by *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *FASEB J.* 23, 2831–2843.
- Wald, T., Petry-Podgorska, I., Fiser, R., Matousek, T., Dedina, J., Osicka, R., Sebo, P., a Masin, J. (2014). Quantification of potassium levels in cells treated with *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Anal. Biochem.* 450, 57–62.
- Wallace, A.J., Stillman, T.J., Atkins, A., Jamieson, S.J., Bullough, P.A., Green, J., a Artymiuk, P.J. (2000). *E. coli* Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-Ray Crystal Structure of the Toxin and Observation of Membrane Pores by Electron Microscopy. *Cell* 100, 265–276.
- Wandersman, C., a Delepelaire, P. (1990). TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4776–4780.
- Welch, R.A. (1991). Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 5, 521–528.
- Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., a Huang, H.W. (2001). Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophys. J.* 81, 1475–1485.
- Yeagle, P.L. (1989). Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.* 3, 1833–1842.
- Yin, Y., Zhang, F., Ling, V., a Arrowsmith, C.H. (1995). Structural analysis and comparison of the C-terminal transport signal domains of hemolysin A and leukotoxin A. *FEBS Lett.* 366, 1–5.