

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



**Bc. Nela Klímová**

**Úloha RTX domény v aktivitě adenylátcyklázového toxinu  
z *Bordetella pertussis***

The role of RTX domain in the activity of adenylate cyclase toxin  
from *Bordetella pertussis*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Ladislav Bumba, Ph.D

Praha, 2015

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

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne 4. května 2015

Bc. Nela Klímová

.....

*Upřímné poděkování mému školiteli Mgr. Ladislavu Bumbovi, Ph.D. za poskytnutí ohromné podpory a zároveň dostatečné volnosti při mém odborném růstu. Dále také za cenné rady a připomínky při vypracovávání diplomové práce.*

*Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře Dr. Peteru Šebovi, CSc. za možnost pracovat v perfektně fungující laboratoři, a za starostlivost a podporu.*

*V neposlední řadě bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D. za trpělivé vedení při charakterizaci biologických aktivit adenylátcyklázového toxinu, Ing. Iloně Bíbové za pomoc při práci s RNA a RNDr. Lucii Bednárové, CSc. za zprostředkování měření cirkulárním dichroismem.*

*Mé poděkování patří i celému kolektivu laboratoře Molekulární biologie bakteriálních patogenů, a laborantkám Ivě Maršíkové, Soně Charvátové a Haně Kubínové za technickou podporu.*

*Na závěr bych chtěla poděkovat svému příteli Pavlu Švehlovi za morální podporu a cenné rady v průběhu vypracovávání diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu.*

Tato diplomová práce vznikla v letech 2012 – 2015 v rámci grantového projektu GA15-11851S - Molekulární mechanismus proteinového transportu pomocí bakteriálního sekrečního aparátu typu I (podporovaného Grantovou agenturou České republiky).

## ABSTRAKT

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis* je protein sestávající z 1706 aminokyselin, obsahující na svém N-konci enzymatickou adenylátcyklázovou (AC) doménu a na C-konci repetitivní RTX (z angl. Repet-in-Toxin) doménu. Přítomnost RTX domény řadí CyaA do rodiny tzv. RTX proteinů, sekretovaných z cytosolu gramnegativních bakterií sekrečním aparátem typu I (T1SS). RTX doména CyaA se skládá z pěti bloků nonapeptidových RTX repetit s konsenzuální sekvencí X-(L/I/V)-X-G-G-X-G-X-D. Cílem této práce bylo určit úlohu RTX domény v biologické aktivitě CyaA a její vliv na sekreci toxinu z buněk *Bordetella pertussis*. Systematická deleční analýza bloků RTX repetit ukázala, že žádná z připravených delečních variant toxinu nebyla schopna translokovat AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu cílových buněk a tvořit póry v membránách těchto buněk. Odstranění jednotlivých bloků RTX repetit vedlo navíc k nízké efektivitě sekrece mutant do vnějšího prostředí bakterie. Z těchto dat vyplývá, že strukturní celistvost RTX domény CyaA hraje klíčovou úlohu nejen v cytotoxické aktivitě proteinu, ale napomáhá i při jeho sekreci přes T1SS.

**Klíčová slova:** adenylátcyklázový toxin, CyaA, RTX doména, RTX proteiny, RTX bloky, translokace AC domény, hemolytická aktivita, sekrece, sekreční aparát typu I, T1SS

## ABSTRACT

The adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis* is a 1706-residue protein comprising an amino-terminal adenylate cyclase (AC) domain and a carboxy-terminal Repeat-in-Toxin (RTX) domain. The RTX domain is a hallmark of the family of RTX proteins, which are secreted from the cytosol of Gram-negative bacteria to the cell environment through the Type I Secretion System (T1SS). The RTX domain of CyaA consists of five blocks of RTX nonapeptide repeats with a consensus sequence X-(L/I/V)-X-G-G-X-G-X-D. The aim of this work was to determine the role of the RTX domain in biological activities of CyaA and its role in the secretion of the toxin molecule from *Bordetella pertussis*. Systematic deletion analysis revealed that none of the prepared CyaA constructs was able to translocate its AC domain across the cytoplasmic membrane of host cells and make pores in target membranes. Moreover, deletion of individual RTX repeat blocks resulted in a very low efficacy of secretion of CyaA mutants into cell exterior. These data suggested that structural integrity of the RTX domain of CyaA is essential not only for cytotoxic activities of the toxin molecule but also for its secretion through the T1SS.

**Key words :** adenylate cyclase toxin, CyaA, RTX domain, RTX proteins, blocks of RTX repeats, AC domain translocation, haemolytic activity, secretion, Type I Secretion System, T1SS

# OBSAH

1	ÚVOD .....	8
2	PŘEHLED LITERATURY .....	9
2.1	Adenylátcyklázový toxin .....	9
2.1.1.1	Bakterie <i>Bordetella pertussis</i> a její virulence .....	9
2.1.2	Struktura adenylátcyklázového toxinu .....	11
2.1.3	Model interakce CyaA s cílovými buňkami .....	12
2.2	RTX proteiny .....	14
2.2.1	Obecná charakteristika RTX proteinů .....	14
2.2.2	Struktura RTX proteinů .....	17
2.3	Sekreční aparát typu I (T1SS) .....	18
2.3.1	Struktura sekrečního aparátu typu I .....	18
2.3.1.1	HlyB – ABC přenašeč .....	18
2.3.1.2	HlyD – adaptér .....	19
2.3.1.3	TolC – protein vnější membrány .....	19
2.3.2	Srovnání struktur T1SS pro sekreci HlyA u <i>E. coli</i> a CyaA u <i>B. pertussis</i> .....	21
2.3.3	Mechanismus sekrece sekrečním aparátem typu I .....	22
3	MATERIÁL A METODY .....	24
3.1	Materiál .....	24
3.1.1	Plazmidy .....	24
3.1.2	Bakteriální kmeny .....	24
3.1.3	Syntetické oligonukleotidy .....	25
3.1.4	Protilátky .....	25
3.1.5	Restrikční endonukleázy a jejich pufry .....	26
3.2	Metody .....	26
3.2.1	Molekulárně-biologické metody .....	26
3.2.1.1	Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk .....	26
3.2.1.2	Minipreparativní izolace plazmidové DNA .....	27
3.2.1.3	Izolace plazmidové DNA Lego Kitem .....	27
3.2.1.4	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami .....	28
3.2.1.5	Ligace fragmentů DNA .....	28
3.2.1.6	Amplifikace fragmentů DNA .....	28
3.2.1.7	Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu .....	29
3.2.1.8	Bakteriální konjugace .....	29
3.2.1.9	Homologní rekombinace .....	30
3.2.1.10	Izolace celkové RNA a její ošetření DNázou .....	30
3.2.1.11	Reverzní transkripce .....	31
3.2.1.12	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR) .....	32
3.2.2	Produkce a purifikace proteinů .....	32
3.2.2.1	Produkce CyaA proteinů v třepané kultuře .....	32

3.2.2.2	Příprava močovinového extraktu CyaA proteinů.....	33
3.2.2.3	Purifikace CyaA proteinů pomocí kapalinové chromatografie na DEAE iontoměníči 34	
3.2.2.4	Purifikace proteinů afinitní chromatografií na kalmodulin-agaróze .....	34
3.2.2.5	Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové .....	35
3.2.2.6	Elektroforéza SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu .....	35
3.2.2.7	Imunochemická detekce proteinu na membráně.....	36
3.2.3	Stanovení biologických aktivit CyaA proteinů .....	37
3.2.3.1	Stanovení adenylátcyklázové aktivity .....	37
3.2.3.2	Příprava suspenze erytrocytů .....	38
3.2.3.3	Stanovení vazebné aktivity CyaA na erytrocytech.....	38
3.2.3.4	Stanovení invazivní aktivity CyaA na erytrocytech.....	39
3.2.3.5	Stanovení hemolytické aktivity CyaA na erytrocytech .....	40
3.2.3.6	Stanovení vazebné aktivity CyaA na makrofázích.....	40
3.2.3.7	Stanovení hladiny vnitrobuněčného cAMP v makrofázích .....	41
3.2.3.8	Cirkulární dichroismus .....	43
3.2.3.9	Stanovení sekrece proteinů sekrečním aparátem <i>B. pertussis</i> .....	44
4	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	45
5	<b>VÝSLEDKY</b> .....	46
5.1	<b>Příprava CyaA proteinů nesoucích postupné delece v RTX doméně</b> .....	46
5.1.1	Příprava expresních vektorů nesoucích delece v RTX doméně CyaA.....	47
5.1.2	Produkce CyaA proteinů v <i>E. coli</i> a jejich purifikace .....	48
5.2	<b>Charakterizace biologických aktivit mutovaných CyaA na erytrocytech</b> .....	51
5.3	<b>Charakterizace biologických aktivit mutovaných CyaA na buňkách nesoucích specifický receptor CD11b/CD18</b> .....	54
5.4	<b>Mapování antigenního epitopu pro protilátku 9D4</b> .....	55
5.5	<b>Analýza sekundární struktury CyaA a mutovaných CyaA pomocí cirkulárního dichroismu</b> .....	56
5.6	<b>Role RTX domény při sekreci proteinu CyaA z <i>B. pertussis</i></b> .....	57
5.6.1	Příprava mutantních kmenů <i>B. pertussis</i> .....	58
5.6.2	Sekrece mutovaných CyaA v <i>B. pertussis</i> .....	61
5.6.3	Stanovení hladiny mRNA genů <i>cya</i> operonu.....	65
6	<b>DISKUZE</b> .....	68
7	<b>SOUHRN</b> .....	75
8	<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	76
9	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	78

# 1 ÚVOD

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis* je multifunkční toxin, ochromující správné fungování imunitních buněk při infekci černým kašlem. Dokáže translokovat přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu buněk svou enzymatickou adenylátcyklázovou doménu, která potom v cytosolu po aktivaci eukaryotickým kalmodulinem nekontrolovatelně přeměňuje ATP na cAMP. Molekula cAMP zmate buněčnou signalizaci postižené buňky. Ohroženými buňkami jsou především ty, které na svém povrchu nesou specifický receptor CD11b/CD18, tedy makrofágy, dendritické buňky a neutrofilů. Toxin je dále schopen tvořit v membránách buněk malé póry selektivní pro kationty, a tím způsobovat až jejich osmotickou lyzi.

CyaA patří do rodiny RTX proteinů. Jedná se o rodinu proteinů gramnegativních bakterií, sekretovaných sekrečním aparátem typu 1. Patří do ní proteiny rozličných funkcí, které se většinou podílejí na virulenci bakterií. RTX proteiny spojuje výskyt RTX domény v C-koncové části proteinu, která je charakteristická mnoha nonapeptidovými repeticemi bohatými na glycin a aspartát. V rámci těchto repetit jsou vázány vápenaté ionty, které navodí sbalování domény do specifické, beta-šroubovicové struktury. RTX doména je velmi důležitá pro vazbu toxinu na buňky a jeho cytotoxickou aktivitu, i když mechanismus její funkce není znám.

Sekreční aparát typu I umožňuje transport proteinů ven z buňky přes vnitřní i vnější membránu v jednom kroku, bez periplazmatického meziprojektu. Transmembránový kanál je složen pouze ze tří proteinů – ATPázy a adaptéru ve vnitřní membráně a specifického proteinu ve vnější membráně.

Cílem mé práce bylo určit důležitost jednotlivých bloků RTX domény pro správnou funkci toxinu. Zaměřila jsem se proto na stanovení schopnosti toxinů s deletovanými částmi RTX domény vázat se na eukaryotické buňky, translokovat do cytosolu přes cytoplazmatickou membránu svou adenylátcyklázovou doménu a tvořit v membráně buněk póry. Dalším cílem bylo určit roli RTX domény v sekreci proteinů sekrečním aparátem typu I.

## 2 PŘEHLED LITERATURY

### 2.1 Adenylátcyklázový toxin

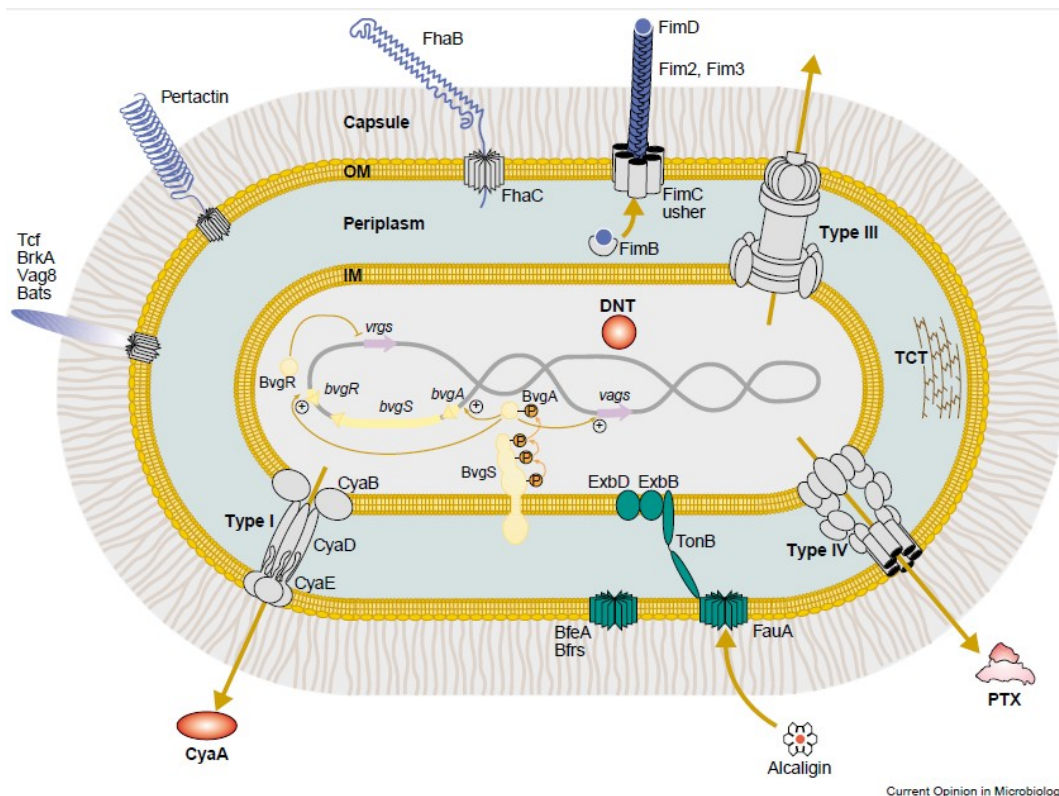
#### 2.1.1.1 Bakterie *Bordetella pertussis* a její virulence

*B. pertussis* je gramnegativní, striktně aerobní kokobacil. Tento obligátní lidský patogen osidluje řasinkový epitel dýchacích cest a způsobuje onemocnění zvané černý kašel (jinak též pertuse nebo dávivý kašel). Černý kašel je onemocnění dýchacích cest, charakteristické opakovanými záchvaty kašle. Je závažný převážně pro děti. Toto onemocnění bylo nejčastější příčinou úmrtí kojenců před zavedením vakcinace v 50. letech minulého století. Ovšem i v dnešní době se překvapivě stále častěji objevují jeho epidemie v rozvinutých zemích, a to v USA (Cherry 2012), Austrálii (Pillsbury *et al.* 2014), Norsku (Lavine *et al.* 2012), Velké Británii (Riolo *et al.* 2013) či Německu (Wiese-Posselt a Hellenbrand 2010). To je způsobeno mimo jiné přechodem z velice účinné celobuněčné vakcíny na vakcínu bezbuněčnou, která sice vyvolává méně nežádoucích účinků, ale i nedostatečnou imunitní ochranu (Redhead *et al.* 1993; Mahon *et al.* 1996). Nejnovější poznatky ukazují, že bezbuněčná vakcína chrání proti onemocnění, ale nebrání šíření patogena (Warfel *et al.* 2013).

*B. pertussis* produkuje celou řadu virulenčních faktorů (Obr. 1). Z adhezinů, které napomáhají adhezi bakterií k řasinkovému epitelu horních cest dýchacích, se jedná o filamentózní hemagglutinin (FHA), fimbrie, pertaktin a tracheální kolonizační faktor. Bakterie přichycené k hostitelským buňkám produkují různé toxiny, které napomáhají kolonizaci bakteriemi tím, že poškozují epiteliální a imunitní buňky. Mezi exotoxiny patří pertusový toxin, adenylátcyklázový toxin, dermonekrotický toxin a tracheální cytotoxin. Endotoxinem je lipopolysacharid (LPS) (Weiss a Hewlett 1986).

Při změnách růstových podmínek podléhá *B. pertussis* tzv. antigenní modulaci, tj. dochází k vratné přeměně mezi virulentním ( $Bvg^+$ ), přechodným ( $Bvg^i$ ) a avirulentním ( $Bvg^-$ ) fenotypem (Lacey 1960; Cotter a Miller 1994; Stockbauer *et al.* 2001). Virulentní fenotyp, doprovázený produkcí adhezinů a toxinů, je nezbytný při kolonizaci dýchacích cest bakteriemi. Avirulentní fenotyp se vyznačuje expresí proteinů vnější membrány s neznámou funkcí, používaných možná při přežívání bakterií vně hostitele, tak jako bylo ukázáno u *Bordetella bronchiseptica* (Cotter a Miller 1994). Přechodný fenotyp ( $Bvg^i$ ) je pravděpodobně výhodný pro přenos bakterií kapénkovou infekcí a prvním známým genem

typickým pro Bvg<sup>+</sup> je *bipA* (Stockbauer *et al.* 2001). V laboratorních podmínkách je možno navodit avirulentní Bvg<sup>-</sup> stav přidávkem síranů nebo kyseliny nikotinové do média nebo snížením teploty kultivace z 37 °C na 25 °C (Melton a Weiss 1993). Koordinovanou expresi virulenčních faktorů zajišťují 2 proteinové produkty *bvg* lokusu, tvořící klasický dvoukomponentový systém. BvgS je sensorová kináza, reagující na podněty v prostředí, BvgA je transkripční aktivátor, vázající se na promotor řady operonů virulenčních faktorů aktivovaných *bvg* (Arico *et al.* 1989; Coote 1991). Dalším proteinem je produkt *bvgR* genu, transkribovaného odděleně z opačného vlákna DNA (Merkel *et al.* 1998). BvgR je represor pěti genů reprimovaných *bvg* (Beattie *et al.* 1993). Exprese genů aktivovaných *bvg* probíhá ve dvou fázích: časně geny kódují adheziny, později potom toxiny. Tato posloupnost zabezpečena existencí vazebných míst s různou afinitou k BvgA na promotorech (Boucher a Stibitz 1995; Zu *et al.* 1996).



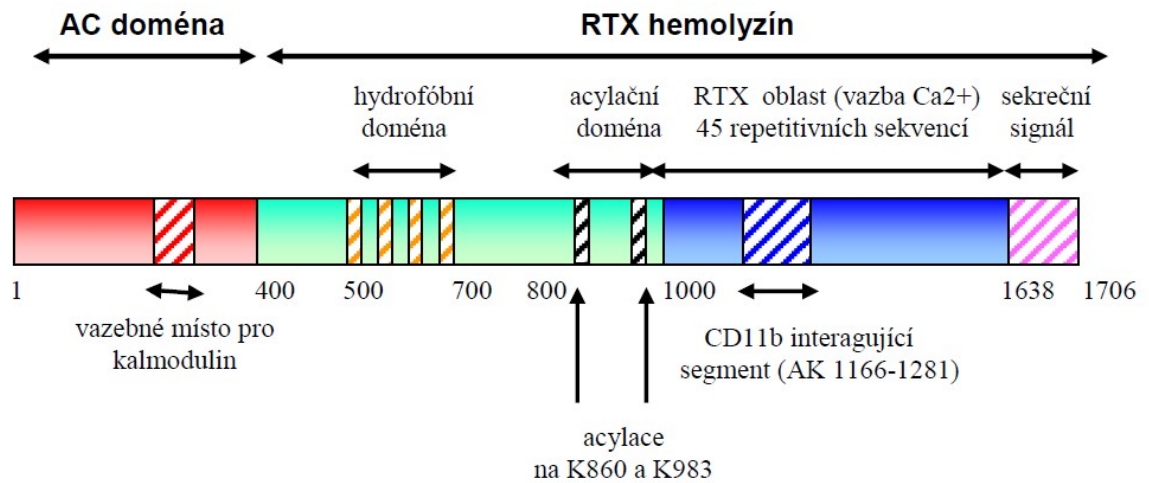
**Obr. 1 Bakterie *Bordetella pertussis* a její faktory virulence.** Znázorněné bakteriální struktury: kapsule, OM – vnější membrána, periplazma, IM – vnitřní membrána. Faktory virulence jsou barevně odlišeny. **Adheziny** jsou označeny modře: Fha B – prekurzor filamentózního hemaglutininu. FimD, Fim 2 a Fim 3 – složky fimbríí. Tcf – tracheální kolonizační faktor. Pertaktin. **Exotoxiny** jsou označeny červeně. CyaA – adenylátcyklázový toxin. PTX – pertusový toxin. TCT – tracheální cytotoxin. DNT – dermonekrotický toxin. **Transportní proteiny** jsou označeny šedě (Type I, III, IV – sekreční aparát typu I, III, IV). **Proteiny adsorbující železo** jsou modrozelené (TonB/ExbBD systém). Uvnitř buňky je schéma **BvgA/S regulačního systému**. BvgS je sensorová kináza. BvgA je transkripční aktivátor. BvgR je represor *bvg* genů. Převzato z Loch *et al.* (2001).

## 2.1.2 Struktura adenylátcyklázového toxinu

Adenylátcyklázový toxin, klíčový virulenční faktor *B. pertussis*, je tvořen 1706 aminokyselinami (Obr. 2). Jeho molekulová hmotnost je 177,5 kDa. Má více aktivit – jeho N-koncových 400 aminokyselin tvoří adenylátcyklázovou (dále jen AC) doménu s adenylátcyklázovou aktivitou. Tato doména je translokována přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu cílových buněk, kde je odštěpena a váže molekulu eukaryotického kalmodulinu, který enzym aktivuje (Ladant 1988; Guo *et al.* 2005). Toxin dále patří mezi klasické cytolyziny, způsobující póry v membráně. Tato aktivita je obsažena v části zvané RTX hemolyzin, zahrnující 1306 C-koncových aminokyselin. RTX hemolyzin je mimo tvorby pórů důležitý i pro translokaci AC domény přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu (Rogel a Hanski 1992) a je členěn na několik dalších domén:

- i. hydrofobní doménu, tvořící kation-selektivní póry v membráně (aminokyseliny 500–700) (Benz *et al.* 1994);
- ii. aktivační doménu, která obsahuje lysiny K983 a K860, posttranslačně acylované na  $\epsilon$ -amino skupině, nezbytné pro správnou funkci toxinu (Masin *et al.* 2005). Modifikaci provádí produkt genu *cyaC* (Barry *et al.* 1991; Hackett *et al.* 1994). Tyto lysiny se pravděpodobně podílejí na počátečním inzerci toxinu do membrány (Benz *et al.* 1994). Navíc jediný modifikovaný lysin u toxinu produkovaného v *B. pertussis*, lysin 983, (Hackett *et al.* 1994), ovlivňuje selektivitu vytvořeného oligomerního póru (Masin *et al.* 2005). Rekombinantní protein z *Escherichia coli* je navíc acylován palmitátem na lysinu K860 (Hackett *et al.* 1995);
- iii. RTX doménu mezi aminokyselinami 1007 a 1706, s okolo 45 nízkoafinitními ( $K_D=0,5-0,8$  mM) vazebnými místy pro vápenaté ionty. Vazba těchto iontů vyvolá velké konformační změny v molekule (Hewlett *et al.* 1991; Rose *et al.* 1995). RTX doména je charakterizována výskytem nonapeptidových repetitiv o přibližné sekvenci G-G-X-G-X-D-X-U-X (kde X je jakákoli aminokyselina a U je hydrofobní aminokyselina), typických pro rodinu RTX proteinů. Charakteristika této rodiny je spolu s obecnou strukturou RTX domén popsána v Kap. 2. 2. Mezi aminokyselinami 1166–1287 se nachází oblast zodpovědná za vazbu toxinu na receptor (El-Azami-El-Idrissi *et al.* 2003). Sbalovací centrum molekuly je tvořeno aminokyselinami 1636–1642 a sbalování probíhá ve směru od C- k N-konci molekuly (Bumba, nepublikovaná data);

- iv. sekreční signál, který se nachází na úplném C-konci proteinu (Sebo a Ladant 1993).



**Obr. 2 Schéma molekuly adenylátcyklázového toxinu.** N-koncových 400 aminokyselin tvoří enzymaticky aktivní adenylátcyklázovou (AC) doménu s kalmodulin-vazebným místem. C-koncových 1306 aminokyselin tvoří RTX hemolyzínovou doménu. Ta sestává z hydrofóbní domény, oblasti posttranslační modifikace zbytkem mastné kyseliny na zbytcích lysinu 860 a 983, repetitivní domény tvořené přibližně 45 nonapeptidovými sekvencemi vázajícími vápenaté ionty, sekvencí vázající receptor CD11b/CD18 mezi zbytky 1166 a 1281 a C-koncového sekrečního signálu. Převzato z Kamanové (2005).

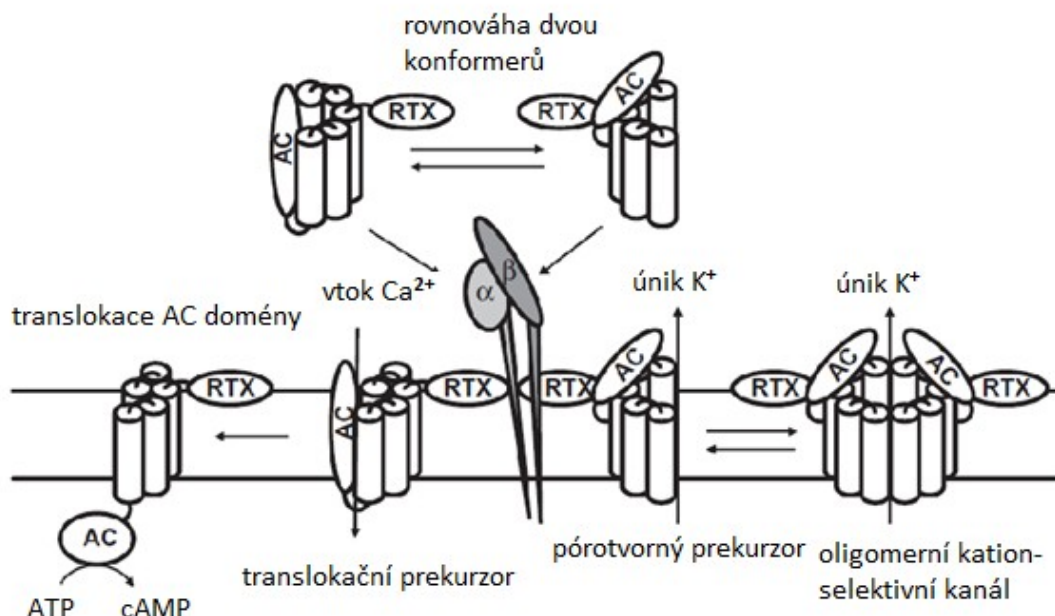
### 2.1.3 Model interakce CyaA s cílovými buňkami

Receptorem adenylátcyklázového toxinu na buněčném povrchu je integrin CD11b/CD18, nazývaný též  $\alpha_M\beta_2$  integrin, komplementový receptor 3 (CR3) nebo Mac-1 (Guermonprez *et al.* 2001). Tento receptor obsahují neutrofilové, monocytové, makrofágy, NK buňky a dendritické buňky. První kontakt toxinu s receptorem probíhá přes oligosacharidové zbytky, kterými je receptor modifikován, následně se toxin váže přímo na peptidové řetězce CD11b/CD18 (Morova *et al.* 2008). CyaA pravděpodobně tvoří v roztoku dva konformační stavy. První translokuje AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do buněk, druhý v nich vytváří oligomerní kation-selektivní póry (Osickova *et al.* 1999) (Obr. 3).

První konformer funguje jako monomer a váže se na receptor CD11b/CD18, či v případě buněk bez receptoru na membránu. CyaA nepotřebuje ke vstupu do buňky endocytickou cestu (Gordon *et al.* 1988). Po vazbě dochází k jeho okamžitému vložení do cytoplazmatické membrány a k vytvoření formy připravené translokovat enzymatickou AC doménu do cytosolu cílové buňky. Tato forma je spojená se vstupem vápenatých iontů do buňky (Fiser *et al.* 2007). Vápenaté ionty aktivují proteázu kalpain, která štěpí protein talin. Talin

uchycoval CD11b/CD18 k buněčnému cytoskeletu. Receptor s navázaným toxinem může být po štěpení talinu přesunut do membránových raftů, kde je dokončena translokace AC domény do cytosolu. Tomuto ději napomáhá prostředí raftů bohaté na cholesterol (Bumba *et al.* 2010), mechanismus translokace je však zatím neznámý. Enzym v buňce po aktivaci vazbou eukaryotického kalmodulinu (Ladant 1988) nekontrolovatelně přeměňuje cytosolické ATP na cAMP a rychle dochází k depleci ATP (Fiser *et al.* 2007), vedoucí k lyzi monocytů (Basler *et al.* 2006). Přemíra cAMP zmate buněčné signalizační dráhy makrofágů (Hickey *et al.* 2008). Tyto buňky pak mohou ztratit své fagocytické schopnosti (Kamanova *et al.* 2008). CyaA může způsobovat apoptózu makrofágů (Khelef *et al.* 1993) a mnoho dalších procesů, které společně napomáhají úniku bakterie před imunitním systémem hostitele.

Druhý konformer CyaA existuje pravděpodobně již v roztoku ve formě oligomerů (Lee *et al.* 2005), případně oligomerizuje až po vazbě na receptor a tvoří v buněčné membráně oligomerní kation-selektivní póry (Vojtova-Vodolanova *et al.* 2009) o průměru menším než 0,8 nm (Benz *et al.* 1994), které způsobují únik draselných iontů z makrofágů (Pospíšilová 2010) i z erytrocytů (Gray *et al.* 1998), čímž vedou až k jejich koloidně-osmotické lyzi (Weiss *et al.* 1984). Póry, tvořené CyaA, jsou mnohem menší než póry, tvořené HlyA *E. coli* (Benz *et al.* 1994). Translokace AC domény přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu a pórtvorná aktivita toxinu jsou dvě nezávislé aktivity, protože je lze od sebe oddělit tvorbou různých mutantů v toxinu (Sakamoto *et al.* 1992; Osickova *et al.* 1999; Osickova *et al.* 2010). Vápenaté ionty mají klíčovou úlohu v aktivitě adenylátcyklázového toxinu. Jejich vyvázáním z prostředí či nízkou teplotou je také možné selektivně zablokovat translokaci AC domény (Hanski a Farfel 1985).



**Obr. 3 Model interakce CyaA s cílovými buňkami.** Model představuje dva konformery CyaA, které jsou v roztoku v rovnováze. Po vazbě na receptor CD11b/CD18 je každý z precursorů inzerován do membrány. Translokační precursor zůstane v monomerní formě a po indukcii vstupu vápenatých iontů do cytoplazmy translokují přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu adenylátcyklázovou (AC) doménu. Pórotvorný precursor oligomerizuje a vytvoří pór, kterým unikají z buňky draslíkové ionty. Transmembránové segmenty jsou v obou případech shodné, pouze zaujímají jinou konformaci. RTX – RTX doména CyaA.  $\alpha$ ,  $\beta$  – podjednotky receptoru CD11b/CD18. Převzato a upraveno z Osičkové *et al.* (2010).

Studium interakce CyaA s buňkami je velmi přínosné. Enzymaticky inaktivovaný toxin je totiž schopen dopravovat cizorodé antigeny do antigen-prezentujících buněk. Tyto buňky je potom vystaví na svém povrchu buď na molekulách MHC I. třídy, čímž indukují CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď proti tomuto antigenu (Guermonprez *et al.* 1999), nebo na MHC molekulách II. třídy, čímž indukují CD4<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď (Loucka *et al.* 2002). Toho se již využívá při vývoji vakcíny proti nádoru děložního čípku (Mackova *et al.* 2006) nebo proti malárii (Tartz *et al.* 2006).

## 2.2 RTX proteiny

### 2.2.1 Obecná charakteristika RTX proteinů

RTX proteiny jsou rodinou proteinů sekretovaných gramnegativními patogenními bakteriemi. Jejich název pochází z anglického Repeats-in-Toxin, což má historický původ v opakovaných sekvencích bohatých na glycin, které byly pozorovány v C-koncové části molekul cytolytických toxinů produkovaných např. *E. coli*, *Mannheimia haemolytica* či

*B. pertussis*. Jejich molekulová hmotnost se nejčastěji pohybuje okolo 100-200 kDa, ale existují také skupiny mnohem větších RTX proteinů. MARTX (Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin) toxiny mají velikost až 5206 AK v případě toxinu MARTX<sub>Vv</sub> z *Vibrio vulnificus* (Satchell 2007) a největší charakterizovaný RTX protein ze skupiny velkých repetitivních adhezinů, LapA z *Pseudomonas putida*, má 8682 AK (Hinsa *et al.* 2003; Satchell 2011). Předpokládá se, že všechny RTX proteiny nějak přispívají virulenci bakterií; jsou to metaloproteázy, lipázy, adheziny, bakteriociny, proteiny spojené s tvorbou hlízek, proteiny S-vrstvy, proteiny asociované s tvorbou biofilmu a funkce dalších není zatím známa (Linhartova *et al.* 2010; Satchell 2011). Specifičtější aktivitu mají pak RTX toxiny, které lze rozdělit na tři skupiny podle toho, zda vykazují:

- i. obecnější cytolytickou aktivitu vůči více typům eukaryotických buněk včetně erytrocytů. Jejich hemolytická aktivita *in vitro* je detekována kultivací bakterie na krevním agaru. *In vivo* má tato skupina cytotoxickou aktivitu a způsobuje lyzi leukocytů (Bhakdi *et al.* 1989). Typickým zástupcem je hemolyzin HlyA uropatogenní *E. coli*, modelový organismus pro výzkum RTX toxinů;
- ii. omezenou specifickou aktivitu k určitým buňkám (jedná se např. o leukotoxin LtxA z *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*;
- iii. více různých aktivit (Linhartova *et al.* 2010). Zástupcem je bifunkční adenylátcyklázový toxin *B. pertussis* či MARTX cytotoxiny s rozlišnými aktivitami (Satchell 2007). Například MARTX<sub>Vc</sub> z *Vibrio cholerae* nelyzuje buňky, ale způsobuje zakulacování epitelálních buněk změnami jejich aktinového cytoskeletu (Fullner a Mekalanos 2000). Navíc se tento toxin inzertuje do buněčných membrán a stejně jako CyaA přes ně translokuje do buněk svou enzymatickou doménu (Fullner a Mekalanos 2000).

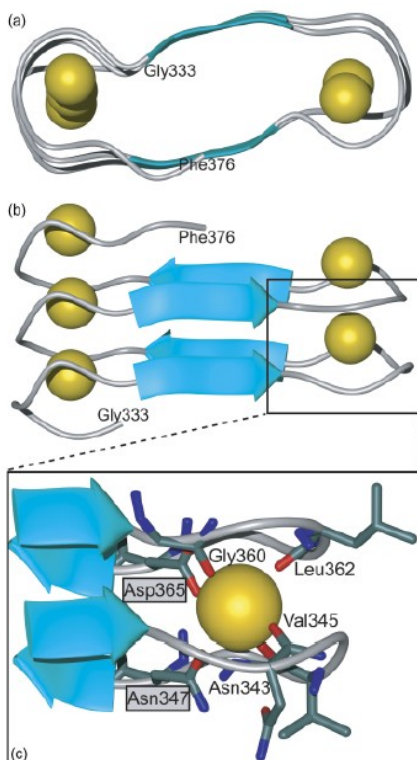
Klasické RTX proteiny charakterizují následující znaky:

- i. v C-koncové oblasti proteinů se vyskytuje různý počet nonapeptidových repetitivních sekvencí s vysokým výskytem aminokyselin glycinu a aspartátu a typickou sekvencí G-G-X-G-X-D-X-[L/I/V/W/Y/F]-X (X je jakýkoli aminokyselinový zbytek) (Satchell 2007). Přesná skladba sekvence se však u různých autorů poněkud liší a při charakterizaci RTX proteinů záleží na tom, jakou odchylku od dané sekvence autoři ještě tolerují. Analýzu velkého počtu bakteriálních genomů s vyhledáváním

- RTX repetice provedli např. Linhartova *et al.* (2010) a Delepelaire (2004). Objevili přes 1000 RTX proteinů z více než 200 bakteriálních druhů. Zjistili, že repetice může být u RTX proteinů jen několik, ale i více než padesát;
- ii. repetice popsané v bodě i. váží vápenaté ionty, což je klíčové pro správné sbalení proteinu do unikátní  $\beta$ -šroubovicové struktury (Baumann *et al.* 1993) (podrobnější pojednání viz Kap. 2. 2. 2.);
  - iii. RTX proteiny jsou charakteristické vysokou kyselostí (*pI* okolo 4) (Linhartova *et al.* 2010) a velmi nízkým až žádným výskytem cysteinových zbytků (Delepelaire 2004);
  - iv. všechny jsou gramnegativními bakteriemi sekretovány ven z buňky sekrečním aparátem typu I (T1SS). Ten rozpoznává C-koncový sekreční signál (Gray *et al.* 1986), který není během transportu odštěpován (Felmlee *et al.* 1985a). T1SS je obecně tvořen proteinem RtxB – membránovou ATPázou z rodiny ABC přenašečů (z angl. ATP-Binding Cassette) ve vnitřní membráně, a dále adaptérem RtxD z rodiny MFP proteinů (z angl. Membrane Fusion Protein), který spojuje RtxB s proteinem OMP (z angl. Outer Membrane Protein), který tvoří kanál ve vnější membráně (dále v Kap. 2. 3. 1) (Letoffe *et al.* 1996). Při transportu velikých MARTX proteinů se uplatňují dokonce čtyři proteiny. Geny *rtxB* a *rtxE* pak kódují dvě ATPázy ve vnitřní membráně (Boardman a Satchell 2004);
  - v. strukturální geny RTX toxinů kódují inaktivní „protoxiny“, k jejichž aktivaci je nutný produkt dalšího genu, *rtxC*. RtxC proteiny aktivují protoxiny posttranslační modifikací, a to připojením mastné kyseliny na  $\epsilon$ -aminoskupinu konkrétních lysinů. Donorem zbytku mastné kyseliny je acyl-ACP (acyl carrier protein) (Trent *et al.* 1998);
  - vi. strukturální gen *rtxA* se nachází ve společném operonu *rtxCABD* s aktivačním genem *rtxC* a geny kódujícími sekreční aparát *rtxB* a *rtxD*. Gen pro OMP se nachází někdy ve vlastním operonu, někdy mimo něj (Coote 1992). Typickým příkladem genového uspořádání je leukotoxinový *lktCABD* operon *Mannheimia haemolytica* (Strathdee a Lo 1989). Genové uspořádání *hlyCABD* operonu *E. coli* a *cyaCABDE* operonu *B. pertussis* je popsáno v Kap. 2. 3. 2.;
  - vii.  $\beta_2$  integriny (CD18) tvoří nejčastěji receptory RTX toxinů specifické pro určité buňky. Například HlyA *E. coli* interaguje s  $\beta_2$  integrinem CD11a/CD18 (Lally *et al.* 1997), CyaA *B. pertussis* s  $\beta_2$  integrinem CD11b/CD18 (Guermontprez *et al.* 2001).

## 2.2.2 Struktura RTX proteinů

Vazba vápenatých iontů v oblasti repetice RTX domény vede ke konformačním změnám, které jsou nezbytné pro správnou funkci RTX toxinů (Rose *et al.* 1995). RTX doména se po jejich navázání sbalí do  $\beta$ -šroubovice. Jde o unikátní strukturu, kterou jako první popsali Baumann *et al.* (1993), když rentgenovou krystalografií určili strukturu zinkové alkalické proteázy (AP) *Pseudomonas aeruginosa* (Obr. 4). C-koncová doména AP tvoří dvovrstvý  $\beta$ -sendvič, jehož každá vrstva je tvořena paralelními  $\beta$ -vláknky. V centrální části, kde je struktura nejpravidelnější a konsenzuální sekvence nej přesnější, tato  $\beta$ -vlákna mírně rotují do pravotočivé  $\beta$ -šroubovice. Celou strukturu jakoby „uzamykají“ vápenaté ionty, vázané smyčkami propojujícími  $\beta$ -vlákna. Tyto smyčky jsou tvořeny prvními šesti aminokyselinami konsenzuální nonapeptidové sekvence, G-G-X-G-X-D, a váží vždy z poloviny iont nacházející se nad smyčkou, z poloviny iont pod smyčkou. Jinými slovy, jeden vápenatý iont je koordinován šesti aminokyselinami pocházejícími z páru smyček, konkrétně karboxylovými skupinami aspartátů a karboxylovými skupinami glycinů. V některých případech dochází k částečné koordinaci také molekulou vody, ale vápenaté ionty, které jsou koordinovány pouze aminokyselinami, jsou navázány pevněji (není totiž možné je experimentálně zaměnit za  $\text{Sr}^{2+}$  ionty). Zbylé tři zbytky z nonapeptidové sekvence X-L/F/I-X tvoří krátká  $\beta$ -vlákna.



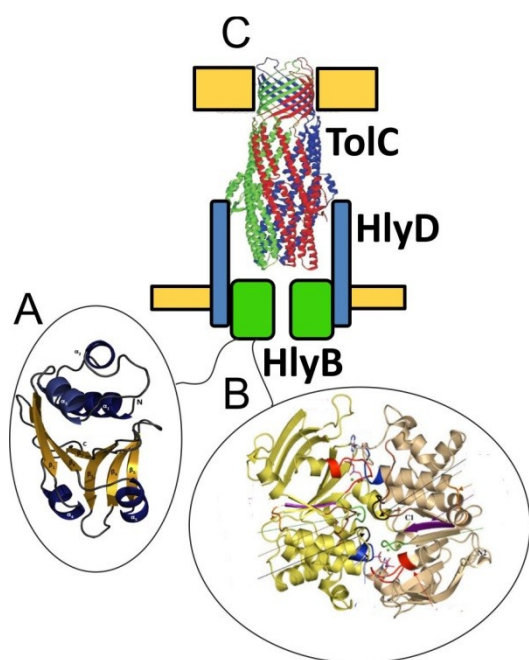
**Obr. 4** Struktura alkalické proteázy *Pseudomonas aeruginosa*. Nahoře: pohled svrchu na dvovrstvý  $\beta$ -sendvič. Ve středu: pohled z boku, znázorňující paralelní  $\beta$ -vlákna (modře) a páry smyček (šedě) koordinujících vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  (žlutě). Červeně jsou dole v detailu vyznačeny karboxylové a karboxylové skupiny příslušných aminokyselin, koordinující vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, modře pak dusíkové atomy. Model byl převzat z Linhartové *et al.* (2010) a vytvořen na základě dat Baumann *et al.* (1993).

Struktury několika dalších RTX proteinů, které byly vyřešeny, odpovídají výše popsané struktuře. Jedná se o strukturu metaloproteázy *Serratia marcescens* (Baumann 1994), alkalické metaloproteázy z bakterie *Pseudomonas aeruginosa* IFO3080 bez zinkového ligandu (Miyatake *et al.* 1995), metaloproteázy *Serratia sp.* E-15 (Hamada *et al.* 1996), lipázy *Pseudomonas sp.* MIS38 (Angkawidjaja *et al.* 2007) a lipázy LipA *Serratia marcescens* (Meier *et al.* 2007).

## 2.3 Sekreční aparát typu I (T1SS)

### 2.3.1 Struktura sekrečního aparátu typu I

T1SS katalyzuje jednokrokový transport proteinu přes obě membrány a periplazmu gramnegativních bakterií kanálem tvořeným třemi proteiny: ABC přenašečem RtxB, MFP proteinem RtxD a OMP proteinem vnější membrány. Nejvíce prostudovaným sekrečním aparátem typu I je systém *E. coli* pro transport hemolyzinu HlyA. OMP proteinem vnější membrány je zde TolC (Wandersman a Delepelaire 1990), ABC přenašečem protein HlyB a MFP proteinem je HlyD (Obr. 5.) (Mackman *et al.* 1985b; Holland *et al.* 2005).



**Obr. 5: Schéma sekrečního aparátu typu I (T1SS).** Vnitřní (dole) a vnější (nahore) membrána jsou zobrazeny žlutě, ABC přenašeč HlyB zeleně, MFP protein HlyD modře, nahore je TolC ve vnější membráně. Znázorněny jsou také příslušné známé struktury. **A** - CLD doména HlyB (Lecher *et al.* 2012). **B** - Dimer ATP-vazebných domén HlyB s navázaným ATP (fialově) (Zaitseva *et al.* 2005a) **C** – protein TolC (Koronakis *et al.* 2000).

#### 2.3.1.1 HlyB – ABC přenašeč

Protein cytoplazmatické membrány HlyB patří do rodiny ABC přenašečů, dodává tedy energii pro transport hydrolyzou ATP. HlyB váže kromě ATP i substrát HlyA a zahajuje sekreci (Gentschev a Goebel 1992; Zhang *et al.* 1998). Má minimálně šest predikovaných transmembránových  $\alpha$ -šroubovic (Gentschev a Goebel 1992). Je známa struktura jeho

C-koncové, ATP-vazebné domény, vyčnívající do cytoplazmy. Tuto strukturu analyzovaly dvě skupiny pomocí rentgenové krystalografie. Jednalo se o strukturu ATP-vazebné domény s navázaným ATP (Zaitseva *et al.* 2005a)(Obr. 5B) nebo bez ATP (Schmitt *et al.* 2003). Ze struktur vyplývá, že HlyB funguje jako homodimer ze dvou polypeptidů, které společně vytvářejí vazebná místa pro dvě molekuly ATP (Oswald *et al.* 2006). Vazba substrátu navodí konformační změny, umožňující vazbu ATP (Schmitt *et al.* 2003). Vazba ATP vyvolá dimerizaci, po které může dojít k hydrolyze ATP (Hanekop *et al.* 2006). ATP-vazebná doména váže také C-terminální sekreční signál molekuly substrátu, a je zodpovědná za jeho rozeznání (Benabdelhak *et al.* 2003).

HlyB navíc obsahuje N-terminální CLD doménu (z angl. C39-like domain), mířící do cytosolu. Struktura izolované CLD domény HlyB byla určena pomocí nukleární magnetické rezonance (Lecher *et al.* 2012) (Obr. 5A). Jedná se o inaktivní variantu C39 peptidázy. C39 peptidázou některé netradiční ABC přenašeče T1SS odštěpují N-koncový signální peptid při sekreci bakteriocinů (Havarstein *et al.* 1995). Ačkoli ztratila proteolytickou funkci, byla CLD doména v průběhu evoluce zachována. Tento fakt může vysvětlovat její navrhovaná funkce molekulárního chaperonu. Vzhledem k její interakci s RTX repetitivy molekuly substrátu by ochraňovala substrát a udržovala jej v cytoplazmě až do sekrece v nesbaleném stavu (Lecher *et al.* 2012).

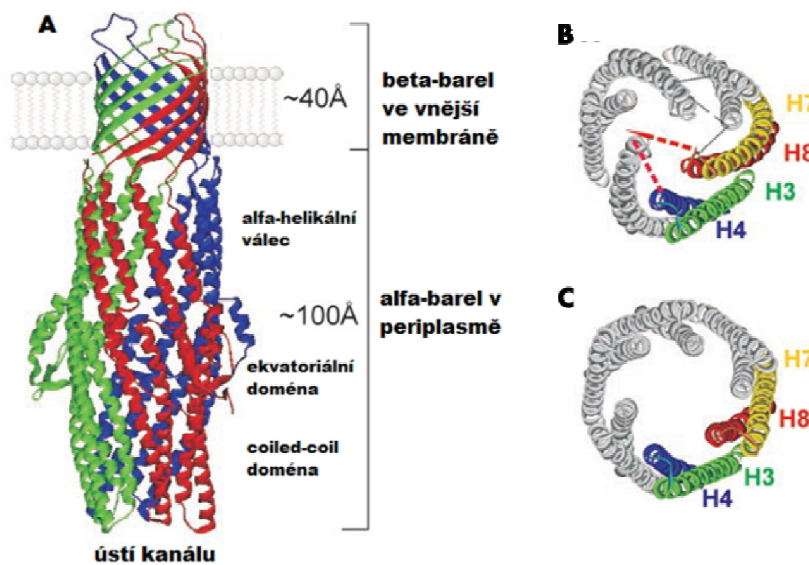
### **2.3.1.2 HlyD – adaptér**

Úlohou adaptéru HlyD je hlavně propojit ostatní dva proteiny - HlyB a TolC – při tvorbě transportního kanálu, ovšem bylo ukázáno, že samotný HlyD také tvoří kanál T1SS (Pimenta *et al.* 2005). Označení „adaptér“ by tak mělo být přehodnoceno. Struktura proteinu HlyD zatím nebyla určena, informace o ní byly získány ze sekvenčních a topologických analýz (Schulein *et al.* 1992). Tvoří rozsáhlou periplazmatickou doménu, podílející se na interakci s TolC (Sharff *et al.* 2001; Lee *et al.* 2012). Krátká N-koncová část proteinu, exponovaná v cytoplazmě, má důležitou roli v rozeznávání substrátu, přenesení signálu a v následném sestavení translokačního komplexu (Balakrishnan *et al.* 2001). Liší se názory o uspořádání HlyD, zda je to homotrimer (Thanabalu *et al.* 1998) či homoheptamer (Lee *et al.* 2012).

### **2.3.1.3 TolC – protein vnější membrány**

TolC je OMP proteinem ve vnější membráně T1SS *E. coli* pro sekreci HlyA. Struktura proteinu TolC (Obr. 6A), určená v roce 2000 pomocí rentgenové krystalografie, je velmi neobvyklá: tři protáhlé TolC monomery vytvářejí 140 Å dlouhý a 30 Å široký kanál

(Koronakis *et al.* 2000) s vnitřním průměrem 19,8 Å (Koronakis *et al.* 2004). Ve vnější membráně je TolC ukotven  $\beta$ -barelem, odpovídajícím struktuře porinů. Je tvořen pravotočivě uspořádanými  $\beta$ -skládanými listy. Oproti jiným porinům je unikátní v tom, že se na jeho tvorbě podílejí tři monomery, a že je široce otevřen do vnějšího prostoru. TolC pokračuje dále do periplazmy rozsáhlým, 100 Å dlouhým  $\alpha$ -barelem, tvořeným z  $\alpha$ -šroubovic. V místě přechodu z vnější membrány do cytoplazmy tvoří  $\alpha$ -šroubovice specifickou, novou strukturu levotočivě uspořádaného  $\alpha$ -šroubovicového válce, připomínajícího  $\beta$ -barel. Ekvatoriální doména má důležitou úlohu při kontaktu s proteinem HlyD a při otevírání periplazmatického ústí kanálu dále popsaným mechanismem (Sharff *et al.* 2001). V nejbližší periplazmatické části se  $\alpha$ -šroubovice párují způsobem, označeným jako „coiled-coil“. Páry šroubovic se zde levotočivě ovíjejí okolo sebe. Na základě struktury byl vytvořen model otevírání periplazmatického ústí kanálu (Obr. 6B a C), které připomíná otevírání clony fotoaparátu. V rámci každého monomeru existuje jeden pár vnitřních „coiled-coil“ šroubovic (H7, H8), bránících vstup do kanálu, a jeden vnější pár (H3, H4). Vnitřní pár se při otevření ústí kanálu napřímí a zařadí se vedle vnějšího páru (Koronakis *et al.* 2000).



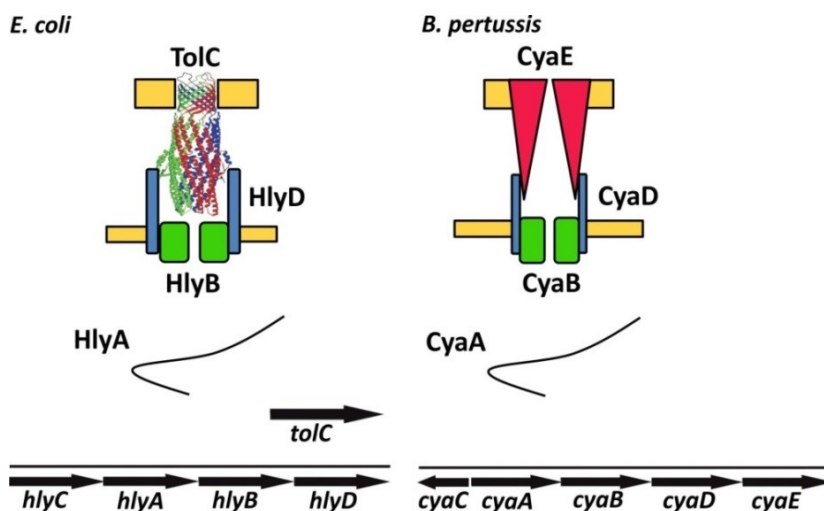
**Obr. 6 Struktura proteinu TolC ve vnější membráně.** A – Struktura proteinu TolC, vytvořená pomocí rentgenové krystalografie. Monomery jsou znázorněny různými barvami. Dolní část je v periplasmě. Osa molekuly je normálou k ploše vnější membrány. Beta-barel ve vnější membráně (nahore) je otevřen do mimobuněčného prostoru, periplazmatické ústí alfa-barelu (dole) je uzavřeno. B, C - pohled z periplazmy na ústí alfa-barelu. Jeden monomer je vybarven. Vnější pár „coiled-coil“ šroubovic je označen H7 a H8, vnitřní pár H3 a H4. B – „coiled-coil“ šroubovice H3 a H4 uzavírají periplazmatický vchod do kanálu. Struktura byla vytvořena pomocí rentgenové krystalografie. C - model zobrazující ústí kanálu, otevřené mechanismem připomínajícím otevírání clony fotoaparátu. Převzato a upraveno z Koronakis *et al.* (2004).

### 2.3.2 Srovnání struktur T1SS pro sekreci HlyA u *E. coli* a CyaA u *B. pertussis*

Proteiny T1SS *B. pertussis* pro sekreci adenylátcyklázového toxinu, CyaB resp. CyaD, jsou homologní k proteinům T1SS *E. coli* HlyB resp. HlyD (Obr. 7). CyaE *B. pertussis* je homologní k proteinu TolC *E. coli*. Nicméně, při srovnávání proteinových sekvencí z TolC proteinové rodiny vykazoval CyaE nejnižší homologii s ostatními proteiny (Gross 1995). CyaA může být sekretován systémem *E. coli* pro sekreci HlyA (Masure *et al.* 1990).

U *E. coli* je strukturní gen pro transportovaný protein, hemolyzin HlyA, kódován v operonu *hlyCABD* (Obr. 7) společně s geny *hlyB* a *hlyD*, kódujícími proteiny T1SS, a s genem pro protein HlyC (Felmlee *et al.* 1985b; Mackman *et al.* 1985a). HlyC aktivuje HlyA acylací dvou lysinů (Nicaud *et al.* 1985; Stanley *et al.* 1994). Gen pro protein vnější membrány, TolC, je kódován mimo *hly* operon (Wandersman a Delepelaire 1990).

U *B. pertussis* se gen pro produkci adenylátcyklázového toxinu CyaA nachází v *cyaCABDE* operonu (Glaser *et al.* 1988), regulovaném *bvg* systémem (Kap. 2. 1. 1.). Vnější protein CyaE je tedy na rozdíl od TolC u *E. coli* kódován ve společném operonu s genem pro CyaA. Gen *cyaC* je přepisován v opačném směru než *cyaA* z vlastního promotoru. Produkt genu *cyaC* zprostředkovává posttranslační modifikaci CyaA (Barry *et al.* 1991).

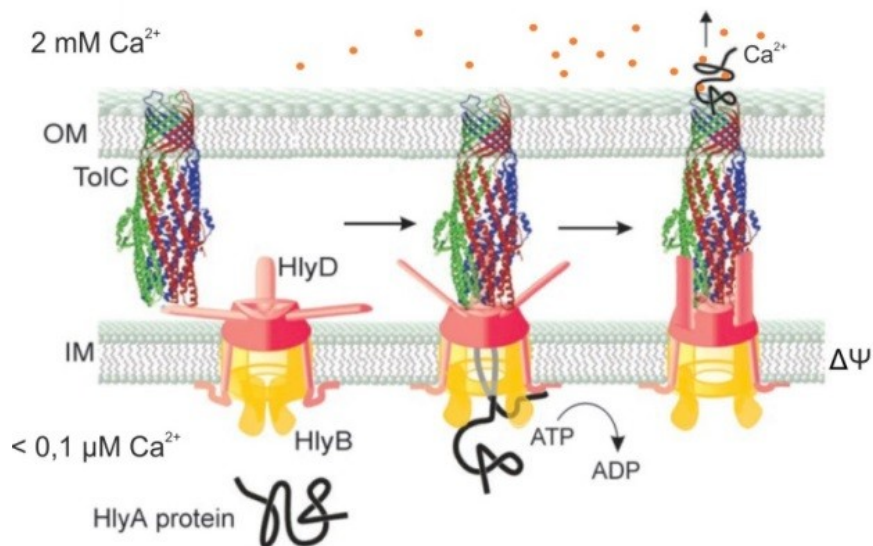


**Obr. 7** Srovnání struktur T1SS pro sekreci HlyA u *E. coli* (vlevo) a CyaA u *B. pertussis* (vpravo). Nahoře je ilustrace podobnosti tří proteinů T1SS. Vnitřní (dole) a vnější (nahore) membrány jsou zobrazeny žlutě. Struktura TolC je převzata z Koronakis *et al.* (2004). Zeleně jsou zobrazeny ABC přenašeče, modře MFP proteiny, červeně protein vnější membrány CyaE. Dole je zobrazeno uspořádání genů. V *E. coli* se nachází operon *hlyCABD* a protein TolC je kódován v jiném operonu. V *B. pertussis* se nachází operon *cyaCABDE*.

### 2.3.3 Mechanismus sekrece sekrečním aparátem typu I

Dva monomery HlyB v otevřené konformaci (Oswald *et al.* 2006) společně s trimerním (Thanabalu *et al.* 1998) či hexamerním (Lee *et al.* 2012) HlyD tvoří stabilní komplex ve vnitřní membráně bakterie (Obr. 8). Po interakci substrátu s oběma proteiny HlyB i HlyD dochází ke konformačním změnám všech tří proteinů, vedoucích k přechodnému navázání proteinu vnější membrány TolC a tím k vytvoření kompletního translokačního kanálu (Thanabalu *et al.* 1998). Na molekule substrátu rozpoznávají HlyB a HlyD jeho C-koncový sekreční signál (Kenny *et al.* 1992), a to pravděpodobně na základě jeho sekundární struktury (Hui *et al.* 2000). U sekrečních signálů substrátů T1SS totiž nebyl nalezen konzervovaný motiv v primární sekvenci (Holland *et al.* 2005). Sekreční signál není v průběhu sekrece ani po ní odštěpován (Felmlee *et al.* 1985a).

Vazba substrátu umožní navázání ATP a to ATP-vazebnou doménou HlyB (Schmitt *et al.* 2003). Dojde k dimerizaci HlyB (Zaitseva *et al.* 2005b), která umožní hydrolýzu ATP (Hanekop *et al.* 2006). Hydrolýza ATP je nezbytná pro transport (Koronakis *et al.* 1995). Sekrece je kromě hydrolýzy ATP poháněna také protonovým gradientem  $\Delta\Psi$ , který je potřebný pouze v časně fázi sekrece, na úrovni vazby substrátu či průchodu cytoplazmatickou membránou (Koronakis *et al.* 1991). Hydrolýza ATP indukuje konformační změny HlyB (Hollenstein *et al.* 2007), přenášející se dále na HlyD a TolC (Thanabalu *et al.* 1998). Je otevřeno periplazmatické ústí alfa-barelu TolC (Sharff *et al.* 2001). Proběhne rychlá translokace proteinu kanálem (Hollenstein *et al.* 2007) a rozdělení dimeru HlyB (Oswald *et al.* 2006). Transportovaný protein je přenášen v nesbaleném stavu (Kenny *et al.* 1991), případně může částečně zaujímat sekundární strukturu, až do limitů kanálu (vnitřní průměrem 19,8 Å by mohla projít  $\alpha$ -šroubovice) (Delepelaire 2004). Jisté však je, že C-koncová RTX doména je v cytoplazmě nesbalena, protože tamní koncentrace vápenatých iontů je velmi nízká ( $<0,1 \mu\text{M}$ ) (Gangola a Rosen 1987). K vazbě vápenatých iontů v oblasti RTX domény a k vytvoření kompaktní terciální struktury dochází až po sekreci toxinu ven z buňky, kde je fyziologická koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  okolo 2 mM (Chenal *et al.* 2009).



**Obr. 8 Mechanismus sekrece sekrečním aparátem typu I.** HlyB je zobrazen žlutě, HlyD růžově, TolC vyřešenou strukturou (Koronakis *et al.* 2000), substrát HlyA černě. Kontakt TolC s komplexem HlyB a HlyD ve vnitřní membráně je přechodný a je indukován vazbou substrátu. Translokaci, probíhající přes vnitřní membránu (IM), periplazmu a vnější membránu (OM) pohání hydrolýza ATP, protonový gradient na vnitřní membráně a sbalování proteinu vně buňky účinkem vápenatých iontů v 2 mM koncentraci. V cytosolu je koncentrace vápenatých iontů  $< 100 \mu\text{M}$ , což udržuje substrát před sekrecí v nesbaleném stavu. Převzato a upraveno z Koronakis *et al.* (2004).

## 3 MATERIÁL A METODY

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Plazmidy

Plazmid pCACT3 (8887 párů bazí); nese gen *cyaA*, kódující CyaA, a gen *cyaC*, kódující protein CyaC nutný pro posttranslační aktivaci CyaA; každý pod kontrolou *LacZ* promotoru, inducibilního IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside). Plazmid nese rezistenci k ampicilinu, kódovanou genem *blaM*. Obsahuje vysokokopiový počátek *ori I* odvozený od plazmidu pMB1 (Betsou *et al.* 1993).

Plazmid pSS4245 (8286 párů bazí) slouží pro alelické výměny v bakterii *B. pertussis*. Na plazmidu je umístěn gen pro restriční endonukleázu I-SceI a zásahové místo pro tento enzym. Transkripce genu *I-Sce I* je kontrolována BvgA/S systémem. Plazmid nese rovněž geny pro rezistenci k tetracyklinu, streptomycinu, bleomycinu a neomycinu, které jsou funkční v *B. pertussis*, zatímco gen pro rezistenci k ampicilinu slouží pro replikaci plazmidu v *E. coli* (Inatsuka *et al.* 2010).

#### 3.1.2 Bakteriální kmeny

*E. coli* XL1-Blue (Stratagene, USA), kmen nesoucí rezistenci na tetracyklin; byl používán k replikaci plazmidové DNA a k produkci CyaA proteinů.

*E. coli* SM10  $\lambda$  pir - (Biomedal, Španělsko), kmen nesoucí rezistenci na kanamycin; byl používán pro přenos plazmidu do recipientní buňky *B. pertussis* konjugací zprostředkovanou chromozomálně kódovanými *Tra* geny.

*B. pertussis* Tohama I - (Institute Pasteur, Francie)

Bakteriální kmeny byly dlouhodobě uchovávány ve 40% glycerolu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (mrazicí boxy Jouan, Thermo Scientific, Francie a Sanyo, Schoeller, ČR). Bakteriální kmeny vzniklé transformací příslušné plazmidové DNA do superkompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue a *E. coli* SM10  $\lambda$  pir byly krátkodobě uchovávány při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  na agarových plotnách s LB médiem.

### 3.1.3 Syntetické oligonukleotidy

**Tab. 1 Seznam použitých oligonukleotidů a jejich sekvencí** (dodavatel: Generi Biotech, Hradec Králové, ČR).

Název	Sekvence	Délka (b)	Restrikční místo*
F-XhoIXmaI <sup>†</sup>	5'- TCGAGACTAGTGCTAGCGGC-3'	20	SpeI XhoI
R-XhoIXmaI <sup>†</sup>	5'- CCGGGCCGCTAGCACTAGTC-3'	20	SpeI XmaI
F-RTXblok2	5'- TTTCTCGAGGAGGAGCGCCTCGAACG-3'	26	XhoI
F-RTXblok3	5'- TTTCTCGAGATCCATCCAGGCAGGATC-3'	27	XhoI
F-RTXblok4	5'- TTTCTCGAGGGCGCGCATGCCGGC-3'	24	XhoI
R-XmaI	5'- CGGCCCCGGGCCGCTG-3'	15	XmaI
F-BP-Δ1	5'- AATGCGGCCGCGTTCATCACGCCGCTGG -3'	28	NotI
R-BP-Δ1	5'- AATGGATCCTGACGTTTTTCGACATTGCG -3'	28	BamHI
F-BP-Δ1-2	5'- AATGCGGCCGACGTTTCATCACGCCGCTG -3'	29	NotI
R-BP-Δ1-2	5'- AATGGATCCGGCCGGCGCCAGGT -3'	24	BamHI
F-BP- Δ1-3	5'- AATGCGGCCGCGTTCATCACGCCGCTGG -3'	28	NotI
R-BP- Δ1-3	5'- AATGGATCCTGCGCAACACGTTGCTGG -3'	27	BamHI
F-BP- Δ1-4	5'- AATGCGGCCGCGCTGGCCGCGCCAGG -3'	26	NotI
R-BP- Δ1-4	5'- AATGGATCCCCGGTGATCGGCGTCG -3'	25	BamHI
F- <i>rpoB</i> <sup>‡</sup>	5'- CGCCAATGTAGACGATGCC-3'	19	
R- <i>rpoB</i> <sup>‡</sup>	5'- GCTGGGACCCGAGGAAAT-3'	18	
F- <i>cyaB</i> <sup>‡</sup>	5'- GCATCGCCATCTCATCGG-3'	18	
R- <i>cyaB</i> <sup>‡</sup>	5'- GCGTTGTTGACCAGCACTTT -3'	20	
F- <i>cyaA</i> <sup>‡</sup>	5'- CGAGGCGGTCAAGGTGAT -3'	18	
R- <i>cyaA</i> <sup>‡</sup>	5'- GCGGAAGTTGGACAGATGC -3'	19	

\*Oligonukleotid obsahuje místo pro restrikční štěpení danou endonukleázou, které bylo použito pro klonování.

<sup>†</sup> Komplementární DNA sekvence adaptéru.

<sup>‡</sup> Primery použité pro kvantitativní PCR.

### 3.1.4 Protilátky

**3D1** - monoklonální myší protilátka proti CyaA (E. L. Hewlett, University of Virginia, USA)

**9D4** - monoklonální myší protilátka proti CyaA (E. L. Hewlett, University of Virginia, USA)

Anti-myší IgG monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (GE Healthcare, Velká Británie)

Monoklonální králičí protilátka proti cAMP (A. Ullmann, Institut Pasteur, Francie)

Anti-králičí IgG monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (GE Healthcare, Velká Británie)

### 3.1.5 Restriční endonukleázy a jejich pufrů

Tab. 2 Seznam použitých restričních endonukleáz.

Enzym	Zásahové místo	Výrobce	Vhodný reakční NEB pufr*	Reakční teplota (°C)	Vyžaduje 0,01% BSA
BamHI	G GATCC	New England Biolabs , USA	2, 3 <sup>‡</sup> , 4 <sup>†</sup> , (1)	37°C	ano
NcoI	C CATGG	New England Biolabs , USA	1, 2, 3 <sup>‡</sup> , 4 <sup>†</sup>	37°C	ne
NotI	GC GGCCGC	New England Biolabs , USA	3 <sup>‡</sup>	37°C	ano
SpeI	A CTAGT	New England Biolabs , USA	2, 4 <sup>†</sup> , (1)	37°C	ano
XhoI	C TCGAG	New England Biolabs , USA	2, 3 <sup>‡</sup> , 4 <sup>†</sup> , (1)	37°C	ano
XmaI	C CCGGG	New England Biolabs , USA	4 <sup>†</sup>	37°C	ano

\* Enzymy mají v daném pufru 100% aktivitu, v pufrch uvedených v závorce mají enzymy 75% aktivitu

<sup>†</sup> NEB pufr 4, složení 10x : 200 mM Tris-acetát, 500 mM acetát draselný, 100 mM acetát hořečnatý, 10 mM DTT, pH 7.9. New England Biolabs, USA.

<sup>‡</sup> NEB pufr 3, složení 10x : NaCl 1 M, Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 10 mM, pH 7.9. New England Biolabs, USA.

NEB pufr 3.1, složení 10x : NaCl 1 M, Tris-HCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, BSA 1 mg·ml<sup>-1</sup>, pH 7.9. New England Biolabs, USA.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Molekulárně-biologické metody

#### 3.2.1.1 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

Objem 1 µl plazmidové DNA byl smíchán s 200 µl suspenze kompetentních buněk. Směs byla inkubována 10 minut na ledu, ohřáta po dobu 5 minut ve vodní lázni o teplotě 37 °C (vodní lázeň Unimed, ČR) a zchlazena po dobu 2 minut na ledu. Po přidání 1 ml přehřátého LB media (Luria-Bertani medium, obsahuje 10 g tryptonu, 5 g kvasničného extraktu [obojí Oxoid, VB] a 10 g NaCl v 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7, sterilizováno autoklávováním 20 min při 0,12 MPa) byla kultura inkubována ve vodní lázni při 37 °C po dobu 1 hod, poté 1 min odstředěna při 16 000 g, 25 °C. Většina supernatantu byla odebrána a zbylá odstředěná kultura byla nanášena na misku s tuhým LB půdou a antibiotikem dle rezistence na plazmidu

(18 g·l<sup>-1</sup> bakteriologického agaru [Oxoid, VB] v tekutém LB médiu, při teplotě 50 °C bylo přidáno antibiotikum). Buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 16 hodin.

### **3.2.1.2 Minipreparativní izolace plazmidové DNA**

LB medium (1,5 ml) s příslušným antibiotikem bylo zaočkováno čerstvě narostlou bakteriální kolonií a 12 hodin kultivováno za intenzivního třepání při 37 °C. Bakteriální kultura byla odstředěna 1 min při 16000 g, 25 °C. Pelet byl resuspendován ve 100 µl roztoku I (50 mM glukóza, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH8). Po pětiminutové inkubaci byly buňky lyzovány přidavkem 200 µl roztoku II (0,2 M NaOH, 1% [hmotnost/objem] SDS), šetrně promíchány a ponechány 5 minut na ledu. Poté bylo k lyzovaným buňkám přidáno 150 µl roztoku III (3 M octan draselný, 2 M kyselina octová) a vysrážené proteiny s chromozomální DNA byly odstředěny (16000 g, 4 °C, 15 minut). K ~400 µl supernatantu s plazmidovou DNA byl přidán stejný objem isopropanolu, směs byla promíchána a ponechána 2 minuty srážet na ledu. Následovalo odstředování (16000 g, 4 °C, 15 minut), odstranění supernatantu, promytí peletu 1 ml 70% ethanolu, odstředování (16000 g, 25 °C, 3 minuty) a důkladné vysušení peletu. Pelet byl rozpuštěn ve 40 µl TE pufru s termostabilní pankreatickou RNázou (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, RNáza 20 µg · ml<sup>-1</sup>, pH 8) a směs byla inkubována 30 minut při 70 °C (vodní lázeň Unimed, ČR). Získaná plazmidová DNA byla uchovávána při teplotě 25 °C (mrazicí box Liebherr, Švýcarsko).

### **3.2.1.3 Izolace plazmidové DNA Lego Kitem**

Všechny kolonie z plně porostlé misky vyšeté po transformaci (viz 3. 2. 1. 2.) byly smyty do 1 ml roztoku I (viz 4. 2. 1. 3.). Suspenze byla naředěna mírným objemovým nadbytkem (~4:3, záviselo na hustotě suspenze) roztoku II, promíchána pomalou inverzí a nechána 5 minut inkubovat při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku III, suspenze byla promíchána a odstředěna (16000 g, 25 °C, 15 minut). Supernatant byl převeden do 10ml zkumavky a smíchán se stejným objemovým množstvím DNA vazebného pufru. Směs byla nanesena na minikolonky s křemičitými partikulemi (~3 ml směsi na 200 µl partikulí v 1 kolonce) a vystavena mírnému podtlaku (přístroj Lego Kit Promega). Po částečném odstranění pufru odsátím bylo znovu přidáno 500 µl vazebného pufru. Po dalším odsátí byly minikolonky s navázanou plazmidovou DNA promyty 3 ml DNA promývacího pufru a jeho zbytky byly odstraněny odstředěním (16000 g, 25 °C, 1 min). Plazmidová DNA byla eluována z náplně minikolonky 40 µl elučního pufru (Quiagen, Německo) do sterilní zkumavky (eluze odstředěním 16000 g, 25 °C, 1 min). DNA vazebný pufr, promývací pufr

a vazebné křemičité partikule byly součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci plazmidové DNA (Top-Bio, ČR). Plazmidová DNA byla uchovávána při -20 °C.

#### **3.2.1.4 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami**

Objem směsi pro štěpení závisel na objemu roztoku DNA, kterou bylo třeba naštěpit. Reakční směs vždy obsahovala restrikční enzym (1-2 U na reakci v objemu 20 µl) a 1x pufr vyžadovaný příslušnou endonukleázou (viz Tab. 2). K pufrům 3 a 4 bylo přidáno BSA na výslednou koncentraci 1x, pufr 3.1 již obsahoval BSA. Objem byl doplněn sterilní H<sub>2</sub>O. Reakční směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C. Po štěpení byla směs nanesena na gel a byla provedena DNA elektroforéza (viz 4. 2. 1. 8.). Fragment DNA požadované délky byl vyříznut z agarózového gelu a izolován dle návodu výrobce pomocí kitu (NZYGelpure Agaróze Gel Extraction Kit, NZYTECH, Portugalsko).

#### **3.2.1.5 Ligace fragmentů DNA**

Ligace byla prováděna v objemu 20 µl. konce DNA byly ošetřeny restrikčními endonukleázami. Směs obsahovala ~10 násobný přebytek fragmentu nad plazmidovou DNA, 1x T4 DNA ligační pufr (10x koncentrovaný: 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8 při 25 °C; Thermo Fisher Scientific, USA) a 1 µl T4 DNA ligázy (5 U · µl<sup>-1</sup>; Thermo Fisher Scientific, USA). Objem byl doplněn sterilní H<sub>2</sub>O. Ligace probíhala 16 hod při pokojové teplotě.

#### **3.2.1.6 Amplifikace fragmentů DNA**

Amplifikace fragmentů plazmidové DNA pomocí metody PCR (polymerase chain reaction) byla prováděna v objemu 20 µl ve speciálních tenkostěnných mikrozkuvkách. Směs obsahovala 0,5 µl plazmidové DNA, 4 µl Phusion GC pufru (5x koncentrovaný obsahuje 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>; Finnzymes, Finsko) resp. 4 µl Q5® reakčního pufru (5x koncentrovaný obsahuje 10 mM MgCl<sub>2</sub>; New England Biolabs, USA). Dále bylo do každé reakce přidáno 1-2,5 µl každého z primerů „forward“ a „reverse“ o koncentraci 10 µM a 0,5-1 µl 10 mM dNTP. Objem byl doplněn sterilní vodou. Nakonec bylo do celé směsi přidáno 0,5 µl Phusion<sup>TM</sup> DNA polymerasy (2 U · µl<sup>-1</sup>, Finnzymes, Finsko) resp. Q5® High Fidelity DNA polymerasy (2 U · µl<sup>-1</sup>, New England Biolabs, USA).

Reakce byly prováděny v PCR přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-rad, USA) s nastaveným cyklem: 2 min při teplotě 98 °C (počáteční denaturace templátové DNA), 40× (10 s při teplotě 98 °C [denaturační fáze], 30 s při teplotě 56 - 58°C [nasednutí primerů,

teplota závisela na vypočtené teplotě tání primerů], 30 s-1 min při teplotě 72 °C [prodlužovací fáze, doba závisela na počtu párů bází produktu při uvážení polymerační rychlosti 1000 pb/30 s]). Po proběhnutí všech cyklů byl obsah ponechán 5 minut v PCR přístroji při teplotě 72 °C, což zaručovalo ukončení polymerační fáze a poté byl obsah ochlazen na teplotu 4 °C.

Při provádění PCR na koloniích *B. pertussis* byly do předpřipravené směsi, obsahující Q5<sup>®</sup> High Fidelity DNA polymerasu, Q5 reakční pufr, primery „forward“ a „reverse“ a dNTP ve výše uvedených množstvích (případně také 5 µl přídatku „GC enhancer“), přidány bakterie odebrané z kolonie na plotně s BG médiem a beraní krvi a obsahující chromozomální DNA *B. pertussis*, která sloužila jako DNA templátová.

### 3.2.1.7 Horizontální elektroforéza v agarózovém gelu

Pro elektroforézu byly použity agarózové gely o hmotnostních koncentracích agarózy 0,6%, 0,8% popř. 1%, v závislosti na velikostech DNA fragmentů. Gel byl připraven rozpuštěním příslušného množství agarózy (Sigma-Aldrich, USA) v TBE pufru (90 mM Tris-borát, 2 mM EDTA, pH 8,3), povařením do úplného rozpuštění agarózy a přidáním ethidium bromidu do výsledné koncentrace 0,5 µg·ml<sup>-1</sup>. Gel byl po ochlazení na 50 °C nalit do aparatury pro DNA elektroforézu (vše od firmy Bio-Rad, USA). K roztoku DNA byl přidán DNA vzorkovací pufr (0,25% [hmotnost/objem] bromfenolová modř, 40% [objem/objem] glycerol). Standardem pro určení velikosti fragmentů byla λ-DNA (Fermentas) štěpená v laboratoři restriční endonukleázou PstI. Fragmenty byly rozděleny v TBE pufru podle svých velikostí při vloženém napětí 100 V. Rozdělené DNA fragmenty byly vizualizovány UV světlem (G:BOX Syngene, Biocon, Indie).

### 3.2.1.8 Bakteriální konjugace

Na plotny s tuhým BG médiem (Bordet-Gengou agar, 1 litr média byl připraven rozpuštěním 30 g komerčně dodávaného prášku [Difco, USA; obsahuje 4,5 g infuse ze 125 g brambor, 5,5 g NaCl a 20 g agaru] a 10 g glycerolu v H<sub>2</sub>O, autoklávováno při 0,12 MPa 20 minut), beraní krvi (Biotest, Konárovice, ČR) a MgSO<sub>4</sub> (15% beraní krev a 50mM MgSO<sub>4</sub> byly přidány do BG media o teplotě ~50 °C) byly tři dny před započítím konjugace vysety bakterie *B. pertussis*. Jeden den před započítím konjugace byly na plotnu s LB médiem s ampicilinem 150 µg·ml<sup>-1</sup> vysety bakterie *E. coli* SM10 λ pir, transformované různými variantami plazmidu pSS4245. Na malé plošce misky s BG agarem, beraní krvi, 50 mM

MgSO<sub>4</sub> a 10mM MgCl<sub>2</sub> byly smíchány v poměru 10:1 bakterie *B. pertussis* a *E. coli* SM10  $\lambda$  pir. Směs byla inkubována po dobu 4 hodin při 37°C v 5% atmosféře CO<sub>2</sub>.

### 3.2.1.9 Homologní rekombinace

Směs bakterií *B. pertussis* a *E. coli* SM10  $\lambda$  pir po konjugaci byla pro dosažení prvního kroku homologní rekombinace rozetřena ve velmi tenké vrstvě na plotny s BG tuhým médiem s 15% beraní krví, 50 mM MgSO<sub>4</sub> a s přidavkem antibiotik (500  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  streptomycin, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  kanamycin a 30  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  ampicilin). Jednotlivé kolonie, narostlé přibližně po 5 dnech, byly izolovány a pro dosažení druhého kroku homologní rekombinace byly rozetřeny na plotny s BG agarem s 15% beraní krví. Jednotlivé kolonie, narostlé přibližně po 3 dnech, byly vybrány na základě očekávaných fenotypických znaků a rozetřeny na samostatné misky s 15% beraní krví.

### 3.2.1.10 Izolace celkové RNA a její ošetření DNázou

Z tekuté kultury *B. pertussis* v SS médiu o OD<sub>600</sub>=1 bylo odebráno 1350  $\mu\text{l}$ . Dále bylo přidáno 450  $\mu\text{l}$  roztoku ethanolu s 5% obsahem fenolu a vzorek byl odstředován (15 min, 16000 g, 4 °C). Supernatant byl odebrán a pelet zamražen při -80 °C.

Při vlastní izolaci celkové RNA byl pelet resuspendován ve 150  $\mu\text{l}$  lyzačního pufru (20 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 0,6 M sacharóza, 2,5  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  lysozymu, v DEPC vodě). Poté bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  pufru (2 % SDS [hmotnost/objem], 1  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  proteinasy K, v DEPC vodě) a vzorek byl ohřán na 1 min při 95 °C. Po inkubaci byl vzorek uložen na led. Do vzorku bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  roztoku TRIzol<sup>®</sup> Reagent (Sigma-Aldrich). Vzorek byl promíchán inverzí a ponechán při pokojové teplotě. Dále k němu bylo přidáno 260  $\mu\text{l}$  chloroformu. Mikrozkušavka byla promíchána a poté byl vzorek inkubován 10 min při pokojové teplotě. Oddělení fází bylo podpořeno odstředováním (20 min, 4 °C, 16000 g). Z vzorku bylo odebráno 600  $\mu\text{l}$  svrchní vodné fáze do nové mikrozkušavky a k ní přidáno 600  $\mu\text{l}$  isopropanolu. Po promíchání inverzí byl vzorek inkubován 30 min při 4 °C. RNA byla v tomto kroku sražena a následným odstředováním převedena do peletu (16000 g, 30 min, 4 °C). Supernatant byl odstraněn, pelet promyt 300  $\mu\text{l}$  75% ethanolu a odstředován (16000 g, 5 min, 4 °C). Po odsátí ethanolu byl pelet, obsahující celkovou RNA, vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn ve 30  $\mu\text{l}$  vody zbavené nukleáz (Sigma). Byly odebrány 3  $\mu\text{l}$  vzorku, přidáno 3  $\mu\text{l}$  nanášecího pufru (93% formamid, 10 mM EDTA pH 8, 1,5 M bromfenolová modř) a kvalita získané RNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou při vloženém napětí 80 V.

Ke vzorkům celkové RNA byla přidána DNáza tak, aby reakce probíhala ve výsledném objemu 100  $\mu$ l (10  $\mu$ l 10x pufru pro DNázu I [Epicentre, USA], 2 U DNázy I [Epicentre, USA], 0,5  $\mu$ l ribonukleasového inhibitoru Rnasinu [Promega, USA], doplněno vodou zbavenou nukleáz). Vzorky byly inkubovány 1,5 hod při 37 °C. Do vzorků bylo poté přidáno 100  $\mu$ l směsi PCI (phenol, chloroform, isoamylalkohol [25:24:1]), byly promíchány a odstředovány (3 min, 16000 g, 25 °C). Svrchní vodná fáze byla přenesena do mikrozkušavek Phase Lock Gel<sup>TM</sup> (5 Prime, zacházení dle pokynů výrobce). Dále do nich byl přidán chloroform v objemu 1:1 k vodné fázi. Mikrozkušavky byly protřepány, inkubovány 5 min při pokojové teplotě a odstředovány (16000 g, 3 min, 4 °C). Následně bylo do nových mikrozkušavek odebráno 100  $\mu$ l vodné fáze. Do každé bylo přidáno 10  $\mu$ l octanu sodného pH 5,2 a 300  $\mu$ l 96% EtOH. Vzorky byly promíchány inverzí a RNA byla srážena 30 min při -20 °C. Vzorky byly odstředěny (16000 g, 40 min, 4 °C) a supernatant odstraněn. Pelet byl promyt 300  $\mu$ l 75% ethanolu odstředováním (16000 g, 5 min, 4 °C). Po odsátí ethanolu byl pelet vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn ve 30  $\mu$ l vody zbavené nukleáz. Byly odebrány 3  $\mu$ l vzorku, přidáno 3  $\mu$ l nanášecího pufru a kvalita získané RNA byla ověřena horizontální agarózovou elektroforézou.

Při druhém kroku ošetření DNázou bylo k 27  $\mu$ l vzorků RNA přidáno 5  $\mu$ l DNázy I (Sigma), 5  $\mu$ l 10x pufru pro DNázu I (Sigma), objem byl promíchán a inkubován 15 min při pokojové teplotě. Následně byla reakce zastavena přidáním 5  $\mu$ l pufru (Stop solution buffer, Sigma) a současným zahřátím na 70 °C po dobu 10 min. Kvalita získané RNA byla sledována horizontální agarózovou elektroforézou a kvalita i kvantita byly sledovány spektrofotometrickým měřením (NanoDrop ND 1000, Thermo Fisher Scientific, USA), které kromě měření koncentrace dává informaci o čistotě, vyjádřené poměry absorbancí při 260 nm a 280 nm (A260/A280) a poměrem A260/A230. Čistá RNA byla charakterizována poměrem A260/A280 ~2 a zároveň poměrem A260/A230 v rozmezí 1,7 - 2,2.

### **3.2.1.11 Reverzní transkripce**

Celková RNA byla následně přepsána do cDNA. Množství 600 ng celkové RNA bylo smícháno s vodou zbavenou nukleáz, aby výsledný objem byl 13  $\mu$ l. Do reakce bylo dále přidáno 2  $\mu$ l směsi primerů (0,25  $\mu$ g primerů náhodných hexamerů a 0,25  $\mu$ g oligo dT primerů). Reakční směs byla zahřáta na 70 °C po dobu 5 min a ihned zchlazena na ledu. Potom bylo přidáno 5  $\mu$ l 5x pufru pro reverzní transkriptázu (M-MLV Reaction Buffer, Promega, USA), 1  $\mu$ l (200 U) M-MLV reverzní transkriptázy (Promega, USA), 2  $\mu$ l 10 mM

směsi dNTP, 0,5  $\mu\text{l}$  ribonukleasového inhibitoru Rnasinu (20 U). Výsledná směs byla doplněna vodou zbavenou nukleáz na objem 25  $\mu\text{l}$  a byla inkubována 1 hod při 37 °C. Jako negativní kontrola procesu reverzní transkripce byl použit vzorek, kde RNA byla nahrazena vodou. Jako kontrola nepřítomnosti genomové DNA byl připraven vzorek, kde nebyla přidána reverzní transkriptáza.

### **3.2.1.12 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qPCR)**

Reakční směs o konečném objemu 20  $\mu\text{l}$  obsahovala 1  $\mu\text{l}$  templátové cDNA získané reverzní transkripcí, 2  $\mu\text{l}$  každého z primerů „forward“ a „reverse“ (viz Tab. 1) o finální koncentraci 200 nM, 10  $\mu\text{l}$  2x koncentrované komerční směsi „SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix“ (20 mM Tris-HCl pH 8,3, 100 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM každého dNTP, 0,05  $\text{U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  Taq DNA polymerázy, JumpStart Taq protilátky, SYBR Green I a stabilizátory [Sigma-Aldrich, USA]) a 5  $\mu\text{l}$  vody zbavené nukleáz. Primery k detekci všech genů byly navrženy na stejnou teplotu tání, aby reakce mohly probíhat při stejném teplotním cyklu. Do procesu byly vždy zařazeny dvě negativní kontroly, neobsahující templát, a dvě kontroly z procesu reverzní transkripce.

Reakce byly prováděny v PCR přístroji s fluorescenční detekcí CFX96 (Bio-rad, USA) s nastaveným cyklem: 2 min při teplotě 95 °C (počáteční denaturace templátové DNA), 40 $\times$  (15 s při teplotě 95 °C [denaturační fáze], 30 s při teplotě 60 °C [nasednutí primerů], 30 s při teplotě 72 °C [prodlužovací fáze]), křivka tání 55 °C až 95 °C. Fluorescence byla měřena po elongaci primerů a po proběhnutí amplifikační reakce byly navíc analyzovány křivky tání vzniklých produktů. K ověření specifity qPCR reakce byla dále použita horizontální agarózová elektroforéza.

Expresi cílového genu byla určena jako poměr  $C_q$  („cycle of quantification“ je cyklus při amplifikaci, při kterém se fluorescence zvedne nad hodnotu fluorescence pozadí, a který určuje množství templátu ve vzorku) cílového genu a referenčního genu *rpoB*, kódujícího  $\beta$ -podjednotku RNA polymerázy.

## **3.2.2 Produkce a purifikace proteinů**

### **3.2.2.1 Produkce CyaA proteinů v třepané kultuře**

Superkompetentní buňky *E. coli* XL1 byly transformovány (3. 2. 1. 2.) plazmidem nesoucím gen k expresi požadovaného proteinu a inkubovány 16 hod na miskách s tuhou LB

půdou a antibiotikem dle rezistence na plazmidu. Poté bylo několik kolonií buď přeneseno do 2 ml tekutého LB média (v případě ověřování exprese proteinu z nově vytvořeného plazmidového konstrukt) nebo 16 hodin před produkcí proteinu ve velkém objemu do 50 ml MDO média. Médium bylo vždy přehřáté na 37 °C a těsně před přenesením bakterií do něj byl přidán ampicilin o koncentraci 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . MDO médium (20 g glycerolu [přidán až do rozmíchané suspenze], 20 g kvasničného extraktu, 7,3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 17,2 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 37,4 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3,5 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a 29,6  $\mu\text{M}$  thiaminu v 1 l, pH 7,0) bylo čerstvě připraveno a sterilizováno autoklávováním po dobu 20 min při 0,12 MPa. V případě produkce proteinu ve velkém objemu bylo přidáno 5 ml tekuté kultury, rostoucí 16 hodin za stálého třepání v 50 ml MDO média, do 250 ml MDO média s ampicilinem. Bakterie byly kultivovány za stálého třepání při 37 °C do  $\text{OD}_{600}=0,3$  (optická denzita při vlnové délce 600 nm, měřeno spektrofotometrem SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie). Poté byla produkce proteinu indukována přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 0,1 mM. Kultura rostla za stálého třepání při 37 °C další 4 hodiny a kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v ledové lázni. Po zchlazení byla kultura stočena (3700 g, 20 min, 4 °C v odstředivce MLW K80<sup>®</sup>). Supernatant byl odstraněn a pelet jednou promyt 50 ml pufru (50 mM Tris-HCl, pH 8), odstředován (3800 g, 10 min, 4 °C, odstředivka Hettich Zentrifugen Universal 32 R, Německo) a zamražen (-25 °C).

### 3.2.2.2 Příprava močovínového extraktu CyaA proteinů

Bakteriální biomasa byla resuspendována v TC pufru (50 mM Tris-HCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 8). Buňky byly rozbity ultrazvukem (Ultrasonikator S3000, Misonix, USA) nastaveným na následující program : amplituda 40 W, 10 minut (8 x 15 s sonikační pulz a 2 min pauza) při současném chlazení vzorku v ledové lázni. Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky odstraněny odstředováním (1400 g, 4 °C, 5 min.). Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a odstředěn (43000 g, 4 °C, 30 minut odstředivka Thermo Scientific), čímž došlo k oddělení cytosolu od zbytků buněk v peletu. V něm byla kromě buněčných membrán přítomna inkluzní tělíska, obsahující nadprodukovaný protein. Supernatant byl odstraněn a do peletu bylo vmícháno 2,4 g krystalické močoviny. Poté bylo přidáno 3 ml TC pufru, pelet resuspendován a obsah zkumavky promícháván pomalou inverzí po dobu 45 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 M. Poté následovalo odstředování (43000 g, 4 °C, 30 minut) a převedení supernatantu (močovínový extrakt) do nových zkumavek.

### 3.2.2.3 Purifikace CyaA proteinů pomocí kapalinové chromatografie na DEAE iontoměničích

Do močovinného extraktu (3. 2. 2. 2) byl přidán NaCl o výsledné koncentraci 50 mM. Chromatografická kolona byla naplněna 1-3 ml regenerované matrice „DEAE-Sepharose“ (DCL-6B-100, Sigma-Aldrich, USA) a promyta 2 ml pufru „DEAE-A“ (Tris-HCl 50 mM, pH8). Další postup se lišil u purifikace intaktního CyaA (dále jen CyaA) a delečních mutant CyaA (viz Kap. 5. 1., Obr. 10).

Při purifikaci CyaA byla kolona propláchnuta objemem promývacího pufru „DEAE-B“ (Tris-HCl 50 mM pH8, močovina 8 M, NaCl 120 mM), odpovídajícím několika objemům kolony. Močovinný extrakt byl nanesen na kolonu s matricí „DEAE-Sepharose“, kde došlo k navázání CyaA. Kolona byla promyta množstvím promývacího pufru, odpovídajícím třem objemům kolony. Protein byl poté eluován postupně množstvím elučního pufru „DEAE-E“ (Tris-HCl 50 mM pH8, močovina 8 M, NaCl 200 mM), odpovídajícím polovině objemu kolony. Frakce byly sbírány a množství v nich obsaženého proteinu bylo sledováno metodou podle Bradfordové (10 µl eluovaného vzorku bylo přidáno do 90 µl činidla Bradfordové (Quick Start<sup>TM</sup> Bradford 1x Dye Reagent, Bio-Rad, USA).

V případě delečních mutant CyaA byla kolona propláchnuta objemem pufru „DEAE-C“ (Tris-HCl 50 mM pH8, močovina 8 M), odpovídajícím několika objemům kolony. Močovinný extrakt byl nanesen na kolonu „DEAE-Sepharose“ a nenavázaná frakce byla sbírána. Matrice byla promyta pufrům „DEAE-C“ a proteiny eluovány pufrům „DEAE-E“.

### 3.2.2.4 Purifikace proteinů afinitní chromatografií na kalmodulin-agaróze

Tato metoda využívá vysoké afinity AC domény CyaA k eukaryotickému kalmodulinu (Wolff *et al.* 1980; Guo *et al.* 2005). Purifikace byla prováděna při 4 °C za použití vychlazených pufrů. Na kolonu byly nanesený 1-2 ml kalmodulin-agarózy (GE Healthcare, Velká Británie) a tato matrice byla promyta 15 ml pufru (močovina 8 M, EDTA 2 mM) a ekvilibrována stejným objemem pufru „KA“ (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 500 mM, pH 8). Vybrané frakce z chromatografie na DEAE iontoměničích (3. 2. 2. 3) byly ředěny 1:4 pufrům „KA“ a nanesený na kolonu. Kolona byla promyta 15 ml pufru „KA“ a eluce proteinu byla provedena elučním pufrům „KE“ (močovina 8 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8) při 25°C po frakcích odpovídajících polovině objemu matrice.

### 3.2.2.5 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové. V rozmezí 10–300  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  byla připravena série ředění proteinu BSA (hovězí sérový albumin), který sloužil jako kalibrační standard. Ke 100  $\mu\text{l}$  jednotlivých ředěných standardů nebo 100  $\mu\text{l}$  vody (referenční standard) bylo přidáno 900  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a jejich absorbance byla změřena proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm. Byla sestrojena standardní kalibrační křivka, podle jejíhož lineárního průběhu byla odvozována koncentrace měřeného proteinu.

### 3.2.2.6 Elektroforéza SDS-PAGE v polyakrylamidovém gelu

Při přípravě vzorku na SDS-PAGE elektroforézu byl vzorek proteinu smíchán se vzorkovým pufrům (5x koncentrovaný zásobní roztok: 250 mM Tris-HCl, 500 mM DTT, 10% [hmotnost/objem] SDS, 0,5% [hmotnost/objem] bromfenolová modř, 50% [objem/objem] glycerol, 10% [objem/objem]  $\beta$ -merkaptoethanol). Pro porovnání molekulové hmotnosti proteinů byl použit proteinový standard (PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas International Inc., Kanada).

Vzorek byl nanesen na gel, sestávající z horního 5% zaostřovacího gelu o pH 6,8 (266  $\mu\text{l}$  30% roztoku akrylamidu [akrylamid 29% (hmotnost/objem), N,N'-metylen-bisakrylamid 1% (hmotnost/objem)], 1,23 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 200  $\mu\text{l}$  Tris-HCl 1 M pH 6,8, 60  $\mu\text{l}$  10% SDS, 20  $\mu\text{l}$  25% APS a 5  $\mu\text{l}$  TEMED) a ze spodního 7,5% rozdělovacího gelu o pH 8,8 (1,24 ml 30% roztoku akrylamidu, 1,8 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 1,87 ml Tris-HCl 1 M pH 8,8, 50  $\mu\text{l}$  10 % SDS, 12,5  $\mu\text{l}$  25% APS, 12,5  $\mu\text{l}$  TEMED).

Elektroforéza probíhala v Tris-glycinovém pufru (25 mM Tris-HCl, 250 mM glycin, 0,1% [hmotnost/objem] SDS, pH 8,3) na přístroji Power pac 1000 (Bio-Rad, USA), nastaveném na konstantní proud 35 mA na jeden gel. Po jejím dokončení byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělovací gel byl obarven barvicím roztokem pro SDS-PAGE elektroforézu (225 ml methanol, 225 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 50 ml kyselina octová, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250) za mírného třepání při 25 °C pro vizualizaci rozdělených proteinů. Po dostatečném obarvení proteinů byl gel odbarven v odbarvovacím roztoku pro SDS-PAGE elektroforézu (250 ml methanol, 650 ml  $\text{dH}_2\text{O}$ , 100 ml kyselina octová) za mírného třepání při 25 °C, omyt vodou a vysušen v celofánové fólii.

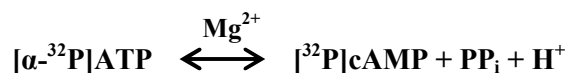
### 3.2.2.7 Imunochemická detekce proteinu na membráně

Vzorky pro analýzu byly nejdříve rozděleny na gelu klasickou SDS-PAGE elektroforézou, s tím rozdílem, že pro porovnání molekulové hmotnosti proteinů byl použit obarvený proteinový standard (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fermentas International Inc., Kanada). Po dokončení elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělovací gel byl uložen do blotovacího pufru (2,5 mM Tris-HCl, 19,2 mM glycin, 0,01% [hmotnost/objem] SDS, 20% [objem/objem] methanol, pH 8,3). Nitrocelulózoová membrána a filtrační papíry byly upraveny na velikost gelu a uloženy do blotovacího pufru. Poté byl vytvořen sendvič v pořadí: 1. filtrační papír, 2. nitrocelulosová membrána, 3. gel, 4. filtrační papír. Ze sendviče byly eliminovány vzduchové bubliny, byl zalit blotovacím pufrem a umístěn do aparatury pro Western blotting (Hoefler Semi-Phor TE70 semi-dry transfer, USA). Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal při napětí 1 mA na 1 cm<sup>2</sup> gelu po dobu 70 min. Poté byla membrána uložena alespoň na 16 hodin při 4 °C do blokovacího pufru (5% mléko [hmotnost/objem] a PBS 1x [138 mM NaCl, 3 mM KCl, 12 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4] v dH<sub>2</sub>O). Po této inkubaci byla membrána opláchnuta pufrem „W“ (0,05% [objem/objem] Tween 20 a PBS 1x v dH<sub>2</sub>O). Membrána byla inkubována 1-2 hod za mírného kývání s primární protilátkou 3000x ředěnou v pufru „W“. Poté byla membrána promývána šestkrát po 10 minutách pufrem „W“. Následovala inkubace 30 min za mírného kývání se sekundární, anti-myší protilátkou 3000x ředěnou v pufru „W“ a poté opět promývání šestkrát po 10 minutách pufrem „W“. Na membránu bylo nanášeno 300 µl luminiscenčního roztoku (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, USA), obsahujícího substrát pro křenuvou peroxidasu, navázanou na sekundární protilátku. Chemiluminiscenční signál byl zaznamenán přístrojem CURIX 60 (Agfa Healthcare, Belgie).

### 3.2.3 Stanovení biologických aktivit CyaA proteinů

#### 3.2.3.1 Stanovení adenylátcyklázové aktivity

Při stanovení adenylátcyklázové (AC) aktivity bylo využito schopnosti enzymaticky aktivní adenylátcyklázové domény CyaA katalyzovat po vstupu do cílových eukaryotických buněk přeměnu ATP na cAMP. Stejným způsobem je schopna katalyzovat přeměnu radioaktivního ATP na cAMP *in vitro* podle následující rovnice:



V časových intervalech 20 s byla postupně ve všech vzorcích spouštěna výše uvedená reakce přidáním 50  $\mu\text{l}$  reakčního mixu (60 mM Tris-HCl pH 8, 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1% [objem/objem] Triton X-100, 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  BSA, 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  kalmodulin, 0,1 mM cAMP, 200  $\text{CPM}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  [ $^{2,8-3}\text{H}$ ] cAMP [INC, USA], 2 mM ATP, 10 000 – 20 000  $\text{CPM}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  [ $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ ]ATP [MGP, Česka republika], uchovávan při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) do 5  $\mu\text{l}$  vzorku CyaA. Obsah byl vždy okamžitě po přidání radioaktivní směsi promíchán a umístěn do lázně o teplotě  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Zároveň byl proveden slepý pokus, ve kterém obsahovala mikrozkušavka pouze reakční směs. Reakce byla po pěti minutách zastavena přidáním 200  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl opět ve stejných dvacetivteřinových intervalech. Vzorky byly vloženy na 5 minut do termostatovaného suchého bloku o teplotě  $100\text{ }^\circ\text{C}$ . Poté bylo upraveno pH vzorků na hodnotu 7,6 přidáním 0,2 ml neneutralizovaného 1,5 M imidazolu. Vzorky byly nanášeny na chromatografické kolony (Poly-Prep, Bio-Rad, USA), naplněné 1 g neutrálního oxidu hlinitého, kdy při pH 7,6 dochází k navázání negativně nabitých látek ( $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{ADP}$ ,  $[^{32}\text{P}]\text{AMP}$ ) na kolonu, zatímco cAMP volně protéká. Eluce cAMP byla provedena 3 ml 10 mM imidazolu o pH 7,6 do scintilační lahvičky. K eluátu bylo přidáno 10 ml scintilačního roztoku (Opti-Fluor, PerkinElmer, USA) a obsah byl důkladně protřepán. V připravených vzorcích byla změřena radioaktivita pro  $[^{32}\text{P}]$  i  $[^3\text{H}]$  (vnitřní standard) na scintilačním přístroji (Liquid scintillation counter Wallac 1409 DSA, PerkinElmer, USA).

Během výpočtu byly hodnoty pro jednotlivé vzorky upraveny vzhledem ke ztrátám  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , vzniklým během stanovení, pomocí hodnot radioaktivity vnitřního standardu ( $[^3\text{H}]\text{cAMP}$ ), a dále byly odečteny hodnoty dosažené pro slepý vzorek. Nakonec bylo ze známého množství  $[^{32}\text{P}]\text{ATP}$ , hodnoty jeho radioaktivity a ze změřené radioaktivity  $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  vypočítáno množství vzniklého cAMP podle vztahu:

$$A_{AC} = \frac{n \times (A_{PV}/A_{HV} - A_{PB}/A_{HB}) \times d \times A_{HRM}}{A_{PRM} \times V_{ME} \times t} \quad \begin{array}{l} [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ extraktu} \\ = U \cdot \text{ml}^{-1} \text{ extraktu}] \end{array}$$

$A_{PV}$	radioaktivita $^{32}\text{P}$ ve vzorku [DPM]
$A_{PB}$	radioaktivita $^{32}\text{P}$ ve slepém vzorku [DPM]
$A_{PRM}$	radioaktivita $^{32}\text{P}$ v 50 $\mu\text{l}$ reakčního mixu [DPM]
$A_{HV}$	radioaktivita [ $^{2,8-3}\text{H}$ ]cAMP ve vzorku [DPM]
$A_{HB}$	radioaktivita [ $^{2,8-3}\text{H}$ ]cAMP ve slepém vzorku [DPM]
$A_{HRM}$	radioaktivita [ $^{2,8-3}\text{H}$ ]cAMP v 50 $\mu\text{l}$ reakčního mixu [DPM]
$n$	látkové množství ATP v 50 $\mu\text{l}$ reakčního mixu [ $\mu\text{mol}$ ]
$d$	ředění vzorku
$V_{ME}$	objem přidaného ředěného vzorku k 50 $\mu\text{l}$ reakčního mixu [ml]
$t$	reakční čas [min]

### 3.2.3.2 Příprava suspenze erytrocytů

Sterilně bylo odebráno 1,5 ml beraní krve (Biotest, Konárovice, ČR), která byla 5x promyta 750  $\mu\text{l}$  TNC pufrem (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) při odstředování 16000 g po dobu 30 s. Tím byla odstraněna krevní plazma a ostatní buňky, které při této proceduře lyzují. Po promývání bylo přibližně 400  $\mu\text{l}$  erytrocytů doplněno TNC pufrem na 10 ml. Koncentrace suspenze byla upravena na  $\text{OD}_{541}=3$ . Množství krvinek v 1 ml suspenze vyplývá ze vztahu:

$$A_{541} = 3,0 \text{ odpovídá počtu } 5 \times 10^8 \text{ červených krvinek v 1 ml.}$$

### 3.2.3.3 Stanovení vazebné aktivity CyaA na erytrocytech

Vazebná aktivita vyjadřuje schopnost toxinu interagovat s membránou cílových buněk a je úměrná množství molekul toxinu, které jsou schopny navázat se na membránu během inkubace. Měří se AC aktivita veškerého množství toxinu, které interagovalo s membránou a nebylo v závěrečných promývacích krocích odmyto.

Do 990  $\mu\text{l}$  suspenze erytrocytů, obsahující přibližně  $5 \times 10^8$  buněk (4. 2. 3. 2), bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  purifikovaného CyaA proteinu o koncentraci 0,5  $\mu\text{M}$  (což odpovídá u nemutovaného toxinu koncentraci 100  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ). Koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradfordové (3. 2. 2. 5.) a poté bylo vypočítané ředění ještě upraveno podle AC aktivit naředěných toxinů. Proteiny byly ředěny v TUE pufru (Tris-HCl 50 mM pH 8, močovina

8 M, EDTA 2 mM). Výsledná koncentrace purifikovaných proteinů v reakci byla 5 nM. Suspenze erytrocytů, sloužící jako negativní kontrola vazby bez přítomnosti vápenatých iontů, obsahovaly 5 mM EDTA, a následně přidáný purifikovaný protein. Vzorek 5  $\mu$ l směsi krvinek s toxinem, do kterého bylo přidáno 45  $\mu$ l lyzačního TCT pufru, sloužil pro určení množství proteinu vstupujícího do reakce.

Inkubace probíhala po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Po skončení inkubace byly vzorky odstředovány (16000 g, 1 min, 25 °C), supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 990  $\mu$ l TNC pufru. Poté bylo 250  $\mu$ l suspenze odebráno do nové mikrozkušavky (odstranění toxinu adherovaného ke stěnám mikrozkušavky) a 2x bylo provedeno promývání TNC pufrem (16000 g, 1 min, 25 °C), za účelem odstranění nenávaného toxinu. Potřetí byl vzorek promyt TNE pufrem (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA). Pelet byl uložen na led. Při měření AC aktivity byly buňky lyzovány jeho resuspendováním v 50  $\mu$ l reakčního mixu a byla v něm stanovena AC aktivita (3. 2. 3. 1).

Výpočet AC aktivit ve vzorcích byl proveden způsobem uvedeným v Kap. 3. 2. 3. 1. Poté byla AC aktivita ve vzorcích, obsahujících navázaný CyaA protein, vztažena k AC aktivitě celkového CyaA proteinu vstupujícího do reakce. Vypočtená vazebná aktivita byla vyjádřena jako relativní vazba vztažením k vazebné aktivitě vzorku nemutovaného CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### **3.2.3.4 Stanovení invazivní aktivity CyaA na erytrocytech**

Invazivní aktivita CyaA je úměrná množství molekul toxinu, které přenesou adenylátcyklázovou doménu přes plazmatickou membránu erytrocytů během doby inkubace. Po skončení inkubace je ke vzorku přidán trypsin, který rozštěpí molekuly toxinu netranslokované do cytosolu. Po přidání nadbytku inhibitoru trypsinu a lyzi erytrocytů je stanovena AC aktivita.

Postup stanovení invazivní aktivity byl obdobný postupu stanovení vazebné aktivity (4. 2. 3. 3). Postupy se lišily po prvním odstředování následujícím inkubací, kdy bylo 250  $\mu$ l vzorku převedeno do nové zkušavky. Do vzorku byl přidán trypsin v konečné koncentraci 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Vzorek byl inkubován po dobu 10-15 min při 37 °C, poté byla aktivita trypsinu zastavena přidáním inhibitoru trypsinu ve výsledné koncentraci 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Další promývání bylo shodné s promýváním při stanovení vazebné aktivity (3. 2. 3. 3), tedy 2x bylo provedeno promývání TNC pufrem (16000 g, 1 min, 25 °C) a potřetí byl vzorek promyt TNE pufrem.

Pelet byl uložen na led. Při měření AC aktivity byl pelet resuspendován v 50  $\mu$ l radioaktivního mixu a byla stanovena AC aktivita.

Výpočet AC aktivit ve vzorcích byl proveden způsobem uvedeným v Kap. 3. 2. 3. 1. Poté byla AC aktivita ve vzorcích CyaA proteinu neodštěpeného trypsinem vztažena k AC aktivitě celkového CyaA proteinu vstupujícího do reakce. Vypočtená invazivní aktivita byla vyjádřena jako relativní invazivita vztažením k invazivní aktivitě vzorku nemutovaného CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **3.2.3.5 Stanovení hemolytické aktivity CyaA na erythrocytech**

Do 980  $\mu$ l suspenze erythrocytů, obsahující přibližně  $5 \times 10^8$  buněk (3. 2. 3. 2), bylo přidáno 20  $\mu$ l močovinných extraktů proteinů, nastavených na stejnou AC aktivitu. Suspenze erythrocytů, sloužící jako negativní kontrola hemolýzy bez přítomnosti vápenatých iontů, obsahovaly 5 mM EDTA a následně přidáný močovinný extrakt. Slepý vzorek obsahoval 980  $\mu$ l krvinek s 20  $\mu$ l TUC (Tris-HCl 50 mM pH 8, močovina 8 M,  $\text{CaCl}_2$  0,2 mM). Směs byla promíchána a inkubována při teplotě 37  $^{\circ}\text{C}$ .

Při měření kinetiky lyze bylo v hodinových intervalech (počínaje 3. hodinou) odebíráno 120  $\mu$ l vzorku, který byl odstředován (16000 g, 1 min, 25  $^{\circ}\text{C}$ ) a 100  $\mu$ l supernatantu bylo odebráno do 96-ti jamkové destičky. Lyze byla poté vyhodnocena spektrofotometricky při 541 nm (Safire 2, TECAN, Schoeller, ČR). Od hodnot byla odečtena absorbance slepého vzorku. Získané hodnoty absorbance v jednom časovém bodu byly procentuálně vztaženy k hodnotě absorbance nemutovaného CyaA v 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  a hemolytická aktivita byla vyjádřena v procentech.

### **3.2.3.6 Stanovení vazebné aktivity CyaA na makrofázích**

Vazebná aktivita CyaA byla stanovena na myší makrofágové linii J774A.1. Buňky byly kultivovány v médiu RPMI (500 ml média RPMI-1640 [Sigma-Aldrich, USA] bylo obohaceno o 0,03% L-glutamin, 0,45% glukosu, 8,8‰ pyruvát, 100 IU  $\text{ml}^{-1}$  penicilin, 100  $\text{mg ml}^{-1}$  streptomycin, 250  $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$  amphotericin B [Sigma-Aldrich], 10% [objem/objem] fetálního hovězího séra inaktivovaného teplem [Gibco<sup>®</sup>, USA]) v  $\text{CO}_2$  inkubátoru (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 % hladina  $\text{CO}_2$ ). Tkáňová linie J774A.1 je linií adherentní a její pasážování probíhalo zhruba při 80-90% porostu buněk. Adherentní buňky byly během pasážování staženy buněčnou škrabkou do média RPMI a následně odstředěny (840 g, 25  $^{\circ}\text{C}$ , 3 min). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v čerstvém RPMI

médiu, buňky vysety na Petriho misky asi v 30% porostu buněk a umístěny do CO<sub>2</sub> inkubátoru. Médium RRMI bylo kultivovaným buňkám vyměňováno každý druhý den.

Před vlastním experimentem bylo RPMI médium vyměněno za DMEM médium (500 ml média Dulbecco's Modified Eagles's Medium – high glucose [Sigma-Aldrich, USA] bylo obohaceno o 100 IU ml<sup>-1</sup> penicilin, 100 mg ml<sup>-1</sup> streptomycin, 250 ng ml<sup>-1</sup> amphotericin B [Sigma-Aldrich], 10% [objem/objem] fetálního hovězího séra inaktivovaného teplem [Gibco<sup>®</sup>, USA]), obsahujícím 1,8 mM Ca<sup>2+</sup> nutný pro aktivitu toxinu. Buňky byly kultivovány alespoň 1 h při 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Počet buněk v suspenzi byl poté stanoven pomocí Bürkerovy komůrky. Suspenze buněk byla následně naředěna ve vychlazeném DMEM médiu tak, aby výsledná koncentrace činila 10<sup>6</sup> buněk v 1 ml média.

Všechny následující kroky byly prováděny na ledu, aby bylo zabráněno endocytóze toxinu buňkami. Do 990 µl suspenze buněk, obsahující přibližně 10<sup>6</sup> buněk, bylo přidáno 10 µl purifikovaného CyaA proteinu (koncentrace 0,5 µM, ředěno v TUC pufru). Výsledná koncentrace purifikovaných proteinů v reakci byla 5 nM. Vzorek 5 µl směsi buněk toxinem, do kterého bylo přidáno 45 µl lyzačního TCT pufru, sloužil pro určení množství proteinu vstupujícího do reakce. Inkubace probíhala po dobu 30 minut na ledu. Po skončení inkubace byly vzorky převedeny do nové mikroskopické kádinky, 4x promyty vychlazeným DMEM médiem (odstředování 840 g, 3 min, 4 °C), pelet byl uložen na led a byla v něm změřena AC aktivita (3. 2. 3. 1). AC aktivita ve vzorcích, obsahujících navázaný CyaA protein, byla vztažena k AC aktivitě celkového CyaA proteinu vstupujícího do reakce. Vypočtená vazebná aktivita každého mutovaného CyaA byla vyjádřena jako relativní vazba vztažením k vazebné aktivitě nemutovaného CyaA.

### **3.2.3.7 Stanovení hladiny vnitrobuněčného cAMP v makrofázích**

Schopnost toxinu translokovat AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do buněk J774A.1 byla měřena stanovením hladiny vnitrobuněčného cAMP. Hladina cAMP v buňkách inkubovaných s toxinem byla určena pomocí metody kompetitivní ELISA. Při této metodě kompetuje cAMP, vytvořené v buňkách, s cAMP, navázaným na mikrotitrační destičku, o vazbu na primární protilátku proti cAMP. Komplex volného cAMP s protilátkou je odmytím odstraněn, takže kolorimetrický signál je vyšší ve vzorcích, které obsahovaly méně buněčného cAMP.

První den byl konjugát cAMP-BSA naředěn 1:6 000 [v:v] 0,1 M hydrogenuhličitanovým pufrům (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6) a přidán po 50 µl do jamek na 96-ti jamkové ELISA destičce („dest. 1“, Nunc-Immuno, maxisorp). „Dest. 1“ byla inkubována po dobu 4 hod při 25 °C a druhý den 2x promyta 200 µl pufrům TBST (TBS-Tween; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% [hmotnost/objem] Tween, pH 8). Poté došlo k zablokování nespecifických míst dvouhodinovou inkubací s 200 µl TBST-2% BSA (2 % [hmotnost/objem] BSA v TBST) při teplotě 25 °C. Následně byla „dest. 1“ promyta v 200 µl TBST.

Makrofágy byly staženy buněčnou škrabkou do média RPMI, spočítány v Bürkerově komůrce, naředěny na koncentraci  $2 \times 10^6$  a poté přidány do 96 jamkové mikrotitrační destičky pro tkáňové kultury („dest. 2“) v koncentraci 200 000 buněk na jamku. „Dest. 2“ byla inkubována 1,5–3 hod v 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Poté bylo odstraněno RPMI médium, přidáno 50 µl DMEM média a buňky byly inkubovány dalších 30 minut v CO<sub>2</sub> inkubátoru.

Do nové mikrotitrační destičky („dest. 3“) byla připravena ředící řada toxinů v TUC pufru o koncentracích 100x vyšších, než byla výsledná požadovaná koncentrace toxinu, tedy o koncentracích 50 nM, 37,5 nM, 25 nM a 12,5 nM. Do každé jamky bylo přidáno 5 µl takto naředěného toxinu a 245 µl DMEM média. Ihned bylo odebráno 50 µl této směsi a přidáno k 50 µl buněk inkubovaných v „dest. 2“ (došlo tak k ředění 100x na konečné koncentrace toxinu 0,5 nM, 0,375 nM, 0,25 nM a 0,125 nM). Dále probíhala inkubace buněk s definovaným množstvím toxinu po dobu 30 minut v 37 °C v CO<sub>2</sub> inkubátoru. Po inkubaci byla „dest. 2“ v případě potřeby odstředována (840 g, 25 °C, 3 min) a bylo odstraněno médium. Přidáním 60 µl „stop pufru“ (50 mM HCl, 0,2% [objem/objem] Tween) došlo k zastavení tvorby cAMP a následným inkubováním 15 min při teplotě 100 °C došlo k denaturaci enzymu. Poté bylo přidáno 60 µl neneutralizovaného 150 mM imidazolu a vytvořené vzorky nanášeny na „dest. 1“.

Do prvního sloupce „dest. 1“ bylo přidáno 100 µl TBST (pozadí jako kontrola nespecifické vazby sekundární protilátky). Do druhého a třetího sloupce bylo v duplikátu přidáno 100 µl ředící řady cAMP – 3 000 nM, 1 000 nM, 300 nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM a 1 nM. Ředící řada byla připravena v TBST. Do jamek ve zbylých sloupcích bylo přidáno 100 µl příslušných vzorků. Poté bylo do všech jamek mimo prvního sloupce přidáno 50 µl králičí primární protilátky proti cAMP ředěné 1 : 3000 v TBST-2% BSA a „dest. 1“ byla inkubována přes noc při teplotě 4 °C.

Třetí den byla „dest. 1“ 5x promyta 200  $\mu\text{l}$  TBST a poté bylo do všech jamek včetně prvního sloupce přidáno 100  $\mu\text{l}$  sekundární anti-králičí protilátky, značené křenovou peroxidázou, ředěné 1:1000 v TBST-2% BSA. Po dvouhodinové inkubaci za mírného třepání při teplotě 37 °C byla „dest. 1“ 5x promyta 200  $\mu\text{l}$  TBST. Do každé jamky bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  OPD substrátu (0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  OPD [o-Phenylendiamin, Sigma-Aldrich, USA] a 0,03%  $\text{H}_2\text{O}_2$  těsně před provedením pokusu smícháno s roztokem 0,1 M citrátu trisodného o pH 5 [upraveno koncentrovanou  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ]). Reakce probíhala několik desítek vteřin podle intenzity zabarvení vzorků ředící řady cAMP a byla zastavena přidávkem 50  $\mu\text{l}$  2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Nakonec byla odečtena hodnota absorpance při vlnové délce 492 nm (Safire 2, TECAN, Schoeller, ČR), pomocí kalibrační křivky dopočítána koncentrace cAMP. Absorbance slepého pokusu, obsahujícího pouze buňky, byla odečtena ode všech hodnot. Hodnoty koncentrace cAMP v lineární části grafu závislosti koncentrace cAMP na koncentraci CyaA toxinu byly zprůměrovány. Průměrná vnitrobuněčná koncentrace cAMP každého mutovaného CyaA byla vztažena k průměrné vnitrobuněčné koncentraci cAMP nemutovaného CyaA vyjádřena jako relativní translokace.

### 3.2.3.8 Cirkulární dichroismus

Měření CD spekter bylo provedeno ve vědecko-servisní skupině Molekulární spektroskopie na Ústavu organické chemie a biochemie (ÚOCHB) AVČR v Praze. Spektra byla nahrávána v oblasti 195-260 nm na přístroji Jasco J-815 Circular Dichroism Spectropolarimeter (Jasco, Japonsko) při pokojové teplotě v křemenné kyvetě o optické dráze 1 mm (110-QS, Hellma<sup>®</sup> Analytics). Měřicí program byl nastaven na běžnou citlivost přístroje, skenovací rychlost 10  $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$  a čas odpovědi 10 s.

Purifikované proteiny v TUE pufru (močovina 8 M, EDTA 2 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8) byly těsně před měřením renaturovány pomocí gelové filtrace na kolonkách se Sephadexem 75 (GE Healthcare) v CD měřicím pufru (5 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl) a naředěny na koncentraci 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Spektrum každého proteinu bylo nejprve změřeno bez přítomnosti vápenatých iontů a poté byla koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  upravena na 10 mM a spektrum bylo nahráno znovu.

Analýza CD spekter byla provedena Lucií Bednárovou (ÚOCHB) za využití programu Dichroweb. Spektra pufrů byla odečtena od spekter proteinů. Molární elipticita ( $\theta$ ) byla vyjádřena v jednotkách [ $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ].

### 3.2.3.9 Stanovení sekrece proteinů sekrečním aparátem *B. pertussis*

Vzorky byly odebrány z kultury *B. pertussis* o  $OD_{600}=1$  rostoucí ve 3 ml SS média (11,84 g L-glutamátu, 0,24 g L-prolinu, 2,5 g NaCl, 0,5 g  $KH_2PO_4$ , 0,2 g HCl, 0,1 g  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ , 0,0151 g  $CaCl_2$ , 1,5 g Tris-báze, 10 g kasaminokyseliny, 1 g cyklodextrinu, 4 g L-cysteinu, 1 g  $FeSO_4 \times 7 H_2O$ , 0,4 g niacinu, 40 g kyseliny askorbové, 15 g glutathionu v 1 l  $H_2O$ , filtrováno přes 0,22m filtr). Přímou z kultury byl odebrán kontrolní vzorek (50  $\mu$ l), naředěn 1:1 TU pufrům (Tris-HCl, pH 8, 8 M močovina) na finální koncentraci močoviny 4 M, a bylo stanoveno celkové množství CyaA pomocí enzymatické AC aktivity. Poté byl 1 ml kultury odstředěn (16000 g, 5 min, 25 °C) a 50  $\mu$ l supernatantu bylo smícháno s 50  $\mu$ l TU pufru. Pelet byl resuspendován ve 100  $\mu$ l T4U pufru (Tris-HCl, pH 8, 4 M močovina), inkubován 30 min při pokojové teplotě a odstředěn (16000 g, 5 min, 25 °C). Tento supernatant byl použit pro měření AC aktivity a odpovídá frakci CyaA proteinů, které jsou asociovány na buněčném povrchu (4 M oplach). Získaný pelet byl poté resuspendován ve 100  $\mu$ l TU pufru a tato frakce odpovídá nesekretovanému proteinu. Množství CyaA proteinů v jednotlivých frakcích (celkový protein v kultuře, protein sekretovaný do supernatantu, protein v oplachu 4 M močovinou a cytosolický protein) bylo určeno stanovením AC aktivity ve vzorcích (viz 3. 2. 3. 1).

## 4 CÍLE PRÁCE

- i. Příprava delečních konstruktů adenylátcyklázového toxinu (CyaA) nesoucí sérii delecí v RTX doméně
- ii. Charakterizace biologických aktivit delečních variant CyaA
- iii. Příprava mutantních kmenů *B. pertussis* nesoucí jednotlivé delece v RTX doméně adenylátcyklázového toxinu
- iv. Stanovení role RTX domény při sekreci CyaA proteinů pomocí sekrečního aparátu typu I (T1SS)

*Hypotéza diplomové práce:*

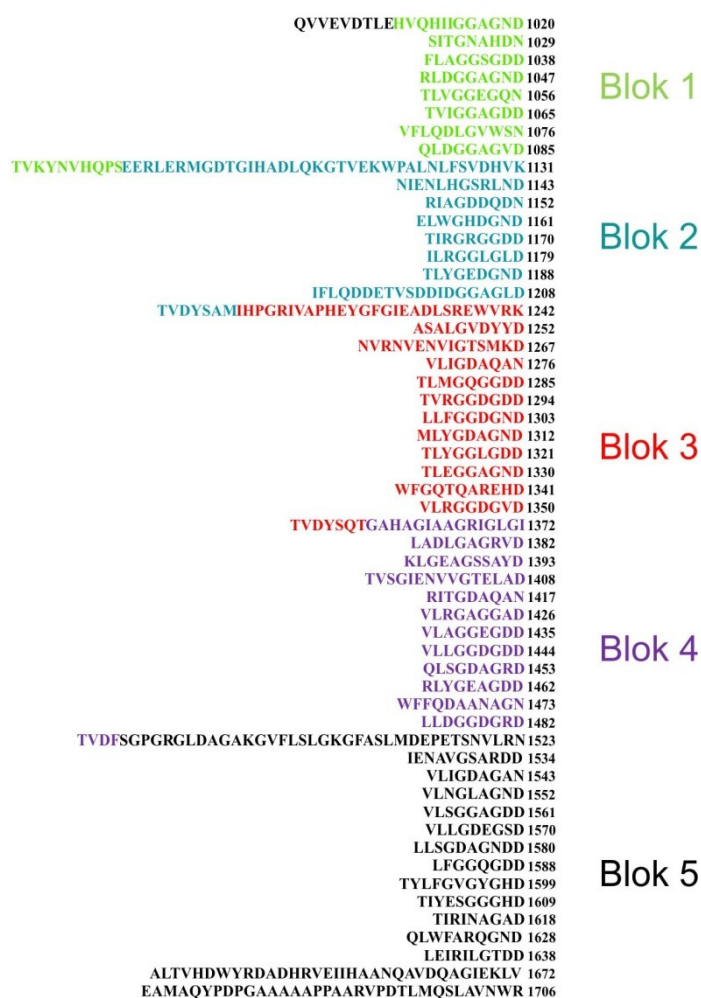
*RTX doména hraje klíčovou úlohu nejen v cytotoxické aktivitě adenylátcyklázového toxinu, ale i při sekreci toxinu přes cytoplazmatickou membránu bakterie *B. pertussis*. Biologická aktivita toxinu a jeho schopnost sekrece z buněk bude postupně snižována v závislosti na velikosti RTX domény.*

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Příprava CyaA proteinů nesoucích postupné delece v RTX doméně

Analýza primární sekvence RTX domény CyaA ukázala, že nonapeptidové repetice o konsenzuální sekvenci X-(L/I/V)-X-G-G-X-G-X-D jsou uspořádány do pěti bloků, které jsou odděleny různě dlouhými sekvencemi s neznámou strukturou a funkcí (Obr. 9).

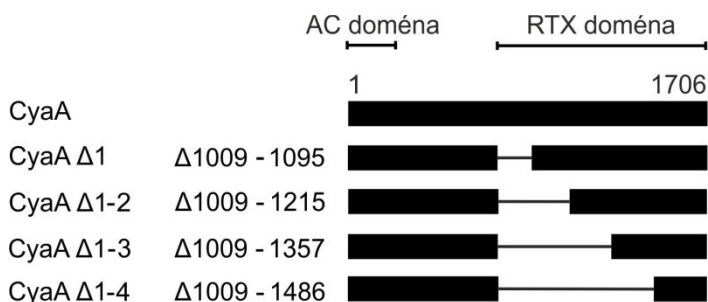
Konsenzuální motiv: X-(L/I/V)-X-G-G-X-G-X-D



**Obr 9 – Sekvence RTX domény CyaA uspořádané do pěti bloků.** Sekvence CyaA mezi aminokyselinami 1000 a 1706 byla uspořádána podle uvedeného konsenzuálního motivu (Osicka *et al.* 2000). Barvami jsou rozlišeny jednotlivé bloky ve smyslu terminologie práce.

Abych určila roli jednotlivých bloků na biologickou aktivitu CyaA, připravila jsem sérii delečních konstruktů (Obr. 10). U konstruktů CyaA  $\Delta$ 1 jsem deletovala blok 1 (delece aminokyselin v rozmezí 1009-1095), konstruktů CyaA  $\Delta$ 1-2 chybí bloky 1-2 (1009-1215), konstruktů CyaA  $\Delta$ 1-3 chybí bloky 1-3 (1009-1357) a konstruktů CyaA  $\Delta$ 1-4 chybí bloky 1-4

(1009-1486). Konstrukty jsem navrhla tak, aby mohla být zachována předpokládaná kompaktní struktura jednotlivých bloků. Všechny vytvořené konstrukty obsahovaly blok 5, ve kterém se nachází sbalovací centrum molekuly (Bumba, nepublikovaná data).

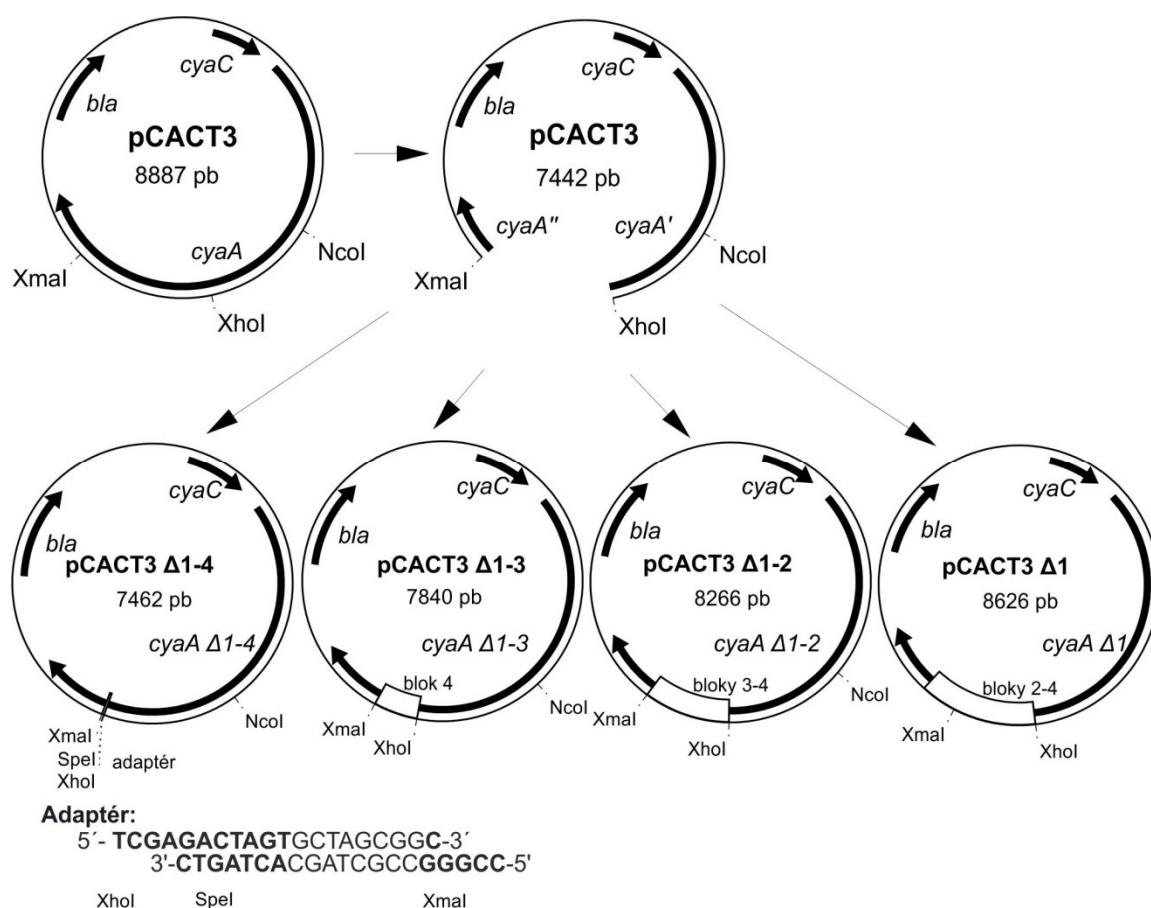


**Obr. 10 – Schéma delečních konstruktů CyaA.**

### 5.1.1 Příprava expresních vektorů nesoucích delece v RTX doméně CyaA

Na Obr. 11 je znázorněno schéma přípravy expresních vektorů, nesoucích delece v RTX doméně CyaA. Plazmid pCACT3 byl štěpen restrikními endonukleázami XhoI a XmaI, a tato místa byla propojena DNA adaptérem získaným spojením dvou syntetických a komplementárních oligonukleotidů se sekvencí 5'- TCGAGACTAGTGCTAGCGGC-3' a 5'- CCGGGCCGCTAGCACTAGTC-3'. Tento DNA adaptér nesl místa pro štěpení restrikními endonukleázami XhoI, SpeI a XmaI a jeho sekvence byla navržena tak, aby nebyl narušen čtecí rámec. Tímto způsobem byl vytvořen expresní vektor pCACT3 Δ1-4. Pro vytvoření vektorů pro expresi proteinů CyaA Δ1, CyaA Δ1-2 a CyaA Δ1-3 byly do plazmidu pCACT3 štěpeného restrikními endonukleázami XhoI a XmaI vloženy PCR produkty kódující RTX bloky, amplifikované z genu *cyaA* na plazmidu pCACT3. Do vektoru pCACT3 Δ1-3 byl vložen blok 4 (amplifikován za použití primerů F-RTXblok4 a R-XmaI), do vektoru pCACT3 Δ1-2 bloky 3-4 (primery F-RTXblok3 a R-XmaI) a do vektoru pCACT3 Δ1 bloky 2-4 (primery F-RTXblok2 a R-XmaI).

Jednotlivé delece byly ověřeny pomocí restrikního štěpení s následnou elektroforetickou analýzou DNA fragmentů. V případě plazmidu pCACT3 Δ1-4 byly k ověření použity restrikní endonukleázy SpeI a NcoI, v případě plazmidů pCACT3 Δ1, Δ1-2 a Δ1-3 bylo provedeno štěpení XmaI a XhoI. Vektory vykazovaly po štěpení na gelu žádané fragmenty a byly následně ověřeny sekvencí ve Středisku sekvenování DNA na Mikrobiologickém ústavu AVČR, v. v. i., v Praze 4 – Krči.



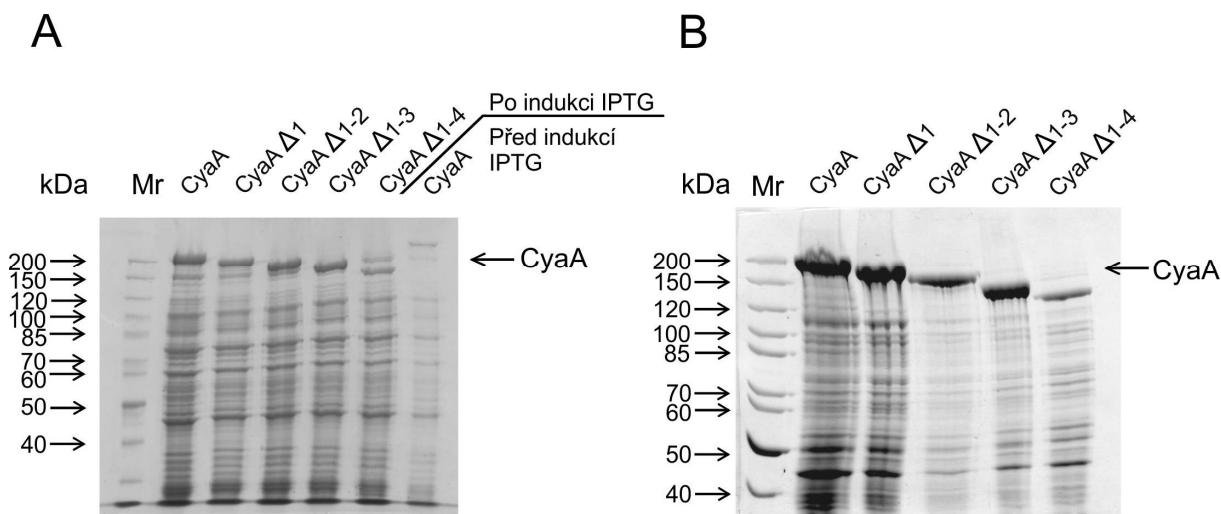
**Obr 11 Schéma přípravy expresních vektorů nesoucích delece v genu *cyaA*.** Plazmid pCACT3 byl štěpen endonukleázami XmaI a XhoI a následně do něj byly vloženy fragmenty RTX bloků namnožené pomocí PCR v případě vektorů pCACT3 Δ1, Δ1-2 a Δ1-3, či adaptér tvořený syntetickými oligonukleotidy v případě vektoru pCACT3 Δ1-4. *Bla* – rezistence k ampicilinu, *cyaC* – gen pro acyltransferázu aktivující CyaA.

### 5.1.2 Produkce CyaA proteinů v *E. coli* a jejich purifikace

Pro produkci rekombinantních CyaA proteinů byl použit plazmid pCACT3, resp. jeho mutované varianty popsané v předchozí kapitole. Expresní vektory byly transformovány do buněk *E. coli* XL-1 Blue. Produkce proteinů byla provedena v objemu 250 ml a jejich exprese byla indukována IPTG. Jak je patrné na Obr. 12A, elektroforetická analýza proteinů (SDS-PAGE) z buněčných lyzátů *E. coli* ukázala, že před indukcí IPTG chyběl na gelu proužek o velikosti odpovídající proteinu CyaA (200 kDa). Nicméně, po indukcii IPTG se objevily proužky o velikosti 200 kDa, resp. 190 až 140 kDa, odpovídající produkci divokého typu CyaA, resp. jeho mutovaných variant (Tab. 3).

CyaA proteiny byly po produkci extrahovány z inkluzních tělísek pomocí 8 M močoviny. Přítomnost a množství proteinů v močovinných extraktech byla ověřena pomocí

SDS-PAGE. Z Obr. 12B je patrné, že na gelu se nacházely proužky o velikostech odpovídajících proteinu CyaA (200 kDa) a jeho delečním variantám (190-140 kDa).



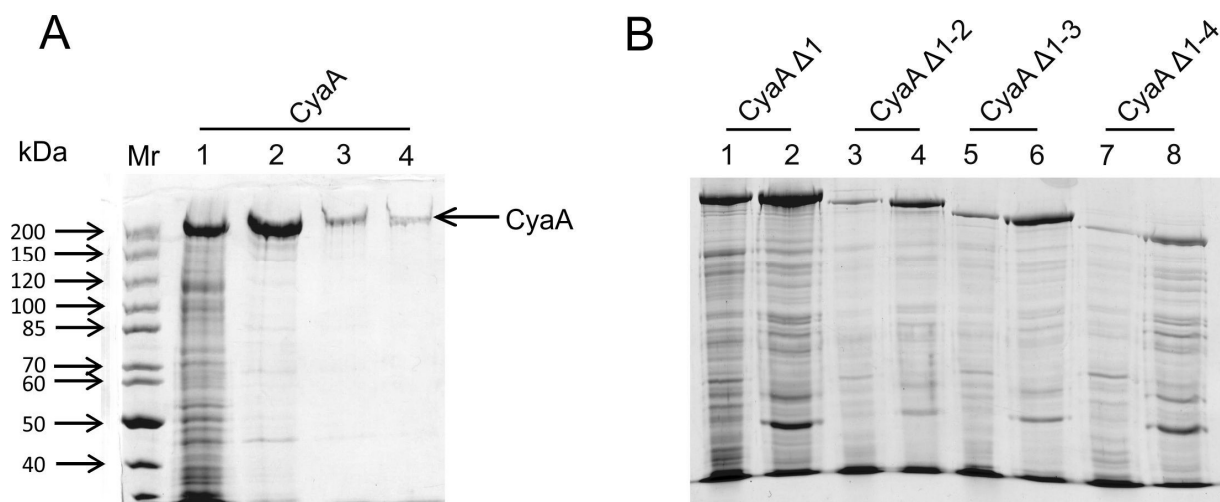
**Obr. 12 SDS-PAGE elektroforéza produkce rekombinantního CyaA a jeho delečních variant.** **A** – vzorky odebrané při produkci proteinů v 250 ml kultury před a 2 hodiny po indukci IPTG. Objem 1 ml tekuté kultury byl odstředěn a pelet byl lyzován 100  $\mu$ l TUS pufru (Tris-HCl 50 mM, močovina 8 M, SDS 1% [w/v], pH 8). **B** – vzorky odebrané po extrakci proteinů 8 M močovinou. Gely byly 7,5%. Vzorku bylo naneseno 15  $\mu$ l. Mr značí marker molekulových hmotností. Proteiny byly vizualizovány barvením Coomassie Blue

**Tab. 3 Přehled molekulových hmotností delečních variant proteinu CyaA.**

Název proteinu	Molekulová hmotnost [kDa]
CyaA	178
CyaA $\Delta$ 1	169
CyaA $\Delta$ 1-2	156
CyaA $\Delta$ 1-3	141
CyaA $\Delta$ 1-4	128

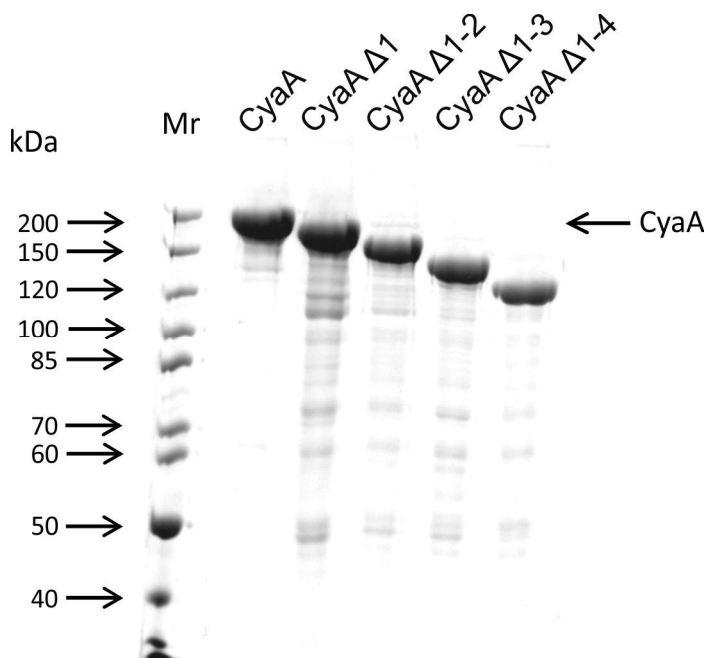
Standardní purifikační protokol CyaA zahrnuje kapalinovou chromatografií na DEAE iontoměničích a následnou purifikaci proteinu pomocí chromatografie s hydrofobní interakcí (Phenyl-Sepharose) (Karimova *et al.* 1998). Tento postup však nebyl vhodný pro purifikaci delečních mutant proteinu CyaA, jejichž afinita ke kladně nabitému DEAE iontoměničích je snížena z důvodu odstranění velkých částí záporně nabitých RTX domény. Byla tedy provedena dvoukroková chromatografie, jejímž prvním krokem byla chromatografie na DEAE iontoměničích a druhým krokem afinitní chromatografie na kalmodulin-agaróze.

Při chromatografii na DEAE-iontoměniči byl pro CyaA použit standardní protokol: kolona byla ekvilibrována pufrém „DEAE-B“ (se 120 mM NaCl), poté na ni byl nanesen močovinový extrakt a nenavázaná frakce proteinů byla vymyta pufrém „DEAE-B“. Proteiny, navázané na matici DEAE, byly eluovány pufrém „DEAE-E“, obsahujícím 200 mM NaCl. Při purifikaci mutovaných CyaA byla kolona ekvilibrována pufrém „DEAE-C“ (bez NaCl), poté na ni byl nanesen močovinový extrakt a nenavázaná frakce proteinů byla vymyta pufrém „DEAE-C“. Proteiny, navázané na matici DEAE, byly eluovány pufrém „DEAE-E“. Nenavázané i eluční frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE a eluční frakce byla následně použita pro druhý krok purifikace. Jak je patrné na Obr. 13A, nenavázaná frakce obsahuje protein o velikosti odpovídající CyaA (200 kDa), ale také proužky s menší molekulovou hmotností odpovídající nečistotám. Eluční frakce 2-4 ve druhém sloupečku obsahuje čistý protein CyaA o velikosti odpovídající 200 kDa. V následujících elučních frakcích (sloupečky 3 a 4) jsou proužky odpovídající proteinu CyaA slabě viditelné. Na Obr. 13B, který ukazuje frakce z purifikace mutovaných CyaA, se nacházejí na gelu postupně se snižující proužky odpovídající velikostem mutovaných CyaA, a to jak v nenavázané frakci (sloupečky 1, 3, 5 a 7), tak v eluční frakci (sloupečky 2, 4, 6 a 8). Množství obsažených nečistot je v těchto dvou frakcích srovnatelné.



**Obr. 13 Gely SDS-PAGE se vzorky z purifikace kapalinovou chromatografií na DEAE iontoměniči. A – purifikace CyaA. Močovinový extrakt byl nanesen na kolonu a nenavázaná frakce (sloupeček 1) byla sbírána. Eluce byla provedena postupně objemy 1,5 ml pufru „DEAE-E“ a frakce byly sbírány. Sloupeček 2 zobrazuje eluční frakce 2-4, sloupeček 3 frakce 5-6 a sloupeček 4 frakci 7. B – purifikace mutovaných CyaA. Močovinový extrakt byl nanesen na kolonu a nenavázaná frakce byla sbírána (1, 3, 5 a 7). Eluce byla provedena pufrém „DEAE-E“. Eluční frakce je zobrazena ve sloupečcích 2, 4, 6 a 8. Gely byly 7,5%. Vzorku bylo naneseno 15  $\mu$ l. Mr značí marker molekulových hmotností. Proteiny byly vizualizovány barvením Coomassie Blue**

Čistota proteinů, získaná chromatografií na DEAE iontoměničích, nebyla dostatečná, proto následoval druhý krok purifikace. Tím byla afinitní chromatografie na kalmodulin-agaróze, při které bylo využito vysoké afinity AC domény CyaA ke kalmodulinu (Ladant 1988). Kolona byla po nanesení eluční frakce z předchozího purifikačního kroku promyta pufrům „KA“, obsahujícím 1 mM CaCl<sub>2</sub>, který umožňuje navázání AC domény ke kalmodulinu, zatímco ostatní proteiny nejsou za těchto podmínek navázány. CyaA proteiny byly poté eluovány pufrům „KE“, obsahujícím EDTA. Jak je znázorněno na Obr. 14, SDS-PAGE analýza elučních frakcí ukázala, že všechny připravené proteiny měly dostatečnou čistotu a jejich molekulová hmotnost odpovídala teoretické hmotnosti proteinů. Koncentrace purifikovaných proteinů byly stanoveny metodou podle Bradfordové a jejich hodnota se pohybovala okolo 0,7 mg · ml<sup>-1</sup>.

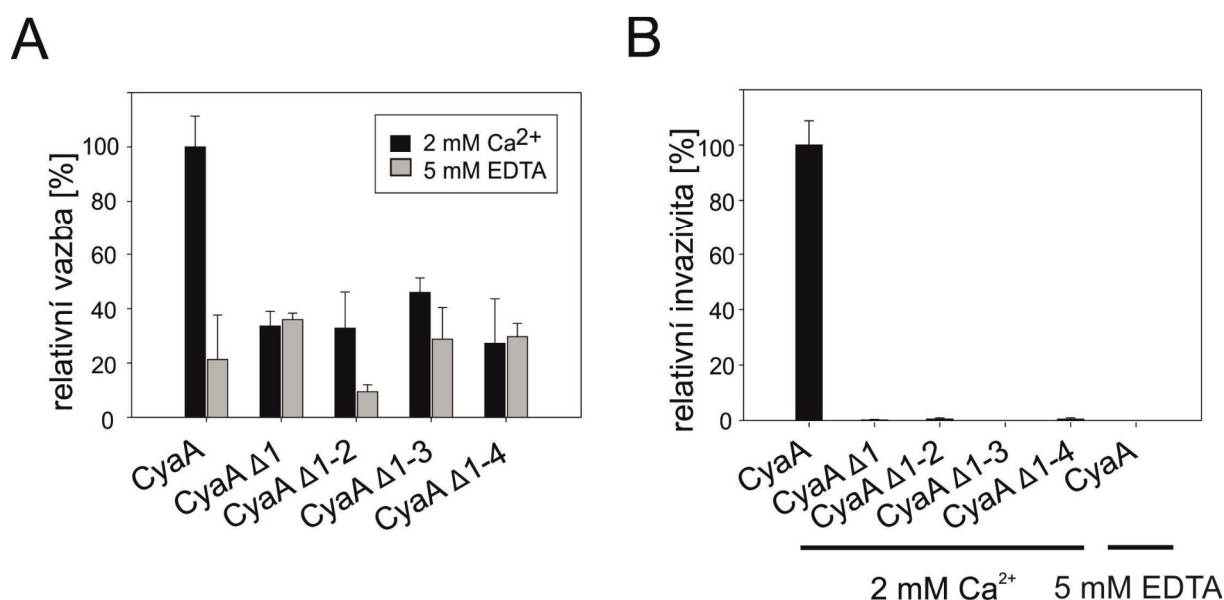


**Obr. 14 Gel SDS-PAGE se vzorkem z purifikace afinitní chromatografií na kalmodulin-agaróze.** Nanesený vzorek je z vybrané nejkoncentrovanější eluční frakce. Gel byl 7,5%. Vzorku bylo naneseno 15  $\mu$ l. Mr značí marker molekulových hmotností. Proteiny byly vizualizovány barvením Coomassie Blue.

## 5.2 Charakterizace biologických aktivit mutovaných CyaA na erythrocytech

CyaA se váže nejen na buňky obsahující specifický receptor CD11b/CD18, ale rovněž na některé jiné eukaryotické buňky, který tento receptor nemají, např. na erythrocyty. Vazba mutovaných CyaA na erythrocyty byla měřena jako enzymatická AC aktivita molekul toxinu,

který zůstal asociován s membránou erythrocytu po inkubaci s purifikovanými toxiny. Na Obr. 15A je znázorněna vazebná aktivita CyaA a jeho mutovaných forem v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  a 5 mM EDTA, která slouží jako negativní kontrola. Vazebná aktivita proteinů byla vyjádřena jako relativní vazba CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ; tj., vazebná aktivita CyaA v 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  byla rovna 100 %. Jak je patrné na Obr. 15A, vazebná aktivita mutovaných CyaA se pohybovala v rozmezí 10-45 %, a to jak v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , tak i v přítomnosti 5 mM EDTA. Všechny mutované CyaA proteiny vykazovaly srovnatelnou úroveň vazby. Z výsledku lze uzavřít, že není patrné žádné ovlivnění vazebné aktivity v závislosti na počtu ubraných RTX bloků v mutovaných CyaA proteinech. Tyto proteiny se částečně vážou na erythrocyty a tato vazba je nezávislá na přítomnosti vápenatých iontů.

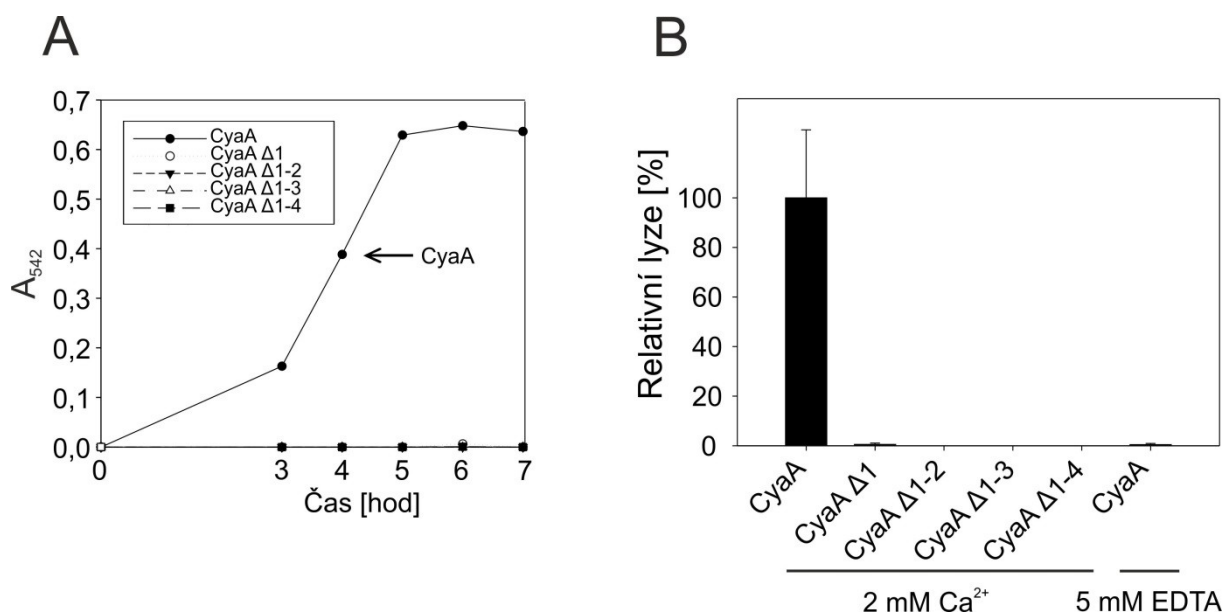


**Obr. 15 Stanovení aktivit variant proteinu CyaA na erythrocytech.** AC aktivity byly měřeny v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  resp. 5 mM EDTA. Aktivity CyaA v přítomnosti 5 mM EDTA a každého  $\Delta$ CyaA byly vztaženy k aktivitě CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  a vyjádřeny v procentech. Panel **A** zobrazuje vazebnou aktivitu. Množství  $5 \times 10^8$  buněk bylo inkubováno s 5 nM purifikovaným toxinem po dobu 30 min. Poté byla změřena AC aktivita molekul asociovaných s erythrocyty. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z nejméně 2 nezávislých pokusů provedených v duplikátu, resp. z 1 pokusu provedeného v duplikátu (u vzorků CyaA  $\Delta$ 1 5 mM EDTA, CyaA  $\Delta$ 1-3 5 mM EDTA a CyaA  $\Delta$ 1-4 5 mM EDTA). Panel **B** zobrazuje invazivní aktivitu. Množství  $5 \times 10^8$  buněk bylo inkubováno s 5 nM purifikovaným toxinem po dobu 30 min. Následovalo ošetření  $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  trypsinu a změření AC aktivit molekul, které nebyly trypsinem štěpeny tzn. byly translokovány do cytosolu přes cytoplazmatickou membránu. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z nejméně 2 nezávislých pokusů ( $n=2-3$ ) provedených v duplikátu, resp.  $n=1$  (u vzorku CyaA 5 mM EDTA).

CyaA je schopen translokovat svou enzymatickou AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do erythrocytů (Rogel *et al.* 1991), k čemuž bezpodmínečně vyžaduje  $\text{Ca}^{2+}$  ionty v milimolárních (mM) koncentracích (Rose *et al.* 1995). Invazivní aktivita CyaA byla měřena

jako AC aktivita (viz 3.2.3.1.) molekul toxinu translokovaných přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu erytrocytů po jejich inkubaci s purifikovanými toxiny a následném proteolytickém štěpení mimobuněčných proteinů proteázou, trypsinem. Na Obr. 15B je patrné, že invazivní aktivita CyaA v přítomnosti 5 mM EDTA je zanedbatelná, stejně tak jako invazivní aktivity všech delečních mutant CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Z těchto dat vyplývá, že CyaA proteiny nesoucí postupné delece v RTX doméně nejsou schopny translokovat AC doménu do cytosolu erytrocytů přes cytoplazmatickou membránu.

Erytrocyty jsou dále výborným systémem pro měření hemolytické aktivity toxinu. Ta dává informaci o schopnosti toxinu tvořit v membránách erytrocytů póry a způsobovat tak jejich koloidně osmotickou lyzi. Hemolytická aktivita byla měřena spektrofotometricky jako absorbance hemoglobinu uvolněného z erytrocytů při 541 nm. Močovinové extrakty, obohacené o CyaA, vykazovaly mnohonásobně větší schopnost lyzovat erytrocyty, než purifikovaný CyaA; z tohoto důvodu byly pro měření hemolytické aktivity použity močovinové extrakty. Koncentrace CyaA proteinů v močovinových extraktech byla stanovena na základě jejich AC aktivity. Na Obr. 16A je zobrazen průběh lyze erytrocytů v čase pro CyaA a jeho deleční varianty. Průběh lyze erytrocytů v čase pro CyaA byl charakterizován exponenciálně se zvyšující absorbancí uvolněného hemoglobinu až do páté hodiny inkubace, ve které již došlo k maximální lyzi erytrocytů toxinem. Na rozdíl od toho u delečních konstruktů CyaA nebylo patrné žádné uvolňování hemoglobinu z buněk dokonce ani v sedmé hodině inkubace. Na Obr. 16B je zobrazena relativní hemolytická aktivita CyaA a jeho delečních variant v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  a 5 mM EDTA. Jak je dále patrné na Obr. 16B, hemolytická aktivita CyaA v přítomnosti 5 mM EDTA byla zanedbatelná, stejně tak jako hemolytické aktivity všech mutovaných proteinů CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Z těchto dat vyplývá, že deleční konstrukty CyaA nejsou hemolyticky aktivní.



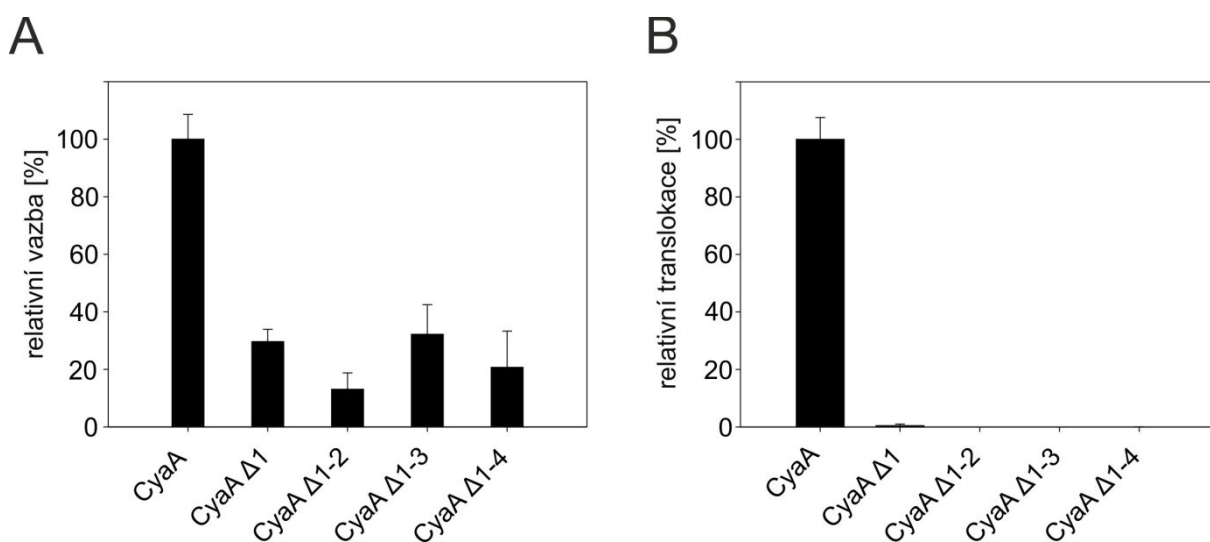
**Obr. 16 Stanovení hemolytické aktivity variant CyaA na erythrocytech.** Absorbance hemoglobinu uvolněného z lyzovaných buněk A<sub>541</sub> byla měřena v hodinových intervalech. Množství  $5 \times 10^8$  buněk bylo inkubováno s močovinnými extrakty CyaA a mutovaných CyaA v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup> resp. 5 mM EDTA. Panel **A** zobrazuje průběh lyze v čase inkubace 0. - 7. hod při jednom reprezentativním pokusu. Od hodnot byla odečtena absorbance slepého pokusu. Panel **B** zobrazuje relativní lyzi erythrocytů. Hodnoty A<sub>541</sub> mutovaných CyaA a CyaA v přítomnosti 5 mM EDTA po 4 hodinách inkubace byly vztaženy k hodnotě A<sub>541</sub> CyaA v přítomnosti 2mM Ca<sup>2+</sup>. Ode všech hodnot byla odečtena absorbance slepého pokusu. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze dvou nezávislých pokusů.

### 5.3 Charakterizace biologických aktivit mutovaných CyaA na buňkách nesoucích specifický receptor CD11b/CD18

Receptor CD11b/CD18 je specifickým receptorem pro CyaA na buněčném povrchu buněk imunitního systému, jako např. monocytů, makrofágů či neutrofilů (Guermonprez *et al.* 2001). Jako model pro stanovení biologických aktivit toxinu na buňkách s receptorem byla použita myši makrofágová linie J774A.1. Vazba na povrch J774A.1 buněk byla měřena jako enzymatická AC aktivita molekul toxinu, které zůstávají asociovány s membránou makrofágu po inkubaci s purifikovanými toxiny. Na Obr. 17A je znázorněna relativní vazebná aktivita CyaA a jeho mutovaných forem po inkubaci v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Je patrné, že všechny mutované CyaA proteiny vykazují srovnatelnou úroveň vazby, která se pohybovala v rozmezí 10-30 % oproti divokému typu. Tato data naznačují, že mutované formy CyaA nejsou schopny specificky interagovat s povrchovým receptorem CD11b/CD18.

Schopnost translokace AC domény přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu makrofágů byla měřena jako nárůst vnitrobuněčné koncentrace cAMP, způsobený

enzymaticky aktivní AC doménou translokovanou do cytosolu J774A.1 buněk. Hladina cAMP byla určena metodou ELISA. Z Obr. 17B je patrné, že translokace AC domény do makrofágů u mutovaných CyaA je zanedbatelná. Z těchto dat vyplývá, že CyaA proteiny, nesoucí postupné delece v RTX doméně, nejsou schopny zvyšovat hladinu cytosolického cAMP a tudíž nejsou schopny translokovat svoji AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu buněk.



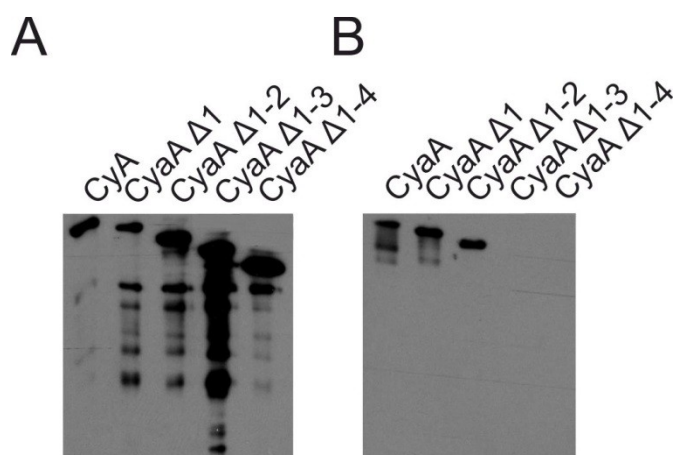
**Obr. 17 Stanovení aktivit delečních mutant CyaA na J774A.1 myši makrofágové linii.**

Panel **A** zobrazuje vazebnou aktivitu. Inkubace probíhala v DMEM médiu obsahujícím 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Množství  $1 \times 10^6$  buněk bylo inkubováno s 5 nM koncentrací purifikovaného toxinu po dobu 30 min. Poté byla změřena AC aktivita molekul toxinu asociovaných s membránou makrofágů. Aktivita každého  $\Delta\text{CyaA}$  byla vztažena k aktivitě CyaA a vyjádřena v procentech. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z nejméně dvou ( $n=2-4$ ) nezávislých pokusů provedených v duplikátech. Panel **B** zobrazuje translokaci AC domény do makrofágů. Množství  $2 \times 10^5$  buněk v DMEM médiu bylo inkubováno s koncentracemi purifikovaného toxinu 0,5 nM, 0,375 nM, 0,25 nM a 0,125 nM po dobu 30 min. Hladina vnitrobuněčného cAMP vytvořeného po inkubaci byla určena metodou ELISA. Relativní translokace byla vypočtena vztažením vnitrobuněčné koncentrace cAMP delečních mutant k hodnotě  $c_{\text{cAMP}}$  u CyaA a vyjádřena v procentech. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty ze dvou nezávislých pokusů provedených v duplikátech.

#### 5.4 Mapování antigenního epitopu pro protilátku 9D4

Protilátka 3D1 je myší monoklonální protilátka proti AC doméně CyaA a její epitop se nachází mezi aminokyselinami 385-399 (Lee *et al.* 1999). Protilátka 9D4 je také myší monoklonální protilátka, která rozpoznává RTX doménu CyaA ale i RTX doménu ostatních RTX toxinů. Nicméně, její vazebné místo na RTX doméně CyaA není známo. K mapování epitopu 9D4 protilátky byly použity mutované CyaA proteiny nesoucí postupné delece v RTX doméně. Purifikované proteiny (viz Kap. 5.1.2) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a přeneseny na nitrocelulosoovou membránu technikou „Western blotting“. Jednotlivé proteiny

byly poté detekovány na membráně pomocí 3D1 a 9D4 protilátky. Jak je patrné na Obr. 18A, protilátka 3D1 rozpoznala všech pět variant CyaA, které tvoří na membráně postupně se snižující proužky odpovídající klesajícím molekulovým velikostem proteinů. Na Obr. 18B je patrné, že protilátka 9D4 rozpoznala proteiny CyaA, CyaA  $\Delta$ 1 a CyaA  $\Delta$ 1-2, ale nebyly již detekovány proteiny CyaA  $\Delta$ 1-3 a CyaA  $\Delta$ 1-4. Z tohoto výsledku lze uzavřít, že antigenní epitop protilátky 9D4 se nachází v rámci RTX bloku 3.

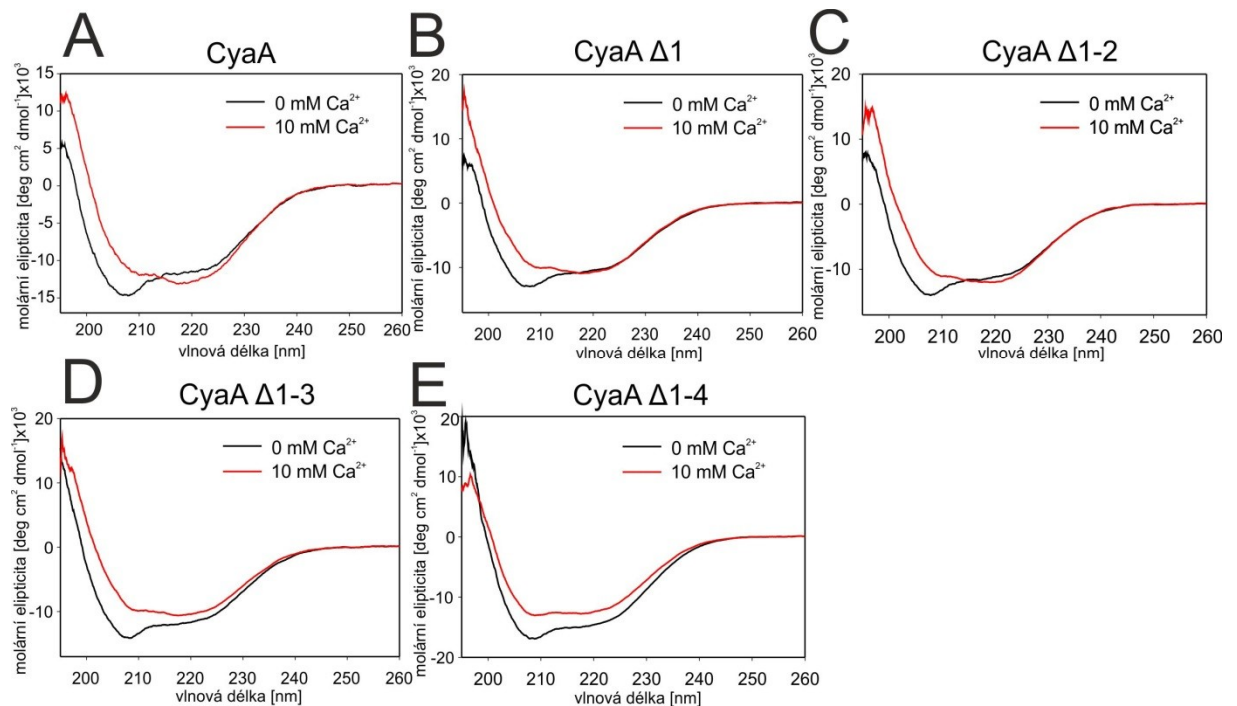


**Obr. 18 Imunochemická detekce CyaA proteinů pomocí protilátky 3D1 (panel A) nebo 9D4 (panel B).** Purifikované proteiny byly rozděleny v 7,5% polyakrylamidovém gelu, přeneseny metodou „Western blotting“ na nitrocelulóзовou membránu a detekovány protilátkami.

## 5.5 Analýza sekundární struktury CyaA a mutovaných CyaA pomocí cirkulárního dichroismu

RTX doména CyaA je v nepřítomnosti vápenatých iontů nestruturovaná a po vazbě vápenatých iontů se sbaluje do specifické struktury  $\beta$ -šroubovice (kap. 2. 2. 2) (Rose *et al.* 1995; Chenal *et al.* 2009). Abych zjistila, zda je RTX doména sbalována u delečních mutant, použila jsem metodu spektroskopie cirkulárního dichroismu (CD), která udává informaci o zastoupení sekundárních struktur v proteinech. Nejdříve byla změřena CD spektra purifikovaných proteinů v nepřítomnosti vápenatých iontů (Obr. 19, černé linky). Z Obr. 19 A-E je patrné, že spektra divokého typu toxinu a mutovaných proteinů v nepřítomnosti vápenatých iontů jsou charakterizována negativním pásem u 208 nm a negativním raménkem okolo 220 nm. Naproti tomu, CD spektra proteinů CyaA (Obr. 19A), CyaA  $\Delta$ 1 (Obr. 19B) a CyaA  $\Delta$ 1-2 (Obr. 19C) v přítomnosti 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (červené linky) jsou charakterizována negativním pásem okolo 217 nm a negativním raménkem okolo 208 nm (červené linky). Nicméně, spektra CyaA  $\Delta$ 1-3 (Obr. 19D) a CyaA  $\Delta$ 1-4 (Obr. 19E) jsou charakterizována spíše dvěma negativními pásy při 210 a 220 nm. Na spektrech CyaA  $\Delta$ 1-4 (Obr. 19E) je navíc

na rozdíl od ostatních spekter snížení molární elipticity při 196 nm v přítomnosti 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Vzhledem k tomu, že CyaA má mnoho predikovaných  $\alpha$ -šroubovic mimo RTX doménu a  $\beta$ -šroubovicovou strukturu v oblasti RTX domény, změna spektra po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  naznačuje sbalování RTX domény do  $\beta$ -šroubovice. Podobná, i když méně výrazná změna spektra byla pozorována po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  i u mutovaných CyaA. Pouze u proteinu CyaA  $\Delta 1-4$ , který téměř postrádá RTX doménu, byl pozorován minimální posun spekter směrem ke spektru charakteristickému pro  $\beta$  strukturu.



**Obr. 19** CD spektra CyaA (A), CyaA  $\Delta 1$  (B), CyaA  $\Delta 1-2$  (C), CyaA  $\Delta 1-3$  (D) a CyaA  $\Delta 1-4$  (E). Zobrazena je molární elipticita  $\theta$  v jednotkách ( $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1} \times 10^3$ ), měřená spektropolarimetrem Jasco J-815 na proteinech o koncentraci  $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  purifikovaných dvoukrokovou chromatografií. Spektra byla změřena ve vlnových délkách 195-260 nm při pokojové teplotě v křemenné kyvetě o optické dráze 1 mm. Černé spektrum zobrazuje protein v nepřítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  a červené spektrum protein v přítomnosti 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 5.6 Role RTX domény při sekreci proteinu CyaA z *B. pertussis*

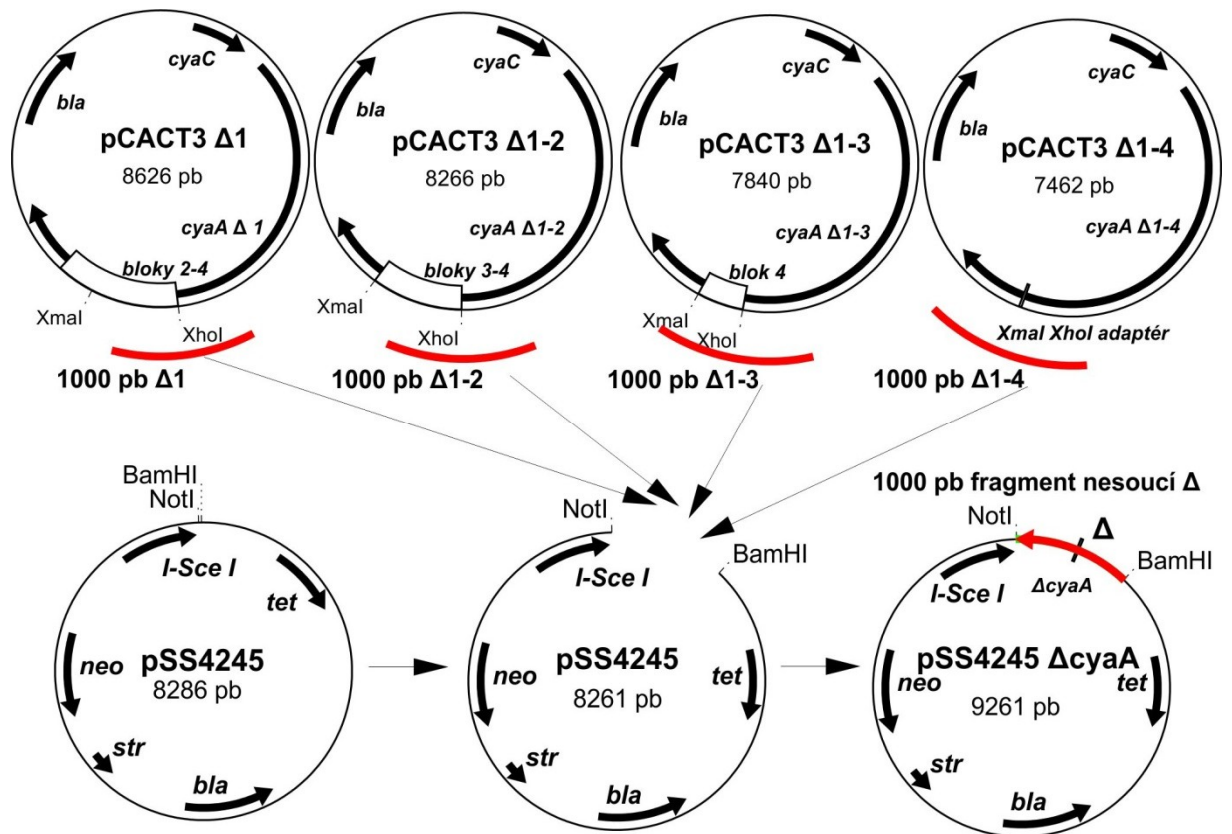
Protein CyaA je sekretován bakteriálním sekrečním aparátem typu I (T1SS). Aby byly proteiny sekretovány aparátem, musí zůstat v nesbaleném stavu. Proteiny se následně sbalují vlivem vápenatých iontů, kterých je vně buňky více ( $>2 \text{ mM } \text{Ca}^{2+}$ ) než v cytosolu ( $<100 \text{ nM } \text{Ca}^{2+}$ ). Umístění sekrečního signálu na C-konci proteinu a sbalování C-koncové RTX domény v médiu vlivem vápenatých iontů naznačuje, že sekrece proteinů začíná jejich C-koncovou částí, která se také nejdříve objeví vně buňky při výstupu z aparátu. RTX doména CyaA je

navíc sbalována ve směru od C- k N-konci (Bumba, nepublikovaná data). Pro studium role RTX domény při sekreci toxinu byly použity výše představené deleční konstrukty CyaA.

### 5.6.1 Příprava mutantních kmenů *B. pertussis*

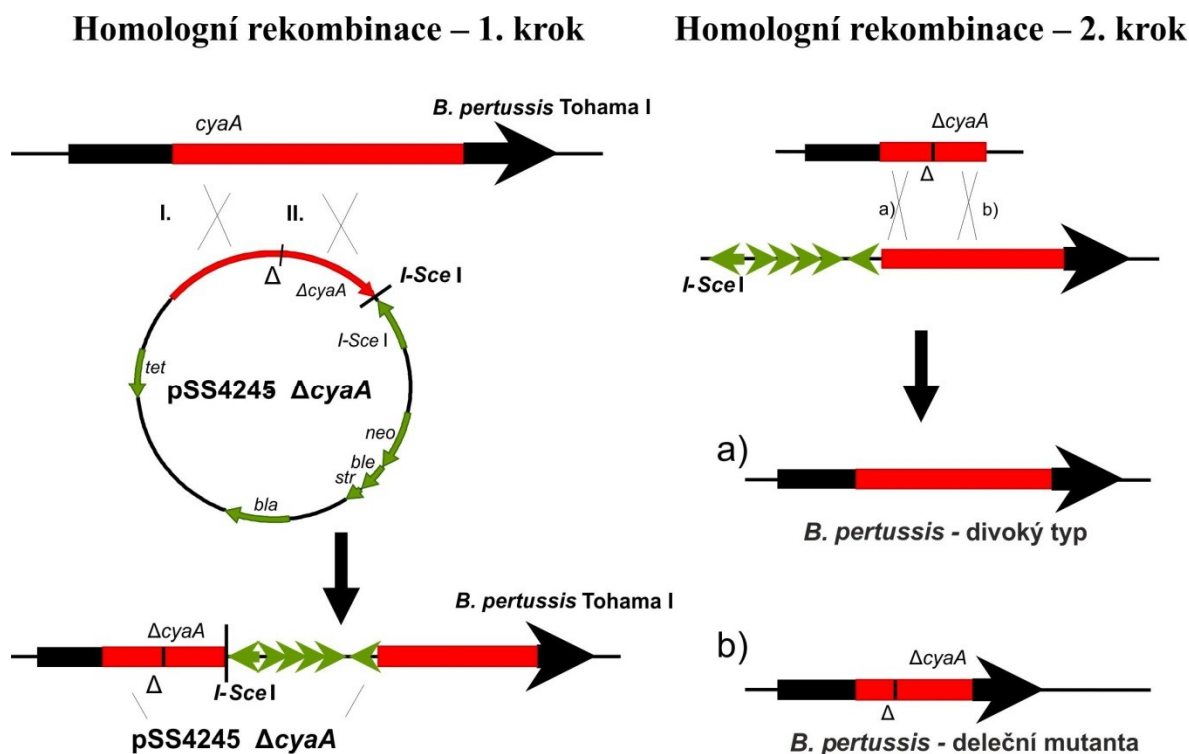
Mutantní kmeny *B. pertussis* byly připraveny za využití plazmidu pSS4245, což je vektor pro alelickou výměnu u *B. pertussis* (Inatsuka *et al.* 2010). Tento plazmid kóduje speciální restriční endonukleázu I-SceI, a zároveň obsahuje zásahové místo pro tento enzym. Gen *I-Sce I* je kontrolován BvgA/S systémem. Plazmid dále obsahuje klonovací místo, do kterého jsou vkládány úseky genů *B. pertussis*, dlouhé 1000 pb a nesoucí požadovanou mutaci. Po přenosu konjugací do *B. pertussis* dochází k integraci plazmidu pSS4245 do chromozomální DNA pomocí antibiotikové selekce (1. krok homologní rekombinace, viz Obr. 21) a k následné alelické výměně za mutovanou variantu genu, která je spouštěna při Bvg<sup>+</sup> podmínkách (2. krok homologní rekombinace, Obr. 21).

Nejdříve byly připraveny plazmidy pSS4245 nesoucí požadované deleční mutace v genu *cyaA* (Obr. 20). Plazmid pSS4245 byl štěpen endonukleázami NotI a BamHI a následně do něj byly vloženy fragmenty mutovaných *cyaA* genů, dlouhé 1000 párů bazí. Tyto fragmenty byly amplifikovány pomocí PCR z expresních vektorů pCACT3 Δ1 (primery F-BP-Δ1 a R-BP-Δ1), pCACT3 Δ1-2 (primery F-BP-Δ1-2 a R-BP-Δ1-2), pCACT3 Δ1-3 (primery F-BP-Δ1-3 a R-BP-Δ1-3) a pCACT3 Δ1-4 (primery F-BP-Δ1-4 a R-BP-Δ1-4) viz sekvence primerů v Tab. 1. Vložení 1000 pb dlouhého fragmentu do připravených plazmidů „pSS4245 Δ*cyaA*“ bylo ověřeno kontrolním štěpením enzymy NotI a BamHI a sekvenací ve Středisku sekvenování na MBÚ AVČR.



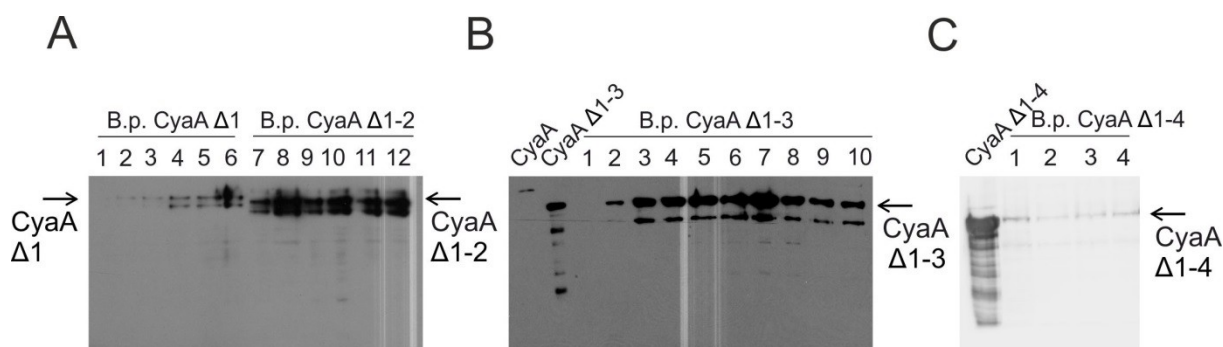
**Obr 20** Schéma přípravy alelických vektorů pSS4245 nesoucích delece v genu *cyaA* (pSS4245  $\Delta cyaA$ ). Plazmid pSS4245 byl štěpen endonukleázami NotI a BamHI a následně do něj byly vloženy 1000 pb dlouhé fragmenty *cyaA* genů s delecemi, namnožené pomocí PCR z expresních vektorů pCACT3  $\Delta 1$ ,  $\Delta 1-2$ ,  $\Delta 1-3$  a  $\Delta 1-4$ . *Bla* – rezistence k ampicilinu, *cyaC* – gen pro acytransferázu aktivující CyaA, *I-Sce I* – gen pro restriční endonukleázu štěpící uvnitř plazmidu pSS4245, *neo* – rezistence k neomycinu a ke kanamycinu, *tet* – rezistence k tetracyklinu, *str* – rezistence ke streptomycinu.

Vytvořené konstrukty, nesoucí delece  $\Delta 1$ ,  $\Delta 1-2$ ,  $\Delta 1-3$ , resp.  $\Delta 1-4$  v genu *cyaA*, byly transformovány do bakterií *E. coli* SM10  $\lambda$  pir a dopraveny do buněk *B. pertussis* pomocí bakteriální konjugace. Vzhledem k tomu, že jednotlivé mutované CyaA proteiny nejeví hemolytickou aktivitu (Obr. 16), mutantní kmeny *B. pertussis* nesoucí požadované mutace byly selektovány jako nehemolytické kolonie na miskách získaných při druhém kroku homologní rekombinace (Obr. 21).



**Obr. 21** Dva kroky homologní rekombinace plasmidu pSS4245, nesoucího deleční mutaci v genu pro *cyaA* (pSS4245 Δ*cyaA*). Mutantní pSS4245 plasmidy byly přeneseny konjugací z bakterií *E. coli* SM10 λ pir do *B. pertussis* Tohama I. Přidavek antibiotik do tuhého média podpořil 1. krok homologní rekombinace plasmidu do chromozomu *B. pertussis* přes dva homologní úseky, ohraničující vytvořenou delecí. Ke 2. kroku homologní rekombinace - vyštěpení plasmidu z chromozomu - došlo po přetření kolonií na misky neobsahující MgSO<sub>4</sub> ani antibiotika. Takto byly vytvořeny kolonie kódující divoký typ CyaA (a) a deleční mutanty (b).

Přítomnost požadované mutace v genomu nehemolytických kolonií byla dále ověřena pomocí PCR na bakteriálních koloniích s využitím primerů použitých výše k amplifikaci 1000-pb úseku genů, a následnou sekvenací PCR produktů. Celistvost CyaA a delečních variant CyaA, produkovaných koloniemi, byla dále ověřena pomocí imunochemické detekce proteinu na membráně. Jednotlivé kolonie byly individuálně kultivovány v SS médiu, a směs buněčných proteinů byla rozdělena pomocí SDS-PAGE. Proteiny byly přeneseny na membránu a detekovány pomocí 3D1 protilátky. Jak je patrné na Obr. 22, většina testovaných kolonií produkovala CyaA proteiny požadovaných délek (viz purifikované proteiny nanesené na gel jako vnitřní standard). Zároveň byl u kolonií *B.p. CyaA Δ1*, *B.p. CyaA Δ1-2* (Obr. 22A) a *B.p. CyaA Δ1-3* (Obr. 22B) patrný degradační produkt o nižší molekulové hmotnosti. Pravděpodobně docházelo k vnitrobuněčné degradaci mutovaných CyaA proteinů, která mohla být způsobena zkrácením jejich RTX domény. Z těchto dat vyplývá, že postupné delece v RTX doméně CyaA byly úspěšně zavedeny do chromozomu *B. pertussis* a bakterie produkovala požadované proteiny.



**Obr. 22 Imunochemická detekce CyaA proteinů z kolonií *B. pertussis* pomocí protilátky 3D1.** Jednotlivé mutantní kolonie *B. pertussis*, kultivované v SS médiu do dosažení OD=1, byly odstředěny (16000 × g, 5 min, 25 °C) a pelety byly lyzovány v TUS pufru (Tris-HCl 50 mM, močovina 8 M, SDS 1% [w/v], pH 8). Lyzáty byly naneseny na 7,5% polyakrylamidový gel a přeneseny metodou „Western blotting“ na nitrocelulóзовou membránu. **A** – sloupečky 1-6 – kolonie *B.p. CyaA Δ1*, sloupečky 7-12 – kolonie *B.p. CyaA Δ1-2*. **B** – zleva purifikované proteiny CyaA a CyaA Δ1-3 sloužící jako standardy, sloupečky 1 – 10 - kolonie *B.p. CyaA Δ1-3*. **C** – zleva purifikovaný CyaA Δ1-4, sloupečky 1-4 – kolonie *B.p. CyaA Δ1-4*.

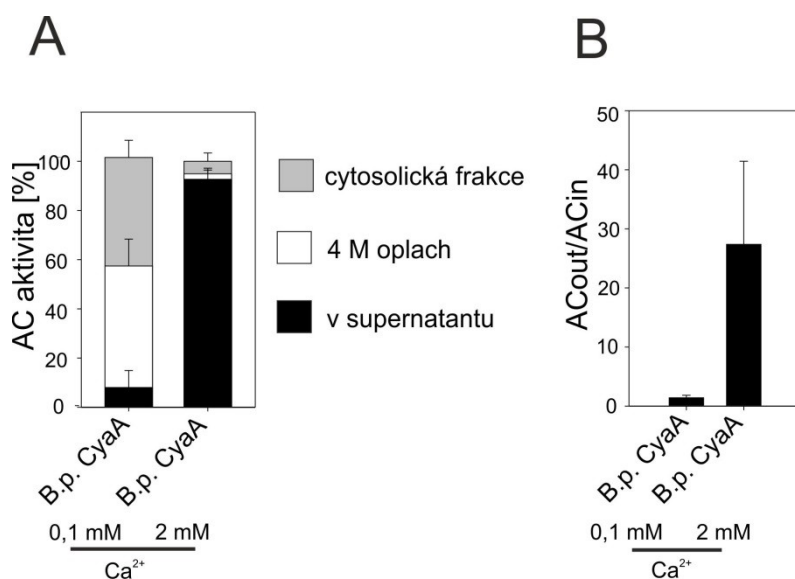
### 5.6.2 Sekrece mutovaných CyaA v *B. pertussis*

SS médium pro kultivaci *B. pertussis* obsahuje 0,1 mM koncentraci vápenatých iontů. Za těchto podmínek zůstává většina sekretovaného CyaA asociována s buněčným povrchem (Zaretzky *et al.* 2002). Navíc koncentrace vápenatých iontů v SS médiu (0,1 mM CaCl<sub>2</sub>) neumožňuje sbalování RTX domény, která probíhá ve vyšších koncentracích (od 1 mM CaCl<sub>2</sub>). Z tohoto důvodu byly provedeny sekreční experimenty v SS médiu samotném a v SS médiu obohaceném o 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Buněčná kultura byla rozdělena na tři frakce následujícím způsobem: kultura *B. pertussis* v SS médiu byla odstředěna a supernatant reprezentuje frakci CyaA sekretovaného do média (frakce „v supernatantu“). Buněčný pelet byl opláchnut pufrům T4U, obsahujícím 4 M močovinu, která sice nezpůsobí buněčnou lyzi, ale je schopna extrahovat proteiny na buněčném povrchu. Tato suspenze byla následně odstředěna a supernatant („4 M oplach“) reprezentuje frakci sekretovaných molekul navázaných na povrch buňky, zatímco pelet obsahuje proteiny z cytosolu bakterie („cytosolická frakce“). Množství molekul protein CyaA v jednotlivých frakcích bylo zjištěno měřením jejich AC aktivity (Kap. 3. 2. 3. 1.). Tabulka 4 ukazuje hodnoty celkových AC aktivit v 1 ml kultury přímo odebrané při různých experimentech, které značně kolísají. Jediným pozorovatelným trendem je výrazně nižší AC aktivita ve všech vzorcích z kultury *B.p. CyaA Δ1-4*. Z tohoto důvodu byly srovnávány relativní hodnoty AC aktivit v jednotlivých frakcích.

**Tab. 4 Celková AC aktivita v ml kultury v pěti nezávislých experimentech**

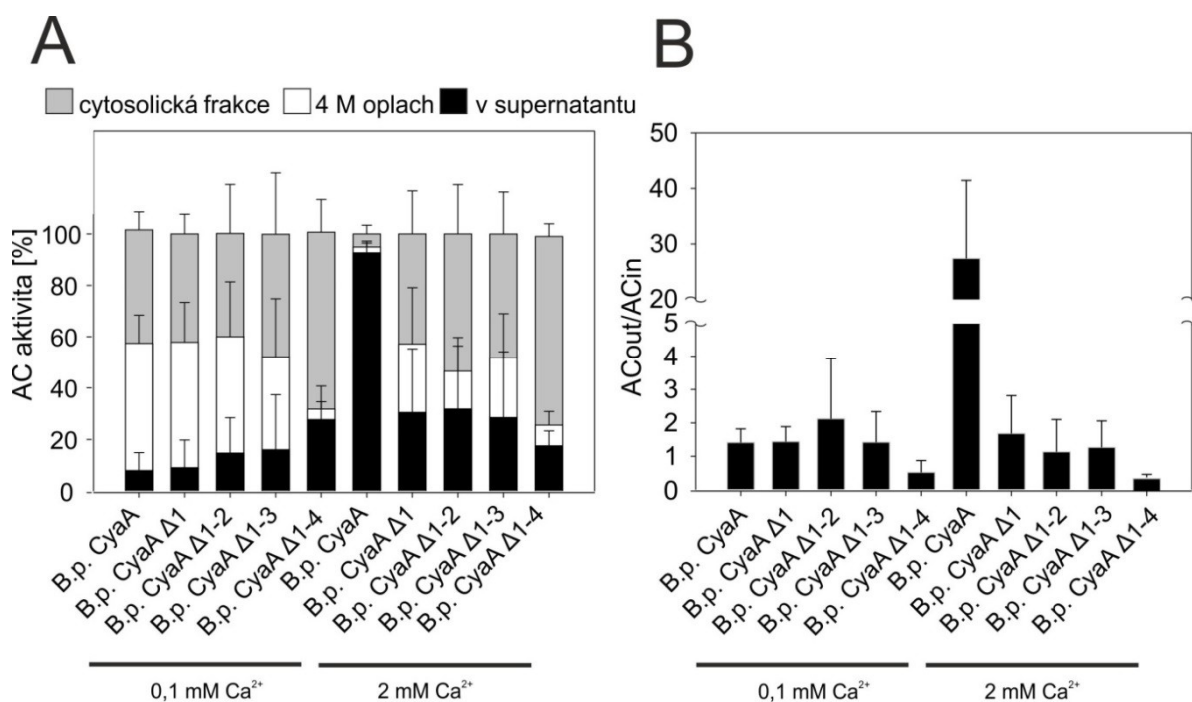
	AC aktivita v experimentu [ $\text{mU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]									
	0,1 mM $\text{Ca}^{2+}$					2 mM $\text{Ca}^{2+}$				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>B.p. CyaA</i>	36,4	8,9	13,5	7,3	2,5	71,5	17,3	49,1	28,7	3,3
<i>B.p. CyaA <math>\Delta 1</math></i>	35,5	12,0	15,9	5,1	2,2	8,5	17,1	14,7	1,0	0,7
<i>B.p. CyaA <math>\Delta 1-2</math></i>	26,8	9,9	9,5	5,2	1,5	10,7	28,2	7,9	1,2	0,5
<i>B.p. CyaA <math>\Delta 1-3</math></i>	14,0	-	9,8	2,1	1,5	11,0	-	4,1	0,7	3,6
<i>B.p. CyaA <math>\Delta 1-4</math></i>	1,6	2,6	2,2	0,5	0,3	1,4	5,2	1,2	0,3	0,2

Na Obr. 23A je zobrazeno relativní zastoupení AC aktivit v cytosolické frakci, ve 4 M oplachu a v supernatantu při sekreci divokého typu toxinu v *B. pertussis*. V SS médiu s obsahem 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bylo zhruba 50 % molekul toxinu sekretováno ven z buňky, nicméně většina CyaA molekul byla asociována s buněčným povrchem bakterie. Naproti tomu, v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  bylo přes 90 % molekul toxinu nalezeno v supernatantu a pouze nepatrné množství CyaA bylo detekováno v cytosolické frakci či ve 4 M oplachu. Obr. 23B znázorňuje efektivitu sekrece, vypočítanou jako poměr AC aktivit sekretovaných molekul (tj. součet ve 4 M oplachu a v supernatantu) a AC aktivity v cytosolické frakci. Efektivita sekrece divokého typu toxinu v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  odpovídá asi třicetinásobku jeho efektivity v přítomnosti 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Z těchto dat vyplývá, že vápenaté ionty indukují sekreci CyaA do supernatantu.



**Obr. 23 Sekrece CyaA v *B. pertussis*.** **A** – relativní distribuce AC aktivity ve frakcích. Vzorky byly odebrány z kultury bakterií v SS médiu při OD=1. Cytosolická frakce (šedý sloupec) reprezentuje vnitrobuněčné molekuly uvolněné z pelety TU pufrům s 8 M močovinou. Frakce 4 M oplach (bílý sloupec) reprezentuje molekuly asociované s buňkami a získané oplachem buněk T4U pufrům s 4 M močovinou. Frakce v supernatantu (černý sloupec) reprezentuje sekretované molekuly nacházející se po odstředění v supernatantu. Množství CyaA ve frakcích bylo stanoveno jako jejich AC aktivity. Součet AC aktivit ve třech frakcích byl považován za 100 %. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z n=13 nezávislých sekrečních experimentů. **B** – efektivita sekrece CyaA, vyjádřená jako poměr AC<sub>out</sub>/AC<sub>in</sub>. AC<sub>out</sub> je aritmetickým součtem AC aktivity v supernatantu a ve frakci v 4 M oplachu. AC<sub>in</sub> je AC aktivity v cytosolické frakci. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z n=16 nezávislých experimentů.

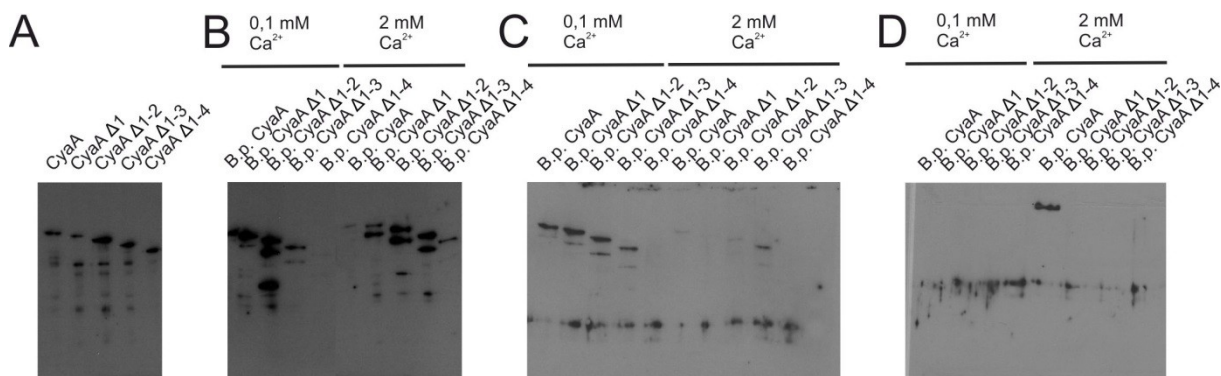
Na Obr. 24 jsou zobrazeny výsledky sekrečních experimentů provedených s divokým typem a jeho mutovanými variantami. Relativní distribuce AC aktivit (obr. 24A) ukazuje, že v přítomnosti 0,1 mM Ca<sup>2+</sup> byly CyaA proteiny sekretovány asi z 50 % a většina molekul byla asociována s buněčným povrchem (4 M oplach). Naproti tomu, protein CyaA  $\Delta$ 1-4 byl sekretován pouze z 30 % a většina tohoto proteinu byla detekována pouze v supernatantu. Na rozdíl od divokého typu toxinu, který byl z 90 % sekretován do supernatantu obsahujícího 2 mM Ca<sup>2+</sup>, deleční konstrukty CyaA byly sekretovány pouze z 20-60 % a většina těchto proteinů byla také nalezena v supernatantu. Na Obr. 24B je znázorněna efektivita sekrece divokého typu a mutovaných CyaA. Efektivita sekrece se pohybuje na hladině 1-2 u mutovaných CyaA v přítomnosti 2 mM i 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>, kdežto efektivita sekrece CyaA v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup> odpovídá hodnotě 30. Tyto výsledky jednoznačně naznačují, že sbalování RTX domény CyaA umožňuje sekreci CyaA přes sekreční aparát typu I.



**Obr. 24 Sekrece CyaA proteinů v mutovaných kmech *B. pertussis*.** A – relativní distribuce AC aktivity ve frakcích. Vzorky byly odebrány z kultury bakterií v SS médiu při OD=1. Cytosolická frakce (šedý sloupec) reprezentuje vnitrobuněčné molekuly uvolněné z pelety TU puřrem s 8 M močovinou. Frakce 4 M oplach (bílý sloupec) reprezentuje molekuly asociované s buňkami a získané oplachem buněk T4U puřrem s 4 M močovinou. Frakce v supernatantu (černý sloupec) reprezentuje sekretované molekuly nacházející se po odstředění v supernatantu. Množství CyaA ve frakcích bylo stanoveno jako jejich AC aktivita. Součet AC aktivit ve třech frakcích byl považován za 100 %. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z nejméně 5 nezávislých sekrečních experimentů (n=5-13). B – efektivita sekrece CyaA, vyjádřená jako poměr  $AC_{out}/AC_{in}$ .  $AC_{out}$  je aritmetickým součtem AC aktivity v supernatantu a ve frakci v 4 M oplachu.  $AC_{in}$  je AC aktivita v cytosolické frakci. Zobrazeny jsou průměrné hodnoty a směrodatné odchylky z nejméně 5 nezávislých experimentů (n=5-16).

Měření AC aktivity je vysoce citlivá metoda pro stanovení množství CyaA molekul ve vzorcích. Dává však informaci pouze o přítomnosti funkční AC domény. Pro ověření, že v jednotlivých frakcích se vyskytoval protein v plné délce, ne pouze jako AC doména, jsem provedla SDS-PAGE se vzorky z frakcí v supernatantu, ve 4 M oplachu a z cytosolické frakce. Proteiny byly rozděleny SDS-PAGE elektroforézou, přeneseny na membránu metodou „Western blotting“ a detekovány pomocí imunochemické detekce s 3D1 protilátkou. Na Obr. 25A je znázorněna detekce purifikovaných proteinů sloužící jako interní standard. Na Obr. 25D, znázorňující analýzu frakce v supernatantu, je na membráně patrný jediný proužek a to ve vzorku *B.p. CyaA* v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>, což je ve shodě s výsledkem, získaným stanovením AC aktivit (Obr. 24A). Ve frakci ve 4 M oplachu (obr. 25C) jsou pozorovatelné proužky odpovídající velikostem proteinů CyaA, CyaA Δ1, CyaA Δ1-2 a CyaA Δ1-3 v přítomnosti 0,1 mM Ca<sup>2+</sup>. V cytosolické frakci (Obr. 25B) jsou

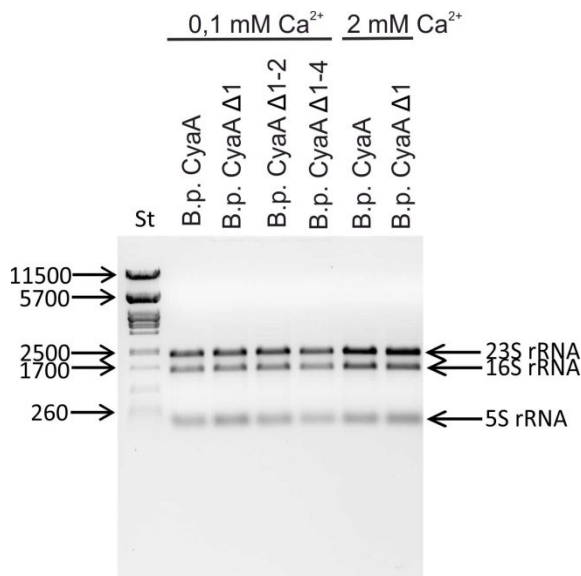
v obou koncentracích vápenatých iontů přítomny proužky o odpovídajících velikostech pro všech pět detekovaných variant CyaA. Na Obr. 25B jsou dále patrné proužky proteinů o nižších molekulových hmotnostech ve vzorcích *B.p. CyaA Δ1*, *B.p. CyaA Δ1-2* a *B.p. CyaA Δ1-3*, které naznačují probíhající degradaci odpovídajících proteinů v cytosolu. Proteiny v cytosolické frakci mají tendenci se degradovat, zatímco CyaA protein v supernatantu je stabilní. Všechny výsledky, získané imunochemickou detekcí toxinu na membráně, jsou v souladu s výsledky získanými měřeními AC aktivit ve vzorcích.



**Obr. 25 Imunochemická detekce CyaA proteinů pomocí protilátky 3D1 v jednotlivých buněčných frakcích.** Množství vzorku frakce odpovídající 2x ředění původní kultury bylo rozděleno v 7,5% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS a proteiny byly přeneseny metodou „Western blotting“ na nitrocelulóзовou membránu. **A** – proteiny z *E. coli* purifikované dvoukrokovou chromatografií sloužící jako standard. **B** – cytosolická frakce. **C** – frakce v 4 M oplachu. **D** – frakce v supernatantu.

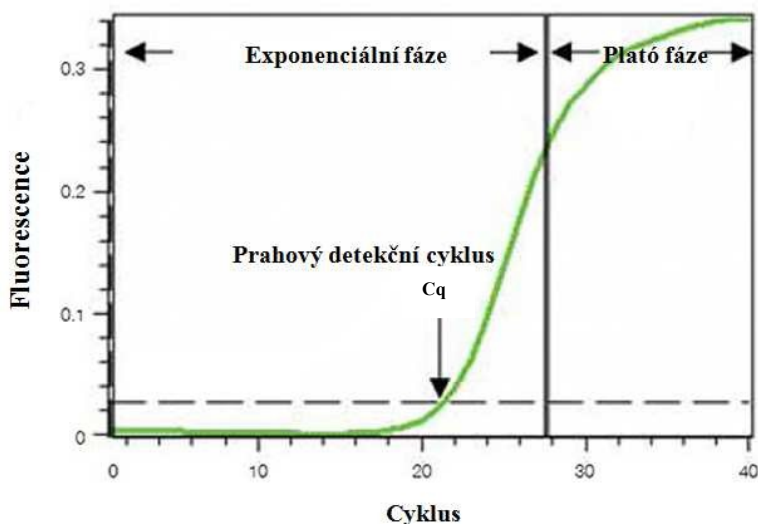
### 5.6.3 Stanovení hladiny mRNA genů *cya* operonu

Gen *cyaA* pro adenylátcyklázový toxin je kódován v operonu *cyaCABDE* společně s geny pro sekreční aparát typu I (*cyaB*, *cyaD* a *cyaE*). Gen *cyaB* kóduje ABC přenašeč sekrečního aparátu typu I. Vzhledem k tomu, že jsem detekovala rozdílné hodnoty celkových AC aktivit v různých koncentracích vápenatých iontů u různých variant CyaA proteinu (Tab. 4), a zároveň výrazný rozdíl v sekreci CyaA v 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  a v 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 23), chtěla jsem zjistit, jaké jsou hladiny mRNA pro gen *cyaA* a pro geny sekrečního aparátu (konkrétně gen *cyaB*). Proto jsem izolovala celkovou RNA ze všech kultur při jednom sekrečním experimentu, tuto RNA jsem ošetřila DNázou, abych zamezila eventuální amplifikaci genomové DNA při kvantitativní PCR. Při každém kroku jsem kontrolovala kvalitu produktů horizontální agarózovou elektroforézou, a kvalitu a kvantitu spektrofotometrickým měřením. Na ukázkovém gelu po ošetření DNázou na Obr. 26 se u všech vzorků celkové RNA nacházely tři proužky, které odpovídají ribozomální RNA. Ve vzorcích chyběl proužek genomové DNA, tzn. ošetření DNázou bylo úspěšné. Zároveň RNA nebyla degradována.



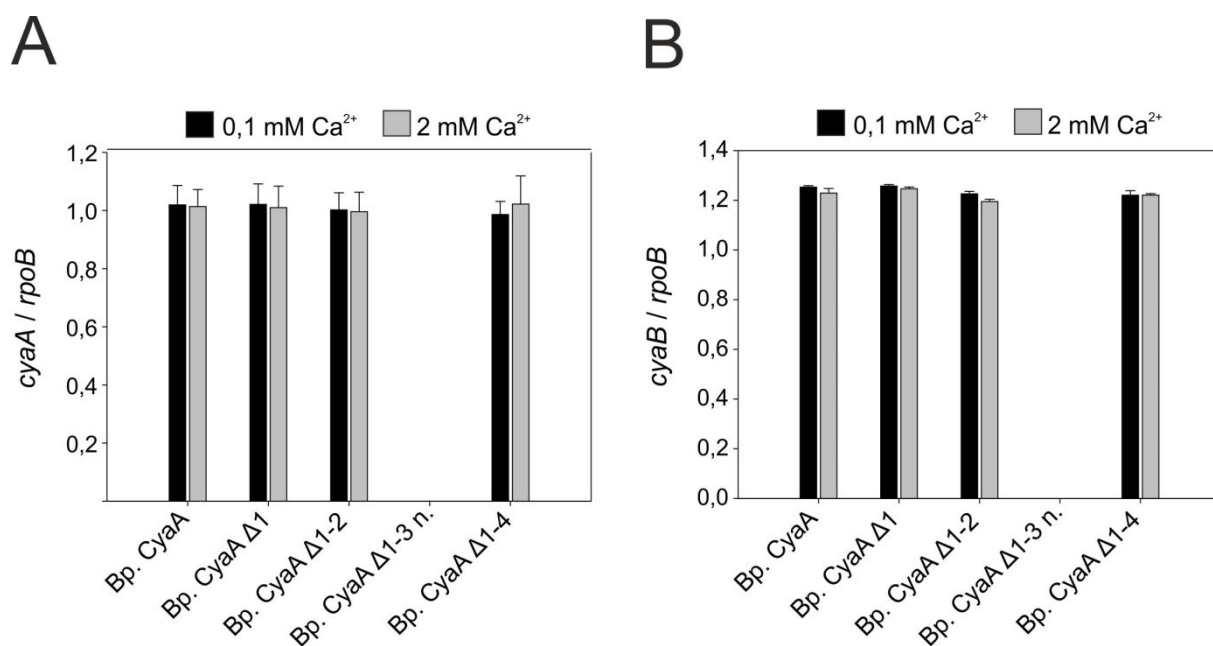
**Obr. 26 Horizontální agarózová elektroforéza celkové RNA vybraných vzorků.** Celková RNA z kultury při sekrečním experimentu byla izolována a ošetřena DNázou. Gel byl 0,8%. Do levé jamky byl nanesen standard molekulových hmotností ( $\lambda$ -DNA štěpená restriční endonukleasou PstI).

Pro reverzní transkripci bylo použito stejné množství celkové RNA u všech vzorků. Získaná komplementární DNA (cDNA) byla použita pro kvantitativní PCR (qPCR). Tato metoda umožňuje stanovit množství cílových molekul přítomných ve vzorku na počátku amplifikační reakce. Platí, že čím více kopií požadované sekvence cDNA bylo přítomno ve vzorku na počátku qPCR reakce, tím dříve amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze a tedy překročí hodnotu počáteční fluorescence (obr. 27). Cyklus, při kterém k tomu dojde, je nazván C<sub>q</sub> (z angl. cycle of quantification).



**Obr. 27 Standardní výstup změny fluorescence při amplifikaci DNA při qPCR.** C<sub>q</sub> (cyklus kvantifikace) je cyklus, při kterém hodnota fluorescence měřeného vzorku vzroste nad hodnotu fluorescence pozadí. V této počáteční části exponenciální fáze existuje kvantitativní vztah mezi množstvím PCR produktu a počátečním počtem kopií cDNA. Převzato z Bíbové (2010).

Kvantitativní PCR byla provedena s primery pro geny *cyaA*, *cyaB* a *rpoB* (Tab. 1, Kap. 3. 1. 3.). Zároveň byla ověřena tvorba produktů o správné velikosti a absence nespecifických produktů horizontální agarózovou elektroforézou po provedení qPCR. Program qPCR zahrnoval také analýzu křivek tání, jejíž analýzou byla vyloučena tvorba dimerů primerů. Hladina referenčního genu *rpoB* byla za daných podmínek při pokusu konstantní. Expresí cílového genu byla pro každý vzorek určena jako poměr získaných hodnot  $C_q$  cílového genu a  $C_q$  referenčního genu *rpoB*, kódujícího podjednotku RNA polymerázy. Z výsledku stanovení hladiny mRNA pro geny *cyaA* a *cyaB* u prvního experimentu, zobrazeného na Obr. 28, je zřejmé, že hladiny mRNA pro gen *cyaA* (Obr. 28A), kódující transportovaný protein, ani pro gen *cyaB* (Obr. 28B), kódující protein sekrečního aparátu, se neliší ani v závislosti na koncentraci vápenatých iontů (černý vs. šedý sloupec), ani v závislosti na délce transportovaného proteinu. Jedná se však o předběžný výsledek, který bude ověřen dalšími pokusy.



**Obr. 28 Hladiny mRNA pro geny *cyaA* (A), resp. *cyaB* (B).** 600 ng celkové RNA každého vzorku ze sekrečního experimentu (provedeného v různých koncentracích vápenatých iontů pro sekreci různých variant CyaA) bylo přepsáno do cDNA, se kterou byla provedena amplifikace pomocí kvantitativní PCR. Byly odečteny hodnoty  $C_q$  pro geny *cyaA*, *cyaB* a *rpoB*. Byl určen poměr hodnot  $C_q$  *cyaA*, resp. *cyaB* a  $C_q$  referenčního genu *rpoB*. Zobrazen je průměr a směrodatná odchylka ze dvou nezávislých pokusů kvantitativní PCR provedených v triplikátu pro gen *cyaA* ( $n=2$ ) a jednoho pokusu provedeného v triplikátu pro gen *cyaB* ( $n=1$ ). Hladina mRNA nebyla stanovena v koloniích *B.p. CyaA Δ1-3*.

## 6 DISKUZE

Adenylátcyklázový toxin (CyaA) z bakterie *Bordetella pertussis* obsahuje RTX doménu, v rámci níž se vážou vápenaté ionty a tím navozují její sbalování do tzv.  $\beta$ -šroubovicové struktury. Bylo ukázáno, že vazba vápenatých iontů v oblasti RTX domény je nezbytná pro správnou funkci toxinu (Bellalou *et al.* 1990; Rose *et al.* 1995). RTX doména proteinu CyaA se skládá z pěti bloků nonapeptidových repetitiv, zatímco RTX proteázy či RTX lipázy obsahují jen jeden, respektive dva bloky RTX repetitiv (Baumann *et al.* 1993; Baumann 1994; Miyatake *et al.* 1995; Hamada *et al.* 1996; Angkawidjaja *et al.* 2007). V této práci byly připraveny deleční varianty CyaA  $\Delta 1$ , CyaA  $\Delta 1-2$ , CyaA  $\Delta 1-3$  a CyaA  $\Delta 1-4$ , ve kterých byly postupně odstraněny skupiny bloků v RTX doméně, a následně byla testována jejich biologická aktivita. Bylo zjištěno, že žádný z delečních konstruktů nebyl biologicky aktivní. Jak je patrné na Obr. 16, jejich hemolytická aktivita byla zanedbatelná, stejně tak jako jejich schopnost translokovat AC doménu přes membránu do cytosolu buněk (viz Obr. 15B a 17B). Všechny konstrukty vykazovaly částečnou vazebnou aktivitu, odpovídající zhruba 30 % vazby divokého typu v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , a to jak na buňkách obsahujících specifický receptor pro toxin, CD11b/CD18 (viz Obr. 17A), tak i na erythrocytech, jež tento receptor nemají. Vazba na erythrocyty navíc nebyla závislá na přítomnosti vápenatých iontů (viz Obr. 15A). Vazebná aktivita na erythrocytech naznačuje, že vazba mutovaných CyaA proteinů nebyla závislá na sbalení RTX domény do správné struktury. To je v souladu s výsledky obdrženy na modelovém systému lipidických dvojvrstev, které ukázaly, že vazba CyaA do uměle vytvořené membrány není závislá na přítomnosti vápenatých iontů, i když pouze po předchozí inkubaci s vápenatými ionty tvoří toxiny po vazbě také póry do membrány (Ostolaza a Goni 1995). Nicméně, vazba delečních konstruktů nebyla „produktivní“, tj. mutované toxiny se sice částečně vážaly na buňky, ale nevykazovaly žádné cytotoxické aktivity (hemolýza a translokace AC domény).

V proteinu CyaA se mezi aminokyselinami 1166 a 1287, tzn. v rámci bloků 2 a 3, nachází vazebné místo pro receptor CD11b/CD18 (El-Azami-El-Idrissi *et al.* 2003). Přesto je na Obr. 17A patrné, že jsem při měření vazby na buňky obsahující tento receptor nezaznamenala žádnou výraznou změnu vazebné aktivity mezi proteiny CyaA  $\Delta 1$  a CyaA  $\Delta 1-2$ . Tento výsledek naznačuje, že mutované toxiny se nevázaly specificky na molekulu CD11b/CD18. Obr. 15A navíc ukazuje, že vazba mutovaných toxinů na erythrocyty nebyla závislá na přítomnosti vápenatých iontů. Částečnou vazbu toxinu

na buňky lze vysvětlit jeho inzercí do lipidické dvojvrstvy, která probíhá nezávisle na přítomnosti vápenatých iontů (Ostolaza a Goni 1995). Podobný efekt byl také pozorován u HlyA, kde nepřítomnost RTX domény výrazně snižuje schopnost vazby HlyA do membrány erytrocytů (Ludwig *et al.* 1988). Hydrofobní vlastnosti lipidické dvojvrstvy umožňují těsný kontakt s toxinem, k jehož zprostředkování zcela postačuje hydrofobní doména CyaA či uhlíkatý řetězec mastných kyselin na dvou lysinových zbytcích (Lys 860 a Lys 983). Částečnou vazbu na buňky, nezávislou na receptoru, lze dále vysvětlit interakcí CyaA s různými cukernými zbytky na buněčném povrchu (Morova *et al.* (2008).

Ukázala jsem, že ačkoli se deleční mutanty částečně vázaly na buňky (Obr. 15A a 17A), nebyly schopny translokovat AC doménu přes cytoplazmatickou membránu do cytosolu buněk (Obr. 15B, 17B). Tento výsledek naznačuje, že strukturní celistvost RTX domény je nutná pro správnou funkci toxinu. Na důležitost celistvosti C-koncové RTX domény proteinu CyaA pro jeho funkci bylo poukázáno již dříve. Byly charakterizovány biologické aktivity CyaA s deletovanými částmi hydrofobní, acylační či RTX domény, a bylo ukázáno, že všechny mutované proteiny nebyly cytotoxické ani hemolytické (Bellalou *et al.* 1990; Iwaki *et al.* 1995). Iwaki *et al.* (1995) již dokonce konstatovali zanedbatelnou biologickou aktivitu deleční mutanty CyaA  $\Delta$ 1009-1489. Delece celých bloků RTX domény CyaA takovým způsobem, jaký je popsán v této práci, ale nebyla doposud provedena. Studium biologické aktivity proteinu HlyA *E. coli* po delecí částí RTX domény bylo provedeno několika skupinami. RTX doména HlyA se skládá z jediného bloku obsahujícího okolo 13 RTX repetice, proto by zásahy do tohoto kompaktního bloku mohly mít výraznější efekt na funkčnost proteinu. Výsledky studií na HlyA ukázaly, že delece minimálně tří repetice vedou k úplnému narušení hemolytické aktivity HlyA (Felmlee a Welch 1988; Ludwig *et al.* 1988). Totéž ukazují i mé výsledky provedené na CyaA.

Ztráta cytotoxické aktivity CyaA by se také dala vysvětlit nesbalenou konformací RTX domény u delečních mutant toxinu. Prokázala jsem však, že u všech delečních konstruktů s výjimkou proteinu CyaA  $\Delta$ 1-4 došlo ke změnám mezi CD spektry proteinů změřených v nepřítomnosti vápenatých iontů a po přidání 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 19). Tyto změny byly charakteristické nárůstem zastoupení  $\beta$  struktury po přidání 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , a byly připsány sbalování RTX domény proteinů do struktury  $\beta$  šroubovice. Ačkoli nebylo prokázáno, že mutované proteiny zaujímaly stejnou strukturu, jako divoký typ, je to pravděpodobné. Proteiny totiž byly navrženy tak, aby obsahovaly neporušené sbalovací centrum molekuly,

nacházející se v rámci bloku 5 (Bumba, nepublikované údaje)(Sotomayor-Perez *et al.* 2011), a aby nebylo přerušeno pořadí bloků ve směru od C- k N-konci molekuly (viz Obr. 10), protože v tomto směru probíhá její sbalování (Bumba, nepublikované údaje). Předpoklad, že deleční mutanty zaujímaly strukturu divokého typu, je v souladu s navrženou hypotézou, že nepřítomnost biologické aktivity variant CyaA zkrácených v RTX doméně je způsobena nezbytností celistvosti celé RTX domény.

Sekrece proteinů sekrečním aparátem typu I (T1SS) je blokována jejich sbalením v cytoplazmě (Kenny *et al.* 1991; Wolff *et al.* 2003). Pro její správný průběh je proto nutné zachování rozvolněného stavu proteinů při průchodu T1SS (Holland *et al.* 2005). Sekrece je poháněna hydrolýzou ATP zprostředkovanou vnitrobuněčnou doménou ABC přenašeče T1SS (Koronakis *et al.* 1993) a v počátečním stádiu je sekrece spřažena rovněž s protonovým gradientem (Koronakis *et al.* 1991). Spekuluje se, že změna konformace RTX domény vyvolaná vápníkem by mohla pohánět sekreci proteinu do vnějšího prostředí. Nízká koncentrace vápenatých iontů v cytosolu ( $< 100 \text{ nM Ca}^{2+}$ ) udržuje nestrukturovanou konformaci RTX domény, což umožňuje transport proteinu kanálem T1SS. Efektivita sekrece proteinu by pak mohla být zvýšena sbalováním RTX domény, které je možné díky  $> 2 \text{ mM}$  mimobuněčné koncentraci vápenatých iontů při výstupu C-konce proteinu z ústí T1SS kanálu (Delepelaire 2004; Holland *et al.* 2005). Chenal *et al.* (2009) dále spekuluje, že sbalená a kompaktní RTX doména by mohla fungovat jako „molekulární rohatka“, blokující zpětný pohyb proteinu do cytosolu. Nicméně, experimentální ověření těchto hypotéz nebylo provedeno. Z tohoto důvodu jsem provedla sekreční experiment *in vivo*, zaměřený na sekreci CyaA proteinu buňkami *B. pertussis* sekrečním aparátem typu I, a to ve standartním SS médiu obsahujícím  $0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$  (koncentrace, při které je RTX doména rozvolněná) a v SS médiu obohaceném o  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$ , což je koncentrace nutná ke sbalování RTX domény. Molekuly CyaA jsem detekovala za využití jejich enzymatické AC aktivity. Předností této metody je, že je citlivá a přesná, zatímco běžně používaná detekce sekretovaných molekul imunochemickou detekcí proteinu na membráně umožňuje jen hrubou kvantifikaci. Z výsledku na Obr 23A je patrné, že zatímco v přítomnosti  $0,1 \text{ mM Ca}^{2+}$  bylo do supernatantu sekretováno pouze  $\sim 10 \%$  toxinu, v přítomnosti  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$  to již bylo  $\sim 90 \%$ . Efektivita sekrece CyaA byla mnohonásobně vyšší v přítomnosti  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$  než v SS médiu bez přidaného  $\text{Ca}^{2+}$ . Závislost sekrece HlyA na koncentraci vápenatých iontů byla studována *in vivo* v *E. coli* (Pimenta *et al.* (2005). Tito autoři ukázali, že efektivita sekrece HlyA se zvyšuje s rostoucí koncentrací

vápenatých iontů v médiu. Tyto poznatky jsou v souladu s mými výsledky. Pimenta *et al.* (2005) však stanovovali množství sekretovaného proteinu HlyA na základě určení jeho hemolytické aktivity na erythrocytech, což může být zavádějící, jelikož hemolytická aktivita je výrazně ovlivněna koncentrací vápenatých iontů. Výsledky mého experimentu tedy poprvé přesvědčivě potvrdily výše navrženou hypotézu. Vápenaté ionty navozují konformační změnu RTX domény CyaA ke kompaktnější struktuře vně buňky a zvyšují tak efektivitu sekrece pomocí T1SS. Tento výsledek je v souladu s obecně uznávanou představou, že C-konec proteinu prochází kanálem T1SS dříve, než jeho N-konec, stále však chybí jasné experimentální podložení tohoto tvrzení.

Předpokládala jsem, že efektivita sekrece delečních konstruktů CyaA  $\Delta 1$ , CyaA  $\Delta 1-2$ , CyaA  $\Delta 1-3$  a CyaA  $\Delta 1-4$  se bude postupně snižovat v závislosti na velikosti RTX domény. Abych testovala tuto hypotézu, provedla jsem sekreční experiment, zaměřený na sekreci různých variant CyaA, a to ve stejných podmínkách, jako bylo popsáno výše. Z Obr. 24B je patrné, že efektivita sekrece mutovaných CyaA byla výrazně snížena oproti efektivitě sekrece CyaA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Nezaznamenala jsem předpokládané snižování efektivit sekrece CyaA proteinů s postupně ubíranými RTX bloky, přestože varianta CyaA  $\Delta 1-4$  postrádající většinu RTX domény byla sekretována s nejnižší efektivitou v obou koncentracích vápenatých iontů. Pomocí kvantitativní PCR jsem zároveň ověřila, že hladiny transkriptů *cyaA* genu, kódujícího CyaA protein, i genu *cyaB*, kódujícího ABC přenašeč T1SS, jsou srovnatelné v kulturách produkujících konstrukty CyaA o různých délkách RTX domény a pěstovaných v různých koncentracích vápenatých iontů (Obr. 28). Tento kontrolní pokus naznačuje, že pozorované změny v sekreci nebyly způsobeny změnou míry transkripce genů *cyaA* a *cyaB*. Pro ověření proteinové hladiny CyaB v kulturách by bylo vhodné navíc provést imunochemickou detekci proteinu specifickou protilátkou. Co se týče proteinu CyaA  $\Delta 1-4$ , jeho celkové množství v kultuře bylo výrazně sníženo oproti množství jiných variant CyaA v příslušných kulturách *B. pertussis* (Tab. 4). Vysvětlení tohoto jevu je takové, že protein byl v cytosolu degradován kvůli chybějící části RTX domény. Pozorovala jsem výraznou vnitrobuněčnou degradaci v kulturách produkujících proteiny CyaA  $\Delta 1$ , CyaA  $\Delta 1-2$  a CyaA  $\Delta 1-3$  (Obr. 22A a B, Obr. 25B), množství proteinu CyaA  $\Delta 1-4$  v kultuře však bylo tak nízké, že byl imunochemickou detekcí na membráně stěží rozpoznán. Je možné, že došlo k úplné degradaci proteinu v cytosolu, která byla způsobena blokadou sekrece již v její počáteční fázi. To bylo ukázáno skupinami Gray *et al.* (1986) a Pimenta *et al.* (2005), které

nalezly v cytosolu minimum proteinu, pokud úplně zablokovaly jeho sekreci T1SS (tj. v nepřítomnosti HlyB a HlyD či v přítomnosti mutovaného HlyD). Deleční konstrukty, vytvořené v této práci, mohly být také degradovány v cytoplazmě z důvodu nízké efektivity jejich sekrece. Pravděpodobně docházelo ke zpomalení sekrece a ke hromadění nesekretovaného proteinu v cytoplazmě bakterie. Dosud nebyl nalezen žádný chaperon, který by stabilizoval rozvolněné RTX proteiny, i když přítomnost takového chaperonu je předpokládána (Holland 2004). Jako možný molekulární chaperon byla navržena CLD doména, což je N-koncová doména proteinu HlyB, vyčnívající na vnitrobuněčné straně ABC přenašeče. Tato doména interaguje s rozvolněnou RTX doménou, stabilizuje molekulu HlyA před sekrecí a nepřítomnost této domény vede k inhibici sekrece HlyA (Lecher *et al.* 2012). A naopak, delece RTX domény u CyaA  $\Delta$ 1-4 vede k destabilizaci celého proteinu a jeho následné degradaci v cytosolu bakterie.

Z předkládaných výsledků vyplývá, že celistvost RTX domény CyaA hraje důležitou roli v sekreci tohoto proteinu. V případě HlyA tomu tak není, jelikož proteiny mohly postrádat až 11 z 13 RTX repetice a stále byly sekretovány (Felmlee a Welch 1988; Ludwig *et al.* 1988). Pro sekreci proteinu HlyA se ukázal být nezbytný spíše C-koncový sekreční signál (Felmlee a Welch 1988; Gray *et al.* 1986). Naproti tomu CyaA bez C-koncového sekrečního signálu byl sekretován sekrečním aparátem typu I bakterie *E. coli*, který rozpoznával alternativní sekreční signál v oblasti RTX domény CyaA (Sebo a Ladant 1993). Proteáza B z *Erwinia chrysanthemi*, postrádající N-koncové RTX repetice, jejíž sekreční signál byl však intaktní, nebyla sekretována. Nicméně, postrádala-li tato proteáza C-koncové RTX repetice a obsahovala-li sekreční signál, tak již sekretována byla (Delepelaire a Wandersman 1990). Autoři studie na tento fakt nijak nepoukazují, ale výsledek by mohl odpovídat mým výsledkům: při deleci N-koncové části RTX domény CyaA také nedocházelo k účinné sekreci proteinu. U CyaA tak může být nezbytný zrovna blok 1. Dále bylo provedeno mnoho pokusů s cílem sekretovat fúzní proteiny. Tyto proteiny obsahovaly vždy sekreční signál, případně i část RTX domény proteinu sekretovaného T1SS, a tato část byla fúzována s jiným proteinem. Letoffe a Wandersman (1992) provedli rozsáhlou studii sekrece proteinů, sestávajících z C-koncové oblasti proteázy B z *Erwinia chrysanthemi* fúzované s N-koncovými doménami cizorodých proteinů. Výsledkem těchto experimentů bylo, že pouze proteiny nesoucí delší cizorodý polypeptid vyžadovaly RTX repetice pro sekreci v *E. coli*. Výsledky studií dalších výzkumných skupin také poukázaly na nezbytnost přítomnosti

alespoň několika RTX repetit pro sekreci proteinů fúzovaných s delším cizorodým proteinem, zatímco kratší proteiny byly sekretovány i v nepřítomnosti RTX repetit (Mackman *et al.* 1987; Delepelaire a Wandersman 1990; Kenny *et al.* 1991). Zároveň byla sekretována zkrácená C-koncová doména HlyA, obsahující pouze sekreční signál a neobsahující RTX repetice (Mackman *et al.* 1987). Výsledky studií role RTX domény při sekreci proteinů mohou být ovlivněny mnoha faktory. Mimo jiné může mít na sekreci vliv vysoká kooperativita RTX domény, a tedy výběr místa delece RTX repetit. Přesto je zřejmý obecný trend závislosti počtu repetit nutných pro sekreci na délce transportovaného proteinu. Korelace délky RTX proteinů s počtem RTX repetit byla prokázána srovnáváním sekvencí v databázích (Linhartova *et al.* 2010). Funkce RTX domény spočívá ve „vytahování“ proteinů ze sekrečního aparátu, způsobeném sbalováním RTX domény do struktury  $\beta$  šroubovice. K sekreci menších proteinů dojde i bez této doplňující transportní energie, zatímco pro sekreci velkých proteinů je nezbytné vytvoření dostatečně velké a kompaktní „zátky“, která zneumožňuje jejich zpětný pohyb do cytosolu. To by mohl být problém také při sekreci delečních konstruktů prezentovaných v této práci - RTX doména pravděpodobně nebyla dostatečně velká, aby zneumožnila difúzní pohyb tam a zpět sekrečním aparátem. To potvrzuje i Obr. 24A, který ukazuje, že nejen efektivita (24B), ale i relativní distribuce mutovaných proteinů do jednotlivých frakcí je velice podobná výsledku sekrece divokého typu v přítomnosti 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (koncentrace vápenatých iontů, při které nedochází ke sbalování RTX domény). V přítomnosti 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  je u CyaA efektivita sekrece velmi nízká a pravděpodobně dochází k sekreci proteinu pouhou difúzí, kterou v počátečních krocích pohání hydrolyza ATP společně s protonovým gradientem.

Při sekreci CyaA provedené v *B. pertussis* do SS média, obsahujícím 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , dochází k asociaci sekretovaných molekul s filamentózním hemagglutininem FHA na povrchu buněk, ale nikoliv s pertaktinem, LPS či pertusovým toxinem (Zaretzky *et al.* 2002). Z Obr. 24A je patrné, že velká část sekretovaných molekul CyaA i delečních variant CyaA se nacházela v přítomnosti 0,1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ve frakci „4 M oplach“, byla tedy asociována s buněčným povrchem. K výraznému snížení zastoupení frakce „4 M oplach“ došlo v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  u divokého typu toxinu. Zvýšení podílu asociované frakce v nižší koncentraci vápenatých iontů by mohlo souviset s nižší efektivitou sekrece, kdy dochází pravděpodobně také ke zpomalení průchodu kanálem a k usnadnění interakce s povrchovými strukturami bakterie. Na povrchu buněk by mohlo docházet k elektrostatické interakci

záporně nabitě C-koncové RTX domény CyaA s kladně nabitou molekulou FHA. Na druhou stranu, interakce FHA s CyaA je pravděpodobně zprostředkována AC doménou CyaA (Hoffman *et al.* 2014). Bylo ukázáno, že vazba vápenatých iontů v oblasti RTX domény snižuje celkový náboj proteinu vyvázáním záporného náboje aspartátových zbytků, a molekula se pak stává kompaktnější a hydrofobnější (Sotomayor-Perez *et al.* 2011). V nízké koncentraci vápenatých iontů, a tedy i v SS médiu, má molekula záporný náboj a může proto mít vysokou afinitu k FHA (což vysvětluje pozorovaný vysoký podíl frakce 4 M oplach). V přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  elektrostatická interakce těchto proteinů není výhodná, a protein může být ihned po sekreci uvolněn do supernatantu (pozorovaný zvýšený podíl frakce v supernatantu).

## 7 SOUHRN

- i. Z plazmidu pCACT3 byly připraveny expresní vektory pro produkci konstruktů CyaA  $\Delta$ 1, CyaA  $\Delta$ 1-2, CyaA  $\Delta$ 1-3 a CyaA  $\Delta$ 1-4 nesoucích sérii delecí bloků RTX domény.
- ii. Byly připraveny proteiny CyaA, CyaA  $\Delta$ 1, CyaA  $\Delta$ 1-2, CyaA  $\Delta$ 1-3 a CyaA  $\Delta$ 1-4 v dostatečné čistotě a koncentraci.
- iii. Vytvořené deleční konstrukty se částečně vázaly na membránu erytrocytů. Tato vazba byla nezávislá na vápenatých iontech v médiu a byla „neproduktivní“, tj. mutanty nebyly invazivní ani hemolyticky aktivní na erytrocytech.
- iv. Vytvořené deleční konstrukty se částečně vázaly na membránu J774A.1 makrofágů, nesoucích receptor pro toxin CD11b/CD18, ale nebyly schopny translokovat AC doménu přes cytoplazmatickou membránu a zvyšovat hladinu vnitrobuněčného cAMP.
- v. Oblast bloku 3 v RTX doméně byla determinována jako antigenní epitop pro myší monoklonální protilátku 9D4.
- vi. Metodou cirkulárního dichroismu bylo zjištěno, že dochází ke sbalování jednotlivých bloků RTX domény u delečních variant CyaA toxinu.
- vii. Byly vytvořeny mutantní kmeny *B. pertussis* nesoucí jednotlivé delece v RTX doméně CyaA.
- viii. Sekrečním experimentem, provedeným s divokým i s mutantními kmeny *B. pertussis*, bylo zjištěno, že vápenaté ionty indukují sekreci CyaA do vnějšího prostředí.
- ix. Sekreční experimenty dále naznačují, že délka RTX domény určuje efektivitu sekrece substrátů T1SS.

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ABC	z angl. <u>A</u> TP- <u>B</u> inding <u>C</u> assette
AC doména	adenylátcyklázová doména
ACP	z angl. <u>a</u> cyl <u>c</u> arrier <u>p</u> rotein
AP	alkalická proteáza
APS	persulfát amonný
B.p.	<i>Bordetella pertussis</i>
BSA	hovězí sérový albumin
bvg	z angl. <i>Bordetella</i> <u>y</u> irulence <u>g</u> ene
CLD	doména připomínající C39 peptidázu (z angl. <u>C</u> 39- <u>l</u> ike <u>d</u> omain)
CPM	<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute
Cq	prahový cyklus při kvantitativní PCR (z angl. <u>c</u> ycle of <u>q</u> uantification)
CyaA	adenylátcyklázový toxin
DEAE	diethylaminoethyl
DEPC voda	voda ošetřená diethylpyrokarbonátem
dH2O	destilovaná voda
DMEM médium	z angl. <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium
dNTP	2' deoxyribonukleosid 5' trifosfát
DPM	počet přeměn za minutu (z angl. <u>D</u> isintegrations <u>P</u> er <u>M</u> inute)
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	z angl. <u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
FHA	filamentózní hemaglutinin
Hly	hemolyzin <i>E. coli</i>
IPTG	isopropyl $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
J774A.1	myší makrofágová tkáňová linie

LB médium	Luria-Bertani médium
LPS	lipopolysacharid
M1/70	monoklonální myši protilátka proti CD11b
MDO	obohacené médium pro kultivaci bakterií
MFP	adaptér T1SS (z angl. <u>M</u> embrane <u>F</u> usion <u>P</u> rotein)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. <u>M</u> ajor <u>H</u> istokompatibility <u>C</u> omplex)
OD	optická denzita
OMP	protein vnější membrány (z angl. <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein)
RPMI médium	z angl. <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute Medium
RTX	označení skupiny proteinů (z angl. <u>R</u> epeats in <u>T</u> oxin)
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS)
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
T1SS	sekreční aparát typu I (z angl. <u>T</u> ype <u>I</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
TLRs	z angl. <u>T</u> oll- <u>L</u> ike <u>R</u> eceptors
TolC	z angl. <u>c</u> olicin <u>t</u> olerant
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Angkawidjaja, C., You, D.J., Matsumura, H., Kuwahara, K., Koga, Y., Takano, K., Kanaya, S. (2007). Crystal structure of a family I.3 lipase from *Pseudomonas* sp. MIS38 in a closed conformation. *FEBS Lett* 581, 5060-5064.
- Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R., Rappuoli, R. (1989). Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 6671-6675.
- Balakrishnan, L., Hughes, C., Koronakis, V. (2001). Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 313, 501-510.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., Goodwin, M.S. (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., 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.
- Baumann, U. (1994). Crystal structure of the 50 kDa metallo protease from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol* 242, 244-251.
- Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M., 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.
- Beattie, D.T., Mahan, M.J., Mekalanos, J.J. (1993). Repressor binding to a regulatory site in the DNA coding sequence is sufficient to confer transcriptional regulation of the *vir*-repressed genes (*vrg* genes) in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 175, 519-527.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C., Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* 58, 3242-3247.
- Benabdelhak, H., Kiontke, S., Horn, C., Ernst, R., Blight, M.A., Holland, I.B., Schmitt, L. (2003). A specific interaction between the NBD of the ABC-transporter HlyB and a C-terminal fragment of its transport substrate haemolysin A. *J Mol Biol* 327, 1169-1179.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., Sebo, P. (1994). Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269, 27231-27239.
- Betsou, F., Sebo, P., Guiso, N. (1993). CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61, 3583-3589.
- Bhakdi, S., Greulich, S., Muhly, M., Eberspacher, B., Becker, H., Thiele, A., Hugo, F. (1989). Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* 169, 737-754.
- Bíbová, I. (2010). Detekce specifických odpovědí paměťových T-buněk po stimulaci mykobakteriálními antigeny. Diplomová práce, VŠCHT Praha, Česká republika.
- Boardman, B.K., Satchell, K.J. (2004). *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *J Bacteriol* 186, 8137-8143.
- Boucher, P.E., Stibitz, S. (1995). Synergistic binding of RNA polymerase and BvgA phosphate to the pertussis toxin promoter of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 177, 6486-6491.

- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R., 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.
- Coote, J.G. (1991). Antigenic switching and pathogenicity: environmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol* 137, 2493-2503.
- Coote, J.G. (1992). Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 8, 137-161.
- Cotter, P.A., Miller, J.F. (1994). BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun* 62, 3381-3390.
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694, 149-161.
- Delepelaire, P., Wandersman, C. (1990). Protein secretion in gram-negative bacteria. The extracellular metalloprotease B from *Erwinia chrysanthemi* contains a C-terminal secretion signal analogous to that of *Escherichia coli* alpha-hemolysin. *J Biol Chem* 265, 17118-17125.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., 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.
- Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E.Y., Welch, R.A. (1985a). *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* 163, 88-93.
- Felmlee, T., Pellett, S., Welch, R.A. (1985b). Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J Bacteriol* 163, 94-105.
- Felmlee, T., Welch, R.A. (1988). Alterations of amino acid repeats in the *Escherichia coli* hemolysin affect cytolytic activity and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5269-5273.
- Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spulakova, V., Konopasek, I., Sebo, P. (2007). Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b<sup>+</sup> monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 282, 2808-2820.
- Fullner, K.J., Mekalanos, J.J. (2000). In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J* 19, 5315-5323.
- Gangola, P., Rosen, B.P. (1987). Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 262, 12570-12574.
- Gentschev, I., Goebel, W. (1992). Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 232, 40-48.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A. (1988). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J* 7, 3997-4004.
- Gordon, V.M., Leppla, S.H., Hewlett, E.L. (1988). Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* 56, 1066-1069.
- Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J.M., Holland, I.B. (1986). The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 205, 127-133.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L., Hewlett, E. (1998). Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem* 273, 18260-18267.

- Gross, R. (1995). Domain structure of the outer membrane transporter protein CyaE of *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* *17*, 1219-1220.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., Leclerc, C. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* *193*, 1035-1044.
- Guermontprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A., Leclerc, C. (1999). Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* *162*, 1910-1916.
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., 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.F., Hewlett, E.L. (1994). Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* *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., 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.
- Hamada, K., Hata, Y., Katsuya, Y., Hiramatsu, H., Fujiwara, T., Katsube, Y. (1996). Crystal structure of Serratia protease, a zinc-dependent proteinase from *Serratia* sp. E-15, containing a beta-sheet coil motif at 2.0 Å resolution. *J Biochem* *119*, 844-851.
- Hanekop, N., Zaitseva, J., Jenewein, S., Holland, I.B., Schmitt, L. (2006). Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB. *FEBS Lett* *580*, 1036-1041.
- Hanski, E., Farfel, Z. (1985). *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem* *260*, 5526-5532.
- Havarstein, L.S., Diep, D.B., Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol Microbiol* *16*, 229-240.
- Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V.M., Gray, M.C. (1991). Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem* *266*, 17503-17508.
- Hickey, F.B., Brereton, C.F., Mills, K.H. (2008). Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* *84*, 234-243.
- Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., O'Toole, G.A. (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* *49*, 905-918.
- Hoffman, C.L., Gray, M., Reyes, Y., Eby, J., Osicka, R., Bumba, L., Sebo, P., Conover, M., Deora, R., Melvin, J., *et al.* (2014). Adenylate Cyclase Toxin: Interaction with FHA and Inhibition of *Bordetella* Biofilm Formation. 114th General Meeting of American Society for Microbiology Boston, Massachusetts, USA 175-2052014.
- Holland, I.B. (2004). Translocation of bacterial proteins--an overview. *Biochim Biophys Acta* *1694*, 5-16.
- Holland, I.B., Schmitt, L., Young, J. (2005). Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* *22*, 29-39.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., Locher, K.P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* *17*, 412-418.
- Hui, D., Morden, C., Zhang, F., Ling, V. (2000). Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence. *J Biol Chem* *275*, 2713-2720.

- Chenal, A., Guijarro, J.I., Raynal, B., Delepierre, M., Ladant, D. (2009). RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion. *J Biol Chem* *284*, 1781-1789.
- Cherry, J.D. (2012). Epidemic pertussis in 2012--the resurgence of a vaccine-preventable disease. *The New England journal of medicine* *367*, 785-787.
- Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F., Cotter, P.A. (2010). Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect Immun* *78*, 2901-2909.
- Iwaki, M., Ullmann, 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.
- Kamanová, J. (2005). Vliv adenylátcyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* na buněčnou signalizaci. Diplomová práce Praha, 2005 Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., Benada, O., Just, I., Sebo, P. (2008). Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *J Immunol* *181*, 5587-5597.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C., 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 U S A* *95*, 12532-12537.
- Kenny, B., Haigh, R., Holland, I.B. (1991). Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from *Escherichia coli* of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Mol Microbiol* *5*, 2557-2568.
- Kenny, B., Taylor, S., Holland, I.B. (1992). Identification of individual amino acids required for secretion within the haemolysin (HlyA) C-terminal targeting region. *Mol Microbiol* *6*, 1477-1489.
- Khelef, N., Zychlinsky, A., Guiso, N. (1993). *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* *61*, 4064-4071.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I., 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., Eswaran, J., Hughes, C. (2004). Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* *73*, 467-489.
- Koronakis, V., Hughes, C., 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., 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., Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* *405*, 914-919.
- Lacey, B.W. (1960). Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg (Lond)* *58*, 57-93.
- Ladant, D. (1988). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem* *263*, 2612-2618.
- Lally, E.T., Kieba, I.R., Sato, A., Green, C.L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J.F., Shenker, B.J., Ortlepp, S., Robinson, M.K., *et al.* (1997). RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* *272*, 30463-30469.

- Lavine, J.S., Bjornstad, O.N., de Blasio, B.F., Storsaeter, J. (2012). Short-lived immunity against pertussis, age-specific routes of transmission, and the utility of a teenage booster vaccine. *Vaccine* *30*, 544-551.
- Lee, M., Jun, S.Y., Yoon, B.Y., Song, S., Lee, K., Ha, N.C. (2012). Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria. *PLoS One* *7*, e40460.
- Lee, S.J., Gray, M.C., Guo, L., Sebo, P., Hewlett, E.L. (1999). Epitope mapping of monoclonal antibodies against *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun* *67*, 2090-2095.
- Lee, S.J., Gray, M.C., Zu, K., Hewlett, E.L. (2005). Oligomeric behavior of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in solution. *Arch Biochem Biophys* *438*, 80-87.
- Lecher, J., Schwarz, C.K., Stoldt, M., Smits, S.H., Willbold, D., Schmitt, L. (2012). An RTX transporter tethers its unfolded substrate during secretion via a unique N-terminal domain. *Structure* *20*, 1778-1787.
- Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. (1996). Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *EMBO J* *15*, 5804-5811.
- Letoffe, S., Wandersman, C. (1992). Secretion of CyaA-PrtB and HlyA-PrtB fusion proteins in *Escherichia coli*: involvement of the glycine-rich repeat domain of *Erwinia chrysanthemi* protease B. *J Bacteriol* *174*, 4920-4927.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, 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., Jacob-Dubuisson, F. (2001). *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* *4*, 82-89.
- Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C., Sebo, P. (2002). Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* *70*, 1002-1005.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R., Goebel, W. (1988). The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet* *214*, 553-561.
- Mackman, N., Baker, K., Gray, L., Haigh, R., Nicaud, J.M., Holland, I.B. (1987). Release of a chimeric protein into the medium from *Escherichia coli* using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *EMBO J* *6*, 2835-2841.
- Mackman, N., Nicaud, J.M., Gray, L., Holland, I.B. (1985a). Genetical and functional organisation of the *Escherichia coli* haemolysin determinant 2001. *Mol Gen Genet* *201*, 282-288.
- Mackman, N., Nicaud, J.M., Gray, L., Holland, I.B. (1985b). Identification of polypeptides required for the export of haemolysin 2001 from *E. coli*. *Mol Gen Genet* *201*, 529-536.
- Mackova, J., Stasikova, J., Kutinova, L., Masin, J., Hainz, P., Simsova, M., Gabriel, P., Sebo, P., Nemeckova, S. (2006). Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by *Bordetella adenylate cyclase* and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother* *55*, 39-46.
- Mahon, B.P., Ryan, M.S., Griffin, F., Mills, K.H. (1996). Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. *Infect Immun* *64*, 5295-5301.

- Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C., Sebo, P. (2005). Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of Bordetella adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* 44, 12759-12766.
- Masure, H.R., Au, D.C., Gross, M.K., Donovan, M.G., Storm, D.R. (1990). Secretion of the Bordetella pertussis adenylate cyclase from Escherichia coli containing the hemolysin operon. *Biochemistry* 29, 140-145.
- Meier, R., Drepper, T., Svensson, V., Jaeger, K.E., Baumann, U. (2007). A calcium-gated lid and a large beta-roll sandwich are revealed by the crystal structure of extracellular lipase from Serratia marcescens. *J Biol Chem* 282, 31477-31483.
- Melton, A.R., Weiss, A.A. (1993). Characterization of environmental regulators of Bordetella pertussis. *Infect Immun* 61, 807-815.
- Merkel, T.J., Barros, C., Stibitz, S. (1998). Characterization of the bvgR locus of Bordetella pertussis. *J Bacteriol* 180, 1682-1690.
- Miyatake, H., Hata, Y., Fujii, T., Hamada, K., Morihara, K., Katsube, Y. (1995). Crystal structure of the unliganded alkaline protease from Pseudomonas aeruginosa IFO3080 and its conformational changes on ligand binding. *J Biochem* 118, 474-479.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5355-5360.
- Nicaud, J.M., Mackman, N., Gray, L., Holland, I.B. (1985). Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from E. coli 2001. *FEBS Lett* 187, 339-344.
- Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C., Sebo, 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.
- Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., Leclerc, C., Osicka, R., Sebo, P. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Mol Microbiol* 75, 1550-1562.
- Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R., Sebo, P. (1999). An amphipathic alpha-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., Goni, F.M. (1995). Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. *FEBS Lett* 371, 303-306.
- Oswald, C., Holland, I.B., Schmitt, L. (2006). The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 372, 385-399.
- Pillsbury, A., Quinn, H.E., McIntyre, P.B. (2014). Australian vaccine preventable disease epidemiological review series: pertussis, 2006-2012. *Communicable diseases intelligence quarterly report* 38, E179-194.
- Pimenta, A.L., Racher, K., Jamieson, L., Blight, M.A., Holland, I.B. (2005). Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. *J Bacteriol* 187, 7471-7480.
- Pospíšilová, E. (2010). Adenylát cyklázový toxin bakterie Bordetella pertussis: mechanismus úniku draselných iontů z makrofágů. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Parze, Česká republika.
- Redhead, K., Watkins, J., Barnard, A., Mills, K.H. (1993). Effective immunization against Bordetella pertussis respiratory infection in mice is dependent on induction of cell-mediated immunity. *Infect Immun* 61, 3190-3198.

- Riolo, M.A., King, A.A., Rohani, P. (2013). Can vaccine legacy explain the British pertussis resurgence? *Vaccine* 31, 5903-5908.
- Rogel, 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.
- Rogel, A., Meller, R., Hanski, E. (1991). Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem* 266, 3154-3161.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J., 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.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P., Ladant, D. (1992). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* 267, 13598-13602.
- Satchell, K.J. (2007). MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect Immun* 75, 5079-5084.
- Satchell, K.J. (2011). Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins. *Annu Rev Microbiol* 65, 71-90.
- Sebo, P., 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.
- Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C., Luisi, B. (2001). The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. *Eur J Biochem* 268, 5011-5026.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B., Stubbs, M.T. (2003). Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* 330, 333-342.
- Schulein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H.J., Goebel, W. (1992). A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol Gen Genet* 234, 155-163.
- Sotomayor-Perez, A.C., Ladant, D., Chenal, A. (2011). Calcium-induced folding of intrinsically disordered repeat-in-toxin (RTX) motifs via changes of protein charges and oligomerization states. *J Biol Chem* 286, 16997-17004.
- Stanley, P., Packman, L.C., Koronakis, V., Hughes, C. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266, 1992-1996.
- Stockbauer, K.E., Fuchslocher, B., Miller, J.F., Cotter, P.A. (2001). Identification and characterization of BipA, a *Bordetella Bvg*-intermediate phase protein. *Mol Microbiol* 39, 65-78.
- Strathdee, C.A., Lo, R.Y. (1989). Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* 171, 916-928.
- Tartz, S., Kamanova, J., Simsova, M., Sebo, P., Bolte, S., Heussler, V., Fleischer, B., Jacobs, T. (2006). Immunization with a circumsporozoite epitope fused to *Bordetella pertussis* adenylate cyclase in conjunction with cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade confers protection against *Plasmodium berghei* liver-stage malaria. *Infect Immun* 74, 2277-2285.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V. (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J* 17, 6487-6496.

- Trent, M.S., Worsham, L.M., Ernst-Fonberg, M.L. (1998). The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase. *Biochemistry* 37, 4644-4652.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R., Sebo, P. (2009). Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *FASEB J* 23, 2831-2843.
- Wandersman, C., Delepelaire, P. (1990). TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4776-4780.
- Warfel, J.M., Zimmerman, L.I., Merkel, T.J. (2013). Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 787-792.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L. (1986). Virulence factors of Bordetella pertussis. *Annu Rev Microbiol* 40, 661-686.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., Falkow, S. (1984). Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis. *J Infect Dis* 150, 219-222.
- Wiese-Posselt, M., Hellenbrand, W. (2010). Changes to the varicella and pertussis immunisation schedule in Germany 2009: background, rationale and implementation. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 15.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R., Berkowitz, S.A. (1980). Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3841-3844.
- Wolff, N., Sapriel, G., Bodenreider, C., Chaffotte, A., Delepelaire, P. (2003). Antifolding activity of the SecB chaperone is essential for secretion of HasA, a quickly folding ABC pathway substrate. *J Biol Chem* 278, 38247-38253.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Jumpertz, T., Holland, I.B., Schmitt, L. (2005a). H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J* 24, 1901-1910.
- Zaitseva, J., Jenewein, S., Wiedenmann, A., Benabdelhak, H., Holland, I.B., Schmitt, L. (2005b). Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry* 44, 9680-9690.
- Zaretzky, F.R., Gray, M.C., Hewlett, E.L. (2002). Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of Bordetella pertussis: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol* 45, 1589-1598.
- Zhang, F., Sheps, J.A., Ling, V. (1998). Structure-function analysis of hemolysin B. *Methods Enzymol* 292, 51-66.
- Zu, T., Manetti, R., Rappuoli, R., Scarlato, V. (1996). Differential binding of BvgA to two classes of virulence genes of Bordetella pertussis directs promoter selectivity by RNA polymerase. *Mol Microbiol* 21, 557-565.