

1 OBSAH

1	Obsah.....	1
2	Úvod.....	4
3	Literární přehled	5
3.1	Interakce patogen - hostitel	5
3.2	<i>Bordetella pertussis</i>	6
3.2.1	Faktory virulence bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	7
3.3	RTX adenylát cyklasový toxin	11
3.3.1	RTX Toxiny	11
3.3.2	Adenylát cyklasový toxin (CyaA)	16
3.4	Využití CyaA jako nosiče pro dopravu cizorodých epitopů do antigen prezentujících buněk	25
3.4.1	Imunodominantní epitopy <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>	28
3.5	Integriny	30
3.5.1	Rodina β_2 integrinů.....	31
3.5.2	Glykosylace β_2 integrinů	32
3.6	Integrin CD11b/CD18	34
3.6.1	Struktura CD11b/CD18	35
3.6.2	Struktura podjednotky CD11b.....	36
3.6.3	Struktura podjednotky CD18.....	38
3.6.4	Signalizace integrinu CD11b/CD18	39
3.7	Interakce proteinů se sacharidy	41
4	Cíle disertační práce.....	43
5	Materiál a metody	44
5.1	Seznam použitých chemikálií.....	44
5.2	Přístrojové vybavení.....	46
5.3	Použité restriční endonukleasy	47
5.4	Ostatní enzymy	47
5.5	Seznam použitých protilátek	48
5.6	Použité roztoky a pufry	48
5.7	Syntetické oligonukleotidy.....	53
5.8	Použitá kultivační média	54
5.8.1	Kultivační média pro bakteriální kultury.....	54
5.8.2	Kultivační média pro tkáňové linie	55
5.9	Plasmidy	55
5.10	Bakteriální kmeny	57
5.11	Použité tkáňové linie	57
5.12	Metody a pracovní postupy	57
5.12.1	Uchovávání bakteriálních kmenů	57

5.12.2	Příprava superkompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	57
5.12.3	Transformace plasmidové DNA do superkompetentních buněk	58
5.12.4	Izolace plasmidové DNA	58
5.12.5	Manipulace s plasmidovou DNA	59
5.12.6	Sekvenace plasmidové DNA.....	61
5.12.7	Příprava močovinnového extraktu proteinů pro purifikaci.....	61
5.12.8	Příprava cytosolického extraktu LtxA.....	62
5.12.9	Produkce α -hemolysinu	62
5.12.10	Purifikace CyaA	63
5.12.11	Purifikace antigenu TB10.4 a fragmentů podjednotky CD11b afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose.....	64
5.12.12	Purifikace extracelulární domény podjednotky CD11b afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose	64
5.12.13	Stanovení lipopolysacharidu	64
5.12.14	Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	65
5.12.15	Western blot	65
5.12.16	Stanovení koncentrace proteinů.....	66
5.12.17	Stanovení vlastností adenylát cyklosového toxinu	66
5.12.18	Stanovení hemolytické aktivity HlyA	69
5.12.19	Izolace lidských neutrofilů	69
5.12.20	Práce s tkáňovými liniemi	69
5.12.21	Imunoprecipitace	70
5.12.22	Odstranění N-glykosidicky vázaného oligosacharidového řetězce	71
5.12.23	Inhibice tvorby N-glykosidicky vázaného oligosacharidového řetězce	71
5.12.24	Inhibice vazby CyaA/233FLAG k buňkám volnými sacharidy	71
5.12.25	Vazba CyaA/233FLAG k buňkám	71
5.12.26	Detekce integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu	72
5.12.27	Stanovení intracelulárního cAMP	72
5.12.28	Stanovení cytotoxické aktivity LtxA a HlyA	72
5.12.29	Produkce integrinu CD11b/CD18 v S2 buňkách.....	73
5.12.30	Stanovení prezentace antigenů na MHC molekulách I. třídy	75
5.12.31	Imunizace myši.....	75
5.12.32	T-buněčné testy	76
5.12.33	Test ochrany proti infekci <i>M. tuberculosis</i>	76
6	Výsledky	78
6.1	Produkce a purifikace podjednotky CD11b pro přípravu protilátek vhodných k detekci metodou Western blot	78
6.2	Produkce integrinu CD11b/CD18 v S2 buňkách - hmyzím expresním systému	83
6.2.1	Konstrukce plasmidů pro produkci integrinových podjednotek CD11b a CD18 a jejich extracelulárních domén	84
6.2.2	Produkce podjednotek CD11b a CD18 v S2 buňkách.....	89

6.2.3	Produkce extracelulární domény integrinu CD11b/CD18.....	93
6.3	RTX toxiny rozeznávají N-glykosidicky vázané oligosacharidové řetězce β_2 integrinových receptorů .	97
6.3.1	Glykosylace integrinu CD11b/CD18 je nezbytná pro vazbu CyaA	97
6.3.2	Specifické volné sacharidy selektivně inhibují vazbu CyaA na integrinový receptor CD11b/CD18....	103
6.3.3	Glykosylace integrinu CD11b/CD18 je nezbytná pro cytotoxickou aktivitu CyaA na buňkách produkujících CD11b/CD18.....	105
6.3.4	Rovněž glykosylace dalšího β_2 integrinu CD11a/CD18 je klíčová pro cytotoxickou aktivitu leukotoxinu (LtxA) a α -hemolysinu (HlyA)	106
6.3.5	Deglykosylace erytrocytů nemá vliv na vazebnou, invazivní a hemolytickou aktivitu CyaA a HlyA ..	107
6.4	Imunologické využití CyaA jako nosiče pro dopravu mykobakteriálních epitopů do antigen prezentujících buněk.....	109
6.4.1	Konstrukce rekombinantních proteinů a toxoidů CyaA	109
6.4.2	CyaA účinně dopravuje T-buněčný epitop TB10.4:20-28 pro prezentaci na molekulách MHC I	111
6.4.3	Imunizace CyaA-TB10.4 indukuje silnou TB10.4:20-28 specifickou CTL odpověď.....	113
6.4.4	Ochranné schopnosti podjednotkové vakcíny proti <i>M. tuberculosis</i> založené na rekombinantním proteinu TB10.4 nebo CyaA-TB10.4:1-96-OVA.....	114
7	Diskuse.....	116
7.1	Produkce integrinu CD11b/CD18	116
7.2	Analýza interakce RTX toxinů s β_2 integriny – role glykosylace receptorů ve vazbě RTX toxinů.....	118
7.3	Imunologické využití CyaA jako nosiče pro dopravu mykobakteriálních epitopů do antigen prezentujících buněk.....	121
8	Závěry.....	126
9	Literatura.....	128
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	141

2 ÚVOD

Adenylát cyklasový toxin (CyaA) je jedním z klíčových faktorů virulence bakterie *Bordetella pertussis*, původce černého kašle. CyaA se uplatňuje v raných fázích infekce, kdy je nutné potlačit imunitní odpověď hostitele¹. Přesný mechanismus, jakým toxin působí na cílové buňky, není zcela znám. CyaA se váže na integrin CD11b/CD18, nedávno objevený receptor pro tento toxin², který se nachází na některých myeloidních buňkách imunitního systému, jež jsou obzvláště citlivé k působení CyaA. CyaA má také unikátní schopnost pronikat přes cytoplasmatickou membránu cílových buněk nezávisle na receptorem zprostředkované endocytose. Toxin dopravuje svou adenylát cyklasovou doménu do cytosolu cílových buněk, kde tato po navázání endogenního kalmodulinu katalysuje nekontrolovatelnou přeměnu ATP na cAMP^{3,4}. Zvýšení hladiny intracelulárního cAMP pak vede k poruše buněčné signalizace a mikrobicidních funkcí fagocytárních buněk⁵.

Studium průniku CyaA do buněk je důležité ze dvou důvodů. CyaA je unikátní příklad proteinového toxinu schopného pronikat přímo cytoplasmatickou membránou buněk. Této jeho vlastnosti lze využít také pro indukci buněčných imunitních odpovědí. Rekombinantní detoxifikovaný CyaA nesoucí cizorodé epitopy je možno použít pro dopravu různých virálních nebo nádorových epitopů přímo do cytosolu antigen prezentujících buněk. To umožňuje prezentaci vnesených epitopů prostřednictvím molekul hlavního histokompatibilitního komplexu I. třídy (MHC I) a následnou indukci cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů (CTL)^{6,7}. Objev specifického receptoru pro toxin naznačuje možnost použití rekombinantního detoxifikovaného ACT rovněž jako vektoru pro dopravu cizorodých epitopů do endosomu a pro prezentaci prostřednictvím hlavního histokompatibilitního komplexu II. třídy (MHC II) a tím indukci CD4⁺ T-lymfocytů.

CyaA je také vhodným modelem pro studium interakce proteinů s biologickou membránou, ke studiu přímé translokace proteinů přes biologické membrány, ke studiu vlivu posttranslačních modifikací proteinů mastnými kyselinami na interakce protein-protein a protein-biologická membrána. CyaA poskytuje velmi zajímavý model studia jak z hlediska jeho biologických vlastností tak z hlediska jeho případného praktického použití pro přípravu nových vakcín nejen proti černému kašli^{8,9}, ale i proti celé řadě infekčních a nádorových onemocnění.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 INTERAKCE PATOGEN - HOSTITEL

Infekce je definována jako kolonizace organismu bakteriemi (patogeny), které způsobují onemocnění¹⁰. Patogeny mohou být rozděleny na primární, které vyvolávají onemocnění u zdravého hostitele, a podmíněné (oportunní), jež způsobují onemocnění jen tehdy, pokud jsou poškozeny přirozené obranné mechanismy a je snížena funkce imunitního systému. V hostitelském organismu se bakterie mohou množit volně bez vazby na hostitelskou buňku, takové patogeny označujeme jako extracelulární patogeny. Patogeny fakultativně intracelulární odolávají baktericidním mechanismům fagocytujících buněk (zejména makrofágů), uvnitř těchto buněk přežívají a dále se množí. Poslední skupinou jsou obligatorně intracelulární patogeny, které jsou metabolicky zcela závislé na eukaryotické buňce hostitele¹¹.

Patogenita je schopnost mikrobiálního druhu vyvolat onemocnění konkrétního hostitele a jejím kvantitativním vyjádřením je virulence. Patogenita závisí na druhových vlastnostech hostitele, a také na okamžitém funkčním stavu interagujících jedinců. U hostitele to je efektivita celé obranné soustavy bariér a prostředků k likvidaci patogena, u bakterie pak schopnost tvořit v dostatečném množství biochemické prostředky (faktory virulence) k poškození hostitele¹¹. Tvorba faktorů virulence je geneticky kódována buď chromosomálně, nebo extrachromosomálně na plasmidech^{10,11}. Faktory virulence se dají rozdělit do dvou skupin podle své funkce. První skupina (faktory invasivity) pomáhá bakteriím kolonizovat hostitele a proniknout do něj, druhá (toxiny) pak způsobuje vyřazení obranných funkcí imunitního systému a zpravidla odpovídá za poškození organismu^{10,11}.

Bakterie využívají různé mechanismy, kterými se navazují na buněčné povrchy. Jedním z nejdůležitějších je adherence. Tato interakce probíhá mezi adhesiny na bakteriálním povrchu a receptorem na eukaryotické buňce. Jako receptory většinou slouží membránové glykoproteiny nebo glykolipidy¹⁰. Odlišný způsob průniku do hostitelských buněk je spojen s interakcí mezi hostitelskou buňkou a bakterií s následnou změnou cytoskeletu hostitelské buňky, která umožní průnik bakterie. Příkladem by mohl být průnik salmonel, který probíhá na sliznici tenkého střeva¹¹.

Mnoho bakteriálních patogenů produkuje proteinové toxiny, které jsou schopny se vázat do plasmatických membrán eukaryotických buněk a zde vytvářet transmembránové póry a tím způsobit osmotickou lysi a buněčnou smrt. Bakteriální toxiny se mohou dělit podle

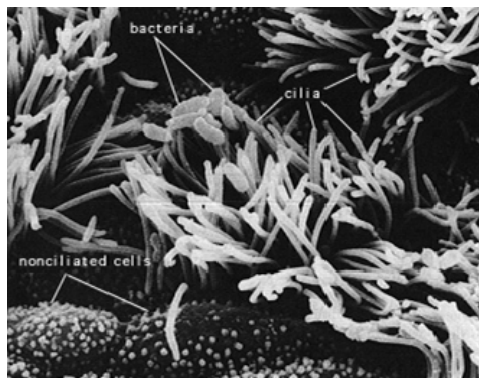
místa zásahu na neurotoxiny, enterotoxiny, dermonekrotoxiny, cytotoxiny, kardiotoxiny, leukotoxiny a hemolysiny^{10,11}. Na základě struktury mohou být toxiny rozděleny do tří skupin. (i) A-B toxiny své jméno získaly podle toho, že jedna část toxinu (B) se po vazbě na receptor oddělí od enzymaticky aktivní části (A), která je zodpovědná za toxicitu molekuly. Do této skupiny patří většina bakteriálních toxinů. (ii) Druhý typ toxinů nemá zřetelně oddělenou část A a B a jejich působením dochází k narušení buněčné membrány hostitele. Do této skupiny patří hemolysiny a fosfolipasy. (iii) Superantigeny, které také nemají uspořádání typu A-B toxinů, stimulují T-buňky k uvolňování cytokinů¹⁰.

3.2 *BORDETELLA PERTUSSIS*

Rod *Bordetella* zahrnuje několik členů, *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* jsou významnými savčími patogeny, *B. avium* patří mezi patogeny ptáků a zbylé druhy jsou jen vzácně izolovány z klinických vzorků, ačkoli některé z nich mohou být příležitostným patogenem. Nejlépe prostudovanými druhy jsou *B. pertussis*, *B. bronchiseptica* a *B. parapertussis*, jejichž genomy byly v nedávné době osekvenovány¹². *B. pertussis* je gramnegativní, krátká, nepohyblivá tyčinka, která způsobuje infekční respirační onemocnění černý kašel (pertusi) (**Obr. 1**) a je obligátním lidským patogenem. Infekce *B. parapertussis* vyvolává podobné onemocnění, avšak s mírnějšími příznaky, kromě u lidí je schopná vyvolat onemocnění také u ovcí^{13,14}. Naproti tomu *B. bronchiseptica* osidluje dýchací trakt psů a u vepřů vyvolává chronickou atrofickou rhinitis, která je často doprovázena koinfekcí *Pasteurella multocida*^{15,16}.

Černý kašel postihuje především děti v předškolním věku a lze ho charakterizovat jako lokalizované onemocnění dýchacích cest se specifickými projevy, jako je paroxysmální kašel, neurologické projevy (pertussová encefalopatie) a leukocytosa. Průběh onemocnění lze rozdělit do tří klinických stádií. V první fázi nazývané katarální stadium, kdy se nemoc projevuje nespecifickými příznaky (kašel a symptomy podobné běžnému nachlazení), lze bakterii vykultivovat z faryngálních výtěrů. V této fázi lze rozvoj onemocnění (především délku) ovlivnit antimikrobiální léčbou. Ve druhém až třetím týdnu onemocnění nastupuje paroxysmální stadium (toxemické). Opakují se záchvaty prudkého, suchého a křečovitého kašle, který je doprovázen nadměrnou produkcí hlenu a zvracením. V pokročilém stadiu se kašel může stát tak prudkým, že způsobí cyanosu. V tomto stadiu nemoci již bakterii nelze vykultivovat z horních cest dýchacích. Příznaky choroby jsou způsobeny faktory virulence, především toxiny. Konečnou fází nemoci je stadium rekonvalescence, v němž záchvaty kašle mizí. Průběh nemoci je často zhoršen druhotnou infekcí pyogenními koky¹⁷.

Bordetella pertussis osidluje výhradně řasinky na respiračním epitelu, především v průdušnici a bronších, a blokuje tak jejich funkci. Tím uniká běžné imunitní odpovědi¹⁸⁻²¹.



Obr. 1: Kolonizace tracheálních epitelálních buněk *B. pertussis* (www.textbookofbacteriology.net).

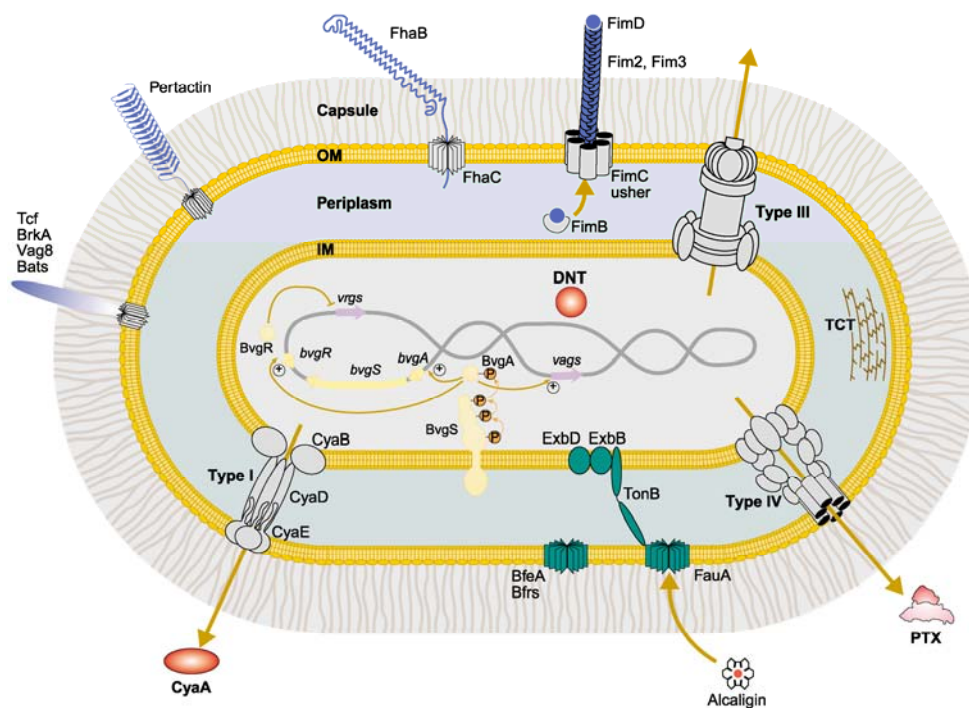
Ve vyspělých zemích byla tato choroba téměř vymýcena díky masivnímu očkování. Nicméně v posledních letech byl zaznamenán nárůst případů této nemoci v zemích, které začaly s očkováním jako první. Důvodem je zřejmě slábnutí specifické imunity dospělých jedinců s prodlužujícím se odstupem po vakcinaci, což vede k přenosu infekce z často asymptomatických, ale nakažených jedinců na neimunizované kojence a malé děti¹⁶. Ročně je zaznamenáno několik desítek miliónů nových případů, z toho asi 300 000 lidí na nemoc umírá²². První celobuněčná vakcína proti černému kašli byla vyvinuta v roce 1940²³ a byla připravována chemickou nebo tepelnou inaktivací bakterie *Bordetella pertussis*. Donedávna užívanou vakcínou byla suspenze usmrčených bakterií *B. pertussis*, která byla vyvinuta v roce 1956. Používala se jako monovakcína nebo jako součást trivalentní vakcíny DTP (**D**iphtheria, **T**etanus, **P**ertusse). Vakcinace touto celobuněčnou vakcínou však občas způsobovala vedlejší účinky, jako např. nevolnost, zvracení, bolest, otoky a vyrážku kolem místa vpichu, či horečky a aseptické abscesy někdy až anafylaktický šok. Proto bylo vyvinuto několik typů bezbuněčných vakcín proti černému kašli složených z jedné nebo více složek, zejména pertusového toxinu a vláknitého hemaglutininu²⁴⁻²⁶. V EU byla nyní zavedena vakcína aP (**A**cellular **P**ertussis), obsahující pertusový toxin, vláknitý hemaglutinin a pertaktin²⁷. Dalším vhodným kandidátem pro využití v bezbuněčné vakcíně je adenylát cyklasový toxin (CyaA) jako hlavní faktor virulence bakterie *B. pertussis*⁸.

3.2.1 FAKTORY VIRULENCE BAKTERIE *BORDETELLA PERTUSSIS*

Bordetella pertussis produkuje celou řadu faktorů virulence, které umožňují bakterii vstupovat do hostitelského organismu, interagovat s cílovými buňkami, čelit imunitní obraně hostitele a umožnit pomnožení bakterie v hostitelském organismu. Dají se rozdělit do dvou

skupin, a to na toxiny a adhesiny^{18,28} (**Obr. 2**). Do skupiny adhesinů patří vláknitý hemaglutinin (FHA), autotransporter – pertaktin (PRN), tracheální kolonizační faktor (TCF) a fimbrie (Fim)²⁹.

Vláknitý hemaglutinin (FHA), protein o molekulové hmotnosti 220 kDa³⁰, je hlavní adhesivní molekulou bakterie. Na buněčném povrchu vytváří typické filamentosní struktury, které však nemají uspořádanou strukturu charakteristickou pro fimbrie. FHA je asociován s vnější bakteriální membránou nebo je případně také sekretován do extracelulárního prostředí³¹. FHA také obsahuje tři různá vazebná místa - pro glykoaminoglykany³², pro sacharidové struktury³³ a RGD sekvenci, díky níž se váže k integrinu CD11b/CD18³⁴. FHA tedy vykazuje schopnost vázat se jak k řasinkovým epiteliálním buňkám, tak i k buňkám imunitního systému³⁴.



Obr. 2: Faktory virulence bakterie *Bordetella pertussis*. *B. pertussis* je gramnegativní bakterie s vnitřní a vnější membránou (IM a OM), periplasmou a kapsulí. Modře jsou znázorněny adhesiny (FHA, Fim, TCF, BrkA, Vag8, Bats a pertaktin), červeně pak toxiny (CyaA, PTX a DNT). Pomocné a transportní proteiny jsou šedé, proteiny absorbující železo jsou znázorněny zeleně. Běžový je regulační systém složený z proteinů BvgA a BvgS. Velké hnědé šipky znázorňují export, respektive import faktorů virulence a sideroforů. Slabší hnědé šipky ukazují fosforylační a regulační dráhy²⁸.

Pertaktin (PRN), protein o velikosti 69 kDa, se nachází na vnější bakteriální membráně. Interakci mezi savčími buňkami a tímto proteinem zajišťuje také specifický triplet aminokyselinových zbytků RGD. Ačkoli PRN obsahuje dva RGD triplety (v poloze 225-227 a 665-667), pouze N-koncový se podílí na vazbě k buňce³⁵.

Kromě tří nejdůležitějších proteinových toxinů, pertusového toxinu (PTX), dermonekrotického toxinu (DNT) a adenylát cyklosového toxinu (CyaA), produkuje *B. pertussis* ještě některé neproteinové toxiny, jako je tracheální cytotoxin (TCT) a endotoxin lipopolysacharid (LPS).

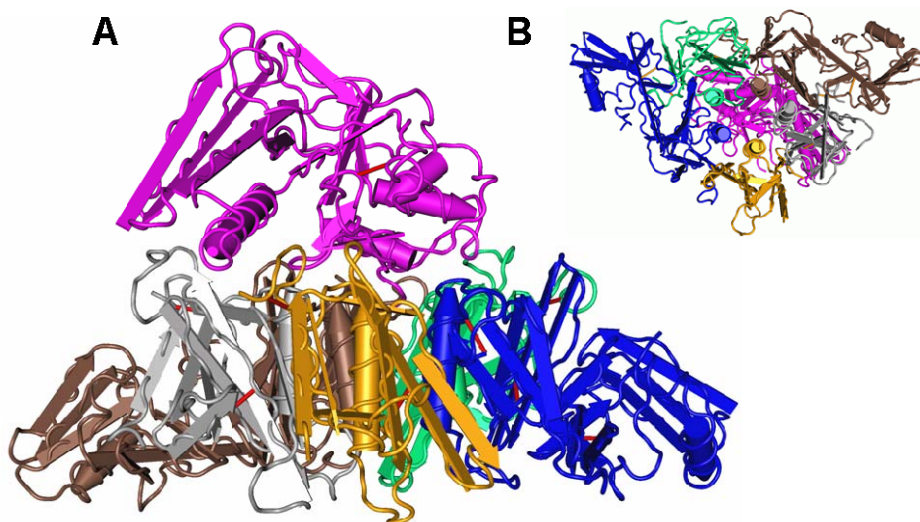
Tracheální cytotoxin (TCT) je muramylpeptid³⁶, který je uvolňován během bakteriální lyse, nebo jako výsledek přirozené obměny peptidoglykanu během bakteriálního růstu, je produkován jak ve virulentní, tak v nevirulentní fázi bakterie¹⁵. TCT stimuluje uvolňování interleukinu 1, ten následně indukuje tvorbu syntasy oxidu dusného. To vede k nadprodukcí oxidu dusného pohárkovými buňkami sliznice a poškození sousedících řasinkovitých epitelálních buněk³⁷.

Dermonekrotický toxin (DNT) je na rozdíl od ostatních proteinových toxinů produkováných *B. pertussis* intracelulárním toxinem, uvolňovaným až po lysi bakteriální buňky³⁸. Někdy se také nazývá termolabilní toxin vzhledem k tomu, že po 60 minutách v 56°C je plně inaktivován³⁹. Svůj název dostal podle charakteristických kožních lesí, které toxin způsobí po podání pokusným zvířatům. DNT je produkován bakterií jako 1451 aminokyselinových zbytků dlouhý protein o molekulové hmotnosti 160 kDa^{40,41}. Na základě primární struktury může být DNT rozdělen na dvě funkční domény. N-koncová část tvoří vazebné místo pro receptor a C-koncová doména vykazuje enzymatickou aktivitu, proto je DNT členem rodiny toxinů typu A-B. Po vazbě na receptor cílových buněk dochází k proteolytickému štěpení DNT, které oddělí N-koncový fragment od katalytické domény. Odštěpená část bez prvních 44 aminokyselinových zbytků je schopná se disociovat z receptoru a translokovat se přes lipidovou dvojvrstvu do cytosolu. Jakmile je toxin v cytoplasmě cílových buněk, jeho katalytická doména zprostředkuje deaminaci malých GTPas Rho⁴², Rac a Cdc42⁴³. To vede ke změně v cytoskeletonu buněk a až k jejich nekroze⁴⁴.

Pertusový toxin (PTX) patří mezi největší složené rozpustné bakteriální exoproteiny (117 kDa). Tvoří jej pět různých podjednotek, nazvaných S1 až S5 podle jejich klesajících molekulových hmotností. Podjednotky jsou uspořádány do hexamerní struktury s následující stechiometrií: 1S1:1S2:1S3:2S4:1S5⁴⁵. PTX patří mezi toxiny typu A-B₅, ve kterých pět podjednotek B zajišťuje vazbu na specifické buněčné receptory a umožňuje tak katalytické části A průnik do cílových buněk. Část B se skládá z podjednotek S2 až S5 a tvoří trojhrannou základnu, na níž se svým C-koncem váže podjednotka S1, která představuje katalytický díl A⁴⁶ (**Obr. 3**). Toxin je aktivně sekretován *B. pertussis*⁴⁷ a patří mezi hlavní faktory virulence této bakterie, jako takový hraje nezastupitelnou roli v patogenesi černého kašle⁴⁸,

ale zároveň je i důležitou komponentou vakcíny proti černému kašli²⁷. PTX je doposud nejlépe prostudovaným toxinem této bakterie¹⁵.

Působení PTX na molekulární úrovni se dá rozdělit na čtyři hlavní kroky: (i) vazba na receptor cílových buněk, (ii) vnitrobuněčný transport, (iii) translokace enzymaticky aktivní podjednotky S1 přes membránu a (iv) ADP-ribosyltransferasová aktivita podjednotky S1. Na buněčný receptor se PTX váže přes B oligomer a poté vstupuje do buněk pomocí receptorem zprostředkované endocytosy. Podjednotka S1 v cytosolu katalysuje přenos ADP-ribosylu z NAD^+ na α -podjednotku inhibičního G proteinu. Tato modifikace vede ke ztrátě schopnosti α -podjednotky vyměnit GDP za GTP a tím ke ztrátě možnosti inhibovat endogenní adenylát cyklastu⁴⁹, což vyústí v nekontrolovatelný růst intracelulárního cyklického AMP.

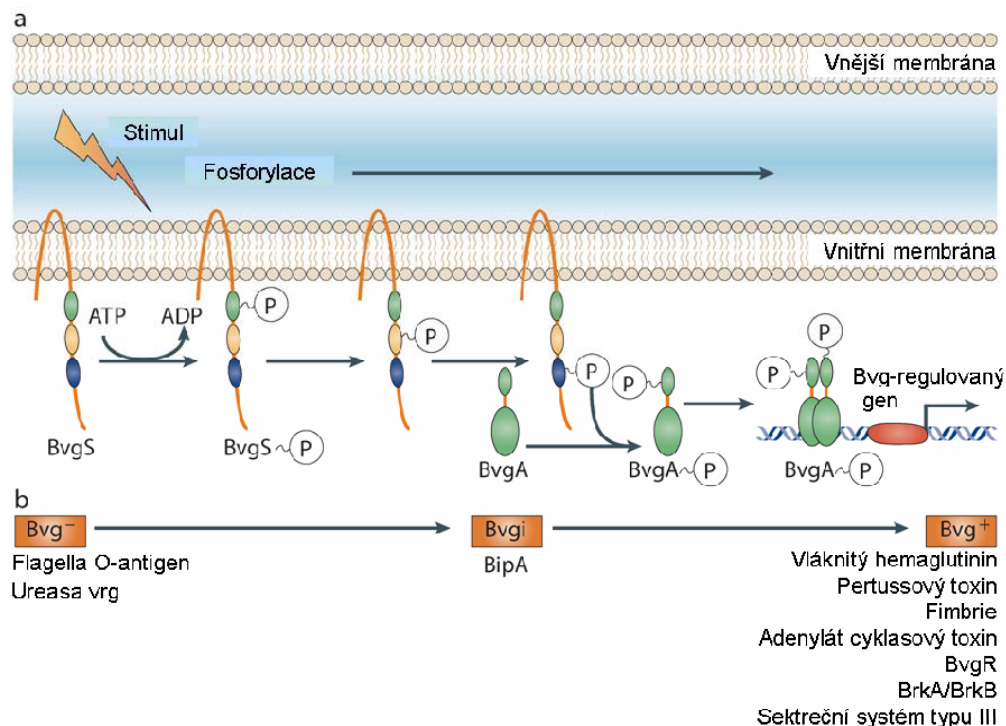


Obr. 3: Krystalová struktura pertusového toxinu. PTX se skládá z pěti různých podjednotek (značené různými barvami), které jsou uspořádány do hexamerní struktury. Disulfidické vazby, které se tvoří během skládání toxinu jsou znázorněny červeně. **A)** Pohled ze strany, **B)** pohled ze spodu⁴⁶.

PTX ovlivňuje fyziologii napadené buňky mnoha způsoby, mezi něž patří morfologické změny, exokrinní sekrece, stimulace lipolysy, dále aktivace buněk Langerhansových ostrůvků, zvýšení citlivosti k histaminu a mnoho dalších.

Geny, kódující faktory virulence, jsou rozptýleny podél chromosomu a tvoří operon²⁸. Exprese těchto genů je pod kontrolou lokusu *bvgAS* (**B**ordetella **V**irulence **G**ene)^{8,29,50}. Ten kóduje dva proteiny, cytoplasmatický aktivátor transkripce BvgA a transmembránový protein BvgS, jenž působí jako senzor^{51,52} (**Obr. 4**). BvgS funguje jako transmembránová histidinová kinasa, která reaguje na signály z vnějšího prostředí autofosforylací histidinového zbytku. Fosfátová skupina je poté přenesena na zbytek aspartátu

a další zbytek histidinu BvgS, ze kterého je nakonec transportován na aspartátový zbytek DNA-vazebného transkripčního aktivátoru BvgA⁵³⁻⁵⁵. Molekula BvgA je fosforylací aktivována a váže se na specifické sekvence v promotorových oblastech genů důležitých pro virulenci bakterií a aktivuje jejich transkripci.



Obr. 4: Dvousložkový systém Bvg. Po přijetí stimulu z periplasmatického prostoru dojde k fosforylaci BvgS (pravděpodobně za účasti ATP) a tím k jeho aktivaci. Konečným příjemcem fosfátové skupiny je BvgA, který dále slouží jako regulátor transkripce a aktivuje přepis některých genů. Tento Bvg-aktivovaný stav se nazývá Bvg⁺ fáze. Pokud systém není aktivní, nachází se bakterie v Bvg⁻ fázi a exprimují se geny pro tuto fázi charakteristické. Rozpoznání intermediární fáze BvgI, která zahrnuje expresi BvgI specifických genů, naznačuje, že systém Bvg reguluje široké spektrum dějů⁵⁶.

3.3 RTX ADENYLÁT CYKLASOVÝ TOXIN

3.3.1 RTX TOXINY

Bylo identifikováno několik různých geneticky, strukturně a funkčně odlišných rodin toxinů, tvořících póry, z nichž rodina RTX (**R**epeat in **T**o**X**in) toxinů tvoří jednu z největších.

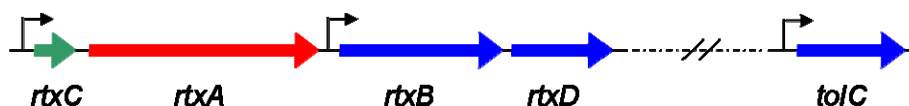
RTX toxiny jsou sekretovány celou řadou gramnegativních bakterií, z nichž většina patří mezi lidské, živočišné nebo rostlinné patogeny. Označení RTX je odvozeno od výskytu několika charakteristických a funkčně důležitých nonapeptidových repetitivních sekvencí. Mezi jednotlivými RTX toxiny existuje poměrně vysoký stupeň homologie. Největší rozdíly v aminokyselinovém složení se vyskytují v N-koncové oblasti⁵⁷. RTX toxiny vykazují několik společných charakteristických rysů, kterými se odlišují od ostatních bakteriálních exoproteinů⁵⁸. K těm patří:

1. Výskyt převážně kladně nabitých skupin v N-koncové oblasti a záporně nabitých zbytků v C-koncové oblasti proteinu^{59,60}.
2. Pro syntézu RTX toxinů a jejich sekreci je nutná přítomnost několika genů, které se většinou nachází ve stejné části chromosomu a často vytváří operon. V některých případech se tyto geny mohou nalézat také na plasmidech⁶¹.
3. Sekrece RTX toxinů z bakterií do vnějšího prostředí není závislá na N-koncovém signálním peptidu, ale na sekvenci nacházející se v C-koncové části molekuly, která není během exportu odštěpována. Tato sekvence bývá označována jako C-koncový sekreční signál⁶¹.
4. Sekrece každého proteinu je zprostředkována specifickým sekrečním aparátem, který je tvořen třemi různými typy membránových proteinů a rozpoznává C-koncový sekreční signál⁶².
5. Sekretované RTX toxiny se během exportu nehromadí v periplasmatickém prostoru buňky⁶³.
6. Všechny RTX toxiny nesou v C-koncové části molekuly, před C-koncovým sekrečním signálem, několik nonapeptidových repetitivních sekvencí s konsenzuálním motivem L/I/F-X-G-G-X-G-N/D-D-X (kde X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek). Jejich počet je u jednotlivých proteinů různý. Tyto repetitivní sekvence jsou schopny vázat vápenaté ionty⁶¹.
7. Strukturní gen pro toxin kóduje inaktivní protein, který přechází v aktivní formu teprve po kovalentní posttranslační modifikaci zbytkem mastné kyseliny. Tato modifikace je umožněna proteinem kódovaným jiným genem⁶¹.

RTX toxiny představují různorodou skupinu toxinů, která hraje důležitou roli ve virulenci mnoha gramnegativních bakterií, mezi něž patří *Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Moraxella bovis* a bakterie rodiny *Pasteurellaceae* (rody: *Mannheimia*, *Pasteurella* a *Aggregatibacter*). Skupina zahrnuje cytotoxiny, které podle specifity k cílovým buňkám rozdělujeme na hemolysiny schopné lysovat různé buněčné typy eukaryotních buněk včetně erytrocytů a leukotoxiny, jejichž cílová specifita je omezena^{61,64}. Například α -hemolysin HlyA bakterie *E. coli* je cytotoxický pro širokou škálu buněk, působí na erytrocyty, granulocyty^{65,66}, monocyty⁶⁷ a endoteliální buňky⁶⁸. Naproti tomu leukotoxiny bakterie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (LtxA) a *Pasteurella haemolytica* (LktA) jsou toxické pouze pro omezenou druhově specifickou skupinu buněk⁶⁹⁻⁷². Teprve nedávno byla objevena nová skupina RTX toxinů, jejímž zástupcem je RtxA – 4500 aminokyselinových zbytků dlouhý

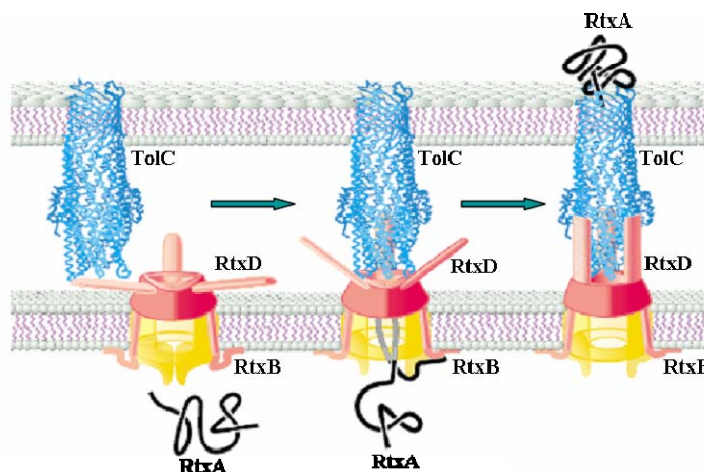
protein z bakterie *V. cholerae*, který způsobuje depolymerizaci F-aktinových vláken mnoha typů buněk⁷³.

Operon RTX toxinů se sestává ze čtyř genů, které jsou uspořádány v pořadí *rtxC*, *rtxA*, *rtxB* a *rtxD* (**Obr. 5**). Translací genu *rtxA* vzniká inaktivní toxin, tzv. protoxin, který je aktivován posttranslační modifikací zbytkem mastné kyseliny⁷⁴. Tuto modifikaci zajišťuje produkt genu *rtxC*. Produkty genů *rtxB* a *rtxD* jsou specifickými složkami transportního systému pro daný toxin – ABC protein a adaptorový protein daného ABC transportéru. Gen, který kóduje složku vnější membrány sekrečního aparátu (*tolC*), zpravidla vytváří samostatnou transkripční jednotku na jiném místě bakteriálního chromosomu⁷⁵. TolC je součástí několika různých transportních systémů.



Obr. 5: Schematické znázornění obecného *rtx* lokusu. Silné barevné šipky znázorňují geny nezbytné pro syntézu (červeně), aktivaci (zeleně) a sekreci (modře) RTX toxinů. Tenké šipky představují promotor.

RTX toxiny jsou transportovány z cytoplasmy na buněčný povrch pomocí sekrečního systému typu I, který se skládá z proteinů RtxB, RtxD a proteinu podobnému TolC. Protein RtxB je ATPasa patřící do rodiny ABC (**A**TP-**B**inding **C**assette) transportních proteinů⁷⁶⁻⁷⁸. V N-koncové části proteinu je lokalizováno osm hydrofobních transmembránových α -helixů, kterými je RtxB zakotven ve vnitřní membráně^{62,79}, C-koncová část RtxB se nachází v cytoplasmě a zprostředkovává vazbu a hydrolysu ATP, čímž poskytuje energii pro export a možná i pro tvorbu počátečního kanálu přes vnitřní membránu. Protein RtxD patří do MFP (**M**embrane **F**usion **P**rotein)⁸⁰, vytváří velkou periplasmatickou doménu, pomocí které umožňuje translokase reversibilně interagovat s trimerním proteinem TolC vnější membrány a tím také tvorbu transperiplasmatického kanálu (**Obr. 6**). Sekreční systém typu I závisí na neodštěpitelném C-koncovém sekrečním signálu o přibližně 50 aminokyselinových zbytcích^{81,82}. Export proteinu probíhá v jednom energeticky spřaženém kroku, toxin je přenesen na buněčný povrch přes vnitřní i vnější membránu a zde zaujímá svou nativní konformaci. Tento relativně jednoduchý sekreční systém typu I je schopný v gramnegativních bakteriích přenášet na povrch buňky polypeptidy o molekulární hmotnosti až 800 kDa během několika sekund⁸³.

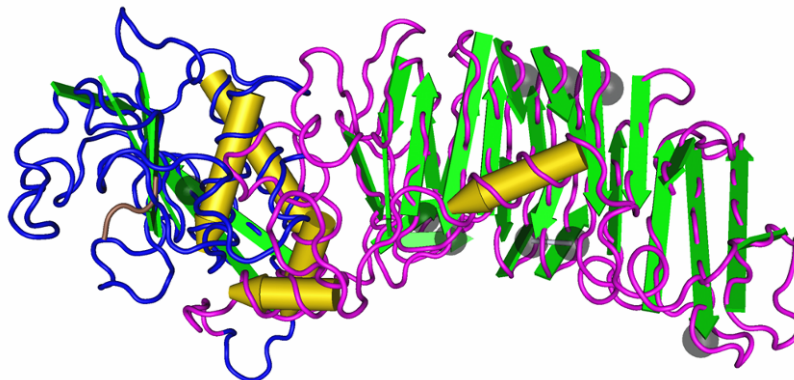


Obr. 6: Model mechanismu sekrece RTX toxinu pomocí RtxBD/TolC aparátu. Kanálovitý protein TolC zanořený do vnější membrány v klidovém stavu neinteraguje s membránovým proteinem RtxD a ABC transportérem RtxB. RtxD a RtxB tvoří stabilní komplex ve vnitřní membráně. Rozeznání sekretovaného proteinu RtxA pomocí RtxB ve spolupráci s RtxD indukuje konformační změny v perioplasmatické doméně RtxD a asociaci s kanálovitým proteinem TolC. Je vytvořen transperiplasmatický kanál, který umožní export RtxA. Po ukončení procesu sekrece se proteiny RtxBD/TolC aparátu opět vrací do odděleného klidového stavu⁸⁴.

RTX toxiny potřebují pro svou aktivitu vápenaté ionty⁸⁵, které se váží do nonapeptidových repetitivních sekvencí v C-koncové části toxinu⁸⁶⁻⁸⁸, jak bylo nejdříve ukázáno pro α -hemolysin z *E. coli* a CyaA *B. pertussis*. 3D struktura alkalické proteasy bakterie *P. aeruginosa* (**Obr. 7**) ukázala, že tyto repetitivní sekvence tvoří novou strukturu pro vazbu vápníku, nazývanou β -helix⁸⁹. Prvních šest aminokyselinových zbytků každého motivu tvoří ohyb, do kterého se váží Ca^{2+} ionty, a zbylé tři zbytky tvoří krátký β -list. Takovéto uspořádání otáček a β -listů vytváří pravotočivý helix paralelních β -listů, kde jeden závit helixu odpovídá dvěma po sobě jdoucím nonapeptidovým motivům. K vazbě vápenatých iontů dochází nejspíše až po sekreci toxinu, protože cytoplasmatická koncentrace Ca^{2+} iontů v bakteriích je velmi nízká, např. v *E. coli* je velmi přísně regulována a udržována na konstantní hladině okolo $1 \mu\text{M}$ ⁹⁰, což je o dva řády nižší koncentrace, než jaká je potřeba pro plnou aktivitu HlyA *E. coli*⁹¹.

Interakce RTX toxinů s membránami cílových buněk se dá rozdělit do dvou kroků, na vratnou adsorpci a nevratnou inserci do membrány^{92,93}. Pasivní adsorpci RTX toxinů je možné na buňkách detekovat⁹⁴, což naznačuje, že adsorpce toxinu na buněčnou membránu nemusí být následována jeho insercí do membrány a buněčnou lysisí. Po inserci do buněčné membrány prochází toxin nevratnou konformační změnou⁹⁵, po které je možno jej uvolnit pouze za použití detergentu⁹⁶. RTX toxiny tvoří kation-selektivní póry definované velikosti s krátkou dobou života (pouze několik sekund)⁹⁷⁻¹⁰³. Mechanismus inserce RTX toxinu do membrány ani tvorby póru zatím není znám. Podle některých studií je za tvorbu pórů zodpovědná hydrofobní doména lokalizovaná v N-koncové části RTX toxinu¹⁰⁴⁻¹⁰⁷, podle

jiných, provedených na HlyA bakterie *E. coli*, je tento úsek důležitý pro inserci do membrán cílových buněk^{108,109}.



Obr. 7: 3D-struktura alkalické proteasy bakterie *P. aeruginosa*. Uspořádání po sobě jdoucích otáček a β -listů (zeleně) RTX domény (růžově) vytváří pravotočivý helix paralelních β -listů - nazývaný paralelní β -helix, který váže vápenaté ionty (černé koule). Modře je znázorněna katalytická doména a žlutě α -helixy⁸⁹.

Zda je tvorba pórů závislá na oligomerizaci RTX proteinů, není zatím jasné. Přestože byly RTX toxiny izolovány z membrán pouze jako monomery^{97,110,111}, tak analýsa odpovědi závislé na dávce RTX toxinu naznačuje, že lyse cílových buněk je vysoce kooperativní děj, který pravděpodobně zahrnuje oligomerizaci toxinu^{66,112-116}. Tuto teorii podporuje i pozorování, že vzájemnou *in vitro* komplementací párů neaktivních deletovaných variant HlyA bakterie *E. coli* a CyaA bakterie *B. pertussis* lze obnovit jejich hemolytickou aktivitu, což naznačuje, že k agregaci dvou nebo více molekul toxinu dochází ještě před tvorbou póru^{117,118}.

V posledních několika letech byla řešena otázka buněčného receptoru RTX toxinů. Bylo ukázáno, že významnou úlohu ve vazbě RTX toxinů na leukocyty hrají především β_2 integriny¹¹⁹⁻¹²¹. Jako specifický buněčný receptor pro CyaA bakterie *B. pertussis* slouží integrin CD11b/CD18². Přestože však HlyA bakterie *E. coli* vykazuje velkou homologii s CyaA, tak jeho vazba na leukocyty je specifická pouze při nízkých koncentracích⁶⁴. Příčinou toho je jeho interakce s integrinem CD11a/CD18¹¹⁹. Jiná studie však ukazuje, že vazbu HlyA na buňky nelze saturovat a že tedy toxin, při vazbě na granulocyty, nemá specifický buněčný receptor¹²². Dalším příkladem toxinů, pro které byl zjištěn receptor, jsou leukotoxiny bakterií *A. actinomycetemcomitans* (LtxA) a *P. haemolytica* (LktA). LtxA je specifický pro lidské leukocyty, kdežto LktA pro hovězí, přesto je receptorem obou integrin CD11a/CD18¹¹⁹⁻¹²¹. Zatím však není jasné, zda existuje nějaký receptor, který zprostředkovává vazbu RTX toxinů na erythrocyty. I když v nedávné době bylo ukázáno, že jako alternativní receptor pro α -hemolysin z *E. coli* na membránách erythrocytů by mohl sloužit glykoforin¹²³.

Jorgensen a spolupracovníci ukázali, že α -hemolysin bakterie *E. coli* způsobuje rychlý vstup Ca^{2+} iontů z extracelulárního prostoru a zároveň únik K^+ iontů přes plasmatickou membránu ven z erytrocytů¹²⁴. Pozdější studie dokázaly, že i některé další RTX toxiny, např. LktA bakterie *P. haemolytica*, LtxA bakterie *A. actinomycetemcomitans*, způsobují nekontrolovatelný vstup Ca^{2+} iontů do cílových buněk^{114,125}. Cytosolická koncentrace Ca^{2+} iontů v cílových buňkách je velmi přísně regulována a změny v jejich koncentraci patří mezi významné mechanismy buněčné signalizace^{126,127}. Mezi základní strategie patogenů pro manipulaci s hostitelskými buňkami proto patří zvýšení či snížení koncentrace volných Ca^{2+} iontů v cytosolu cílových buněk¹²⁸. Např. změna koncentrace Ca^{2+} iontů v buňkách Jurkat, způsobená LtxA, spustí řadu dějů, které zahrnují mimo jiné aktivaci kalpainu, štěpení talinu, mobilizaci a částečné seskupování β_2 integrinů do lipidových raftů a následně buněčnou lysi¹²⁹. Některé výsledky naznačují, že vstup vápníku vyvolaný sublytickou dávkou RTX toxinu vyvolá zánětlivou odpověď¹³⁰⁻¹³². Nicméně stále přetrvává diskuse o mechanismu, kterým RTX toxiny napomáhají vstupu vápníku do buněk.

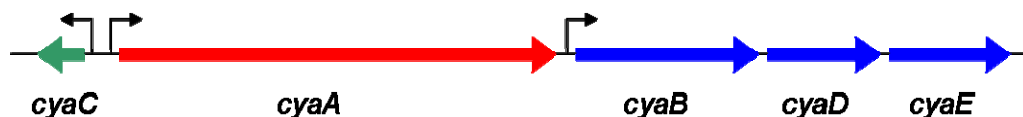
3.3.2 ADENYLÁT CYKLASOVÝ TOXIN (CyaA)

Adenylát cyklasový toxin (CyaA, ACT nebo AC-Hly) je klíčovým faktorem virulence bakterie *B. pertussis*, který hraje důležitou roli v raných stádiích kolonizace respiračního traktu^{133,134}. Mutantní kmeny *B. pertussis* v genu *cyaA* jsou totiž zcela avirulentní^{135,136}. CyaA se přednostně váže na myeloidní fagocytující buňky produkující integrinový receptor CD11b/CD18². Po translokaci katalyticky aktivní AC-domény do buněk, tato váže eukaryotní kalmodulin a následně katalysuje přeměnu intracelulárního ATP na cAMP, klíčovou molekulu v buněčné signalizaci. To vede k řadě buněčných signálů, a tím ke změně či paralyse buněčných baktericidních funkcí nebo k indukci apoptosy.

3.3.2.1 Produkce a sekrece CyaA

Produkce a sekrece adenylát cyklasového toxinu vykazuje rysy charakteristické pro celou RTX rodinu toxinů. CyaA je kódován lokusem *cya* (**Obr. 8**), který je pod kontrolou dvousložkového transdukčního systému BvgA/S¹³⁷ (**Obr. 4**). Geny *cyaABDE* jsou lokalizovány v jednom operonu^{138,139}, který začíná strukturálním genem *cyaA* kódujícím inaktivní protoxin proCyaA. Následuje gen pro ATPasu vnitřní membrány (CyaB), membránový fúzní protein (CyaD) a složka kanálu vnější membrány (CyaE – homolog TolC (**Obr. 6**)), která je charakteristickou součástí sekrečního systému typu I¹⁰⁵. Geny *cyaABDE* jsou přepisovány do jedné mRNA ze společného promotoru umístěného před genem *cyaA*¹³⁹.

Geny *cyaBDE* mohou také být přepisovány z promotoru ležícího mezi geny *cyaA* a *cyaB*¹³⁹, který je ale na rozdíl od výše zmíněného konstitutivní povahy a umožňuje syntézu pouze malého množství mRNA. Gen *cyaC* leží před genem *cyaA*. Je přepisován v opačném směru a kóduje syntézu proteinu CyaC – acyltransferasy, která katalysuje posttranslační modifikaci proCyaA mastnou kyselinou¹⁴⁰.



Obr. 8: Schematické znázornění *cyaCABDE* lokusu²¹. Gen *cyaA* kóduje protoxin CyaA. Další tři strukturální geny *cyaBDE* kódují proteiny nezbytné pro sekreci CyaA¹⁰⁵. Geny *cyaABDE* jsou přepisovány do jedné mRNA ze společného promotoru umístěného před genem *cyaA*. Geny *cyaBDE* jsou také přepisovány z promotoru ležícího mezi geny *cyaA* a *cyaB*¹³⁹. Gen pro acyltransferasu *cyaC*, která převádí protoxin do aktivní formy, leží před genem *cyaA* a je přepisován v opačném směru¹⁴⁰. Silné barevné šipky znázorňují geny nezbytné pro syntézu (červeně), aktivaci (zeleně) a sekreci (modře) CyaA. Tenké šipky představují promotor.

Předpokládá se, že toxin je sekretován podobným mechanismem jako RTX α -hemolysin (HlyA) *E. coli* pomocí HlyBD/TolC aparátu. Model mechanismu sekrece α -hemolysinu je znázorněn na **Obr. 6**^{59,141}. Protein CyaB by analogicky ve spolupráci s CyaD mohl rozeznávat C-terminální neodštěpovaný sekreční signál CyaA¹⁴² a řídit tak sekreci rozbaleného CyaA polypeptidu skrze trimerní CyaBDE tunelovou jednotku, přímo z bakteriální cytoplasmy do externího média bez toho, že by docházelo ke vstupu CyaA do periplasmatického prostoru^{59,141,143}.

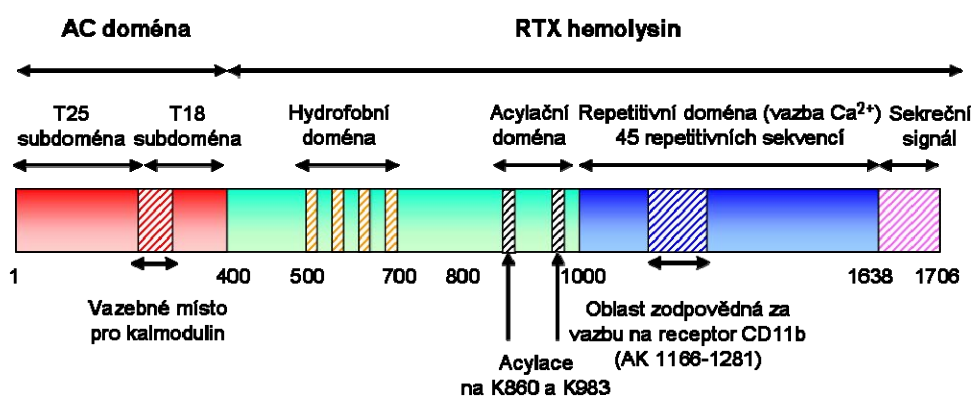
CyaA však narozdíl od ostatních RTX proteinů, které jsou po své sekreci uvolňovány do okolního prostředí, zůstává z velké části asociován s bakteriálním povrchem *B. pertussis* pomocí interakce s vláknitým hemaglutininem^{144,145}. Nicméně takto zachycený toxin je pravděpodobně agregovaný a neschopný sloužit jako kontaktní zbraň bakterie. Pouze nově sekretované molekuly toxinu jsou schopny napadat cílové buňky. Adhese bakterií na cílové buňky napomáhá paralýze buňky toxinem, neboť vzhledem k vyšší lokální koncentraci toxinu dochází k účinnější vazbě toxinu na buňku¹⁴⁶⁻¹⁴⁸.

3.3.2.2 Struktura a biologická aktivita CyaA

CyaA je jedinečný mezi RTX toxiny, protože jako bifunkční toxin je schopen translokovat svoji adenylát cyklasovou doménu přes plasmatickou membránu cílových buněk a zároveň permeabilizuje buněčnou membránu vytvářenými póry. CyaA je schopen přímé translokace přes cytoplasmatickou membránu do cytosolu cílových buněk aniž by k dopravě do cytosolu potřeboval endocytosu¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Tento vstup CyaA do buněk translokací přes membránu je zprostředkován jediným 1706 aminokyselinových zbytků dlouhým

polypeptidem (177 kDa). CyaA je tvořen dvěma strukturálně nezávislými částmi: adenylát cykласou, která je unikátní pro CyaA a není součástí žádného z ostatních RTX toxinů, a RTX hemolysinem, jenž je homologní s ostatními RTX toxiny^{138,152} (**Obr. 9**).

RTX hemolysinová část (Hly) CyaA (asi 1300 aminokyselinových zbytků) je sama o sobě schopná tvořit v membránách malé kation-selektivní póry o průměru 0,6 až 0,8 nm^{100,152}. Ty mohou permeabilizovat membrány cílových buněk a iniciovat koloidně-osmotickou lysi erytrocytů¹⁵³. V hemolysinové části se nalézá několik funkčních domén^{87,118}. Obsahuje (i) hydrofobní kanálotvornou doménu, která zahrnuje zbytky 500 až 800¹⁰⁰, (ii) aktivační doménu mezi zbytky 800 až 1000, kde se nalézá místo posttranslační modifikace mastnou kyselinou^{154,155}, (iii) RTX doménu s vazebnými místy pro vápenaté ionty (asi 40), která zahrnuje více méně konzervované nonapeptidové sekvence X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D^{87,88}, (iv) poslední částí hemolysinové domény CyaA je C-koncový sekreční signál, který je tvořen převážně záporně nabitými aminokyselinovými zbytky¹⁴².



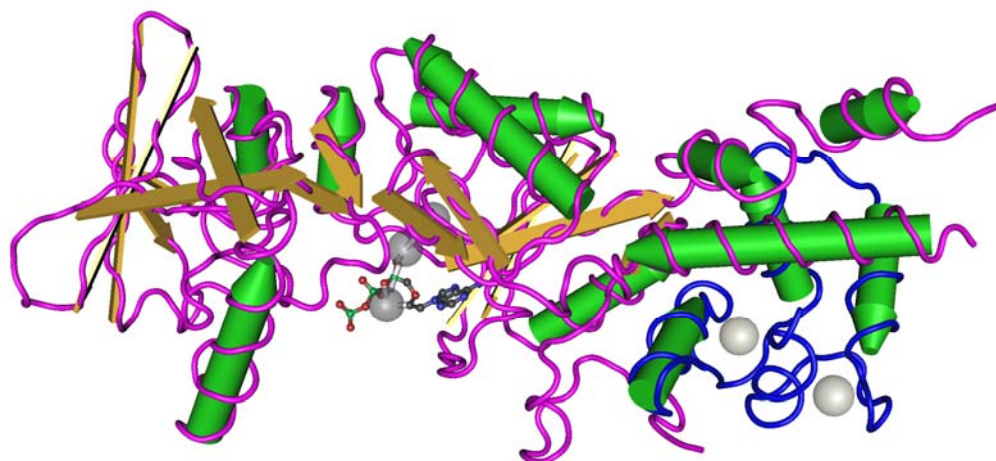
Obr. 9: Schematické zobrazení molekuly CyaA. Čísla označují jednotlivé aminokyselinové zbytky. Adenylát cykласová doména je složena ze dvou subdomén T18 a T25. C-koncová část (RTX hemolysin) se skládá z několika funkčních domén – z hydrofobní domény, repetitivní domény, C-koncového sekrečního signálu, oblasti aktivace mastnou kyselinou a oblasti zodpovědné za vazbu na receptor CD11b/CD18.

Hydrofobní doména, lokalizovaná mezi zbytky 500 a 700, hraje nezastupitelnou úlohu při vazbě na buňky, při tvorbě kation-selektivních pórů a při translokaci AC-domény do cytosolu cílových buněk^{107,118,150}. Skládá se pravděpodobně z několika transmembránových α -helixů. Specifická hemolytická aktivita adenylát cykласového toxinu je v porovnání s ostatními RTX toxiny nízká. Bylo však ukázáno, že kanálotvorná aktivita CyaA společně s translokací AC-domény maximalizuje celkové cytolytické vlastnosti toxinu na buňkách produkujících CD11b^{156,157}.

Další část hemolysinu tvoří acylační doména, na které dochází k posttranslační modifikaci ϵ -aminoskupiny lysinů 983 a 860 mastnou kyselinou za účasti acyltransferasy CyaC^{154,158}.

Základní vlastností, která je společná všem RTX toxinům, je přítomnost aminokyselinových repetitivních sekvencí. Tato repetitivní doména CyaA se nachází mezi zbytky 1000 a 1600 a je tvořena přibližně 45 nonapeptidovými sekvencemi, které vytváří vazebná místa pro vápenaté ionty. Pro aktivitu CyaA je striktně požadována přítomnost volných vápenatých iontů o fyziologické koncentraci ($> 0,2$ mM)^{85,146}. Navíc přítomnost vápenatých iontů je vyžadována také pro vazbu CyaA na $\alpha_M\beta_2$ integrinový receptor (CD11b/CD18) myeloidních buněk². Nejdůležitější část CyaA, která se účastní vazby na receptor, byla v nedávné době nalezena v repetitivních bohatých na glycinové zbytky a to mezi aminokyselinovými zbytky 1166 a 1281¹⁵⁹. CyaA obsahuje čtná (~40) vazebná místa pro vápenaté ionty a dále pak malé množství (~5) míst již nevratně obsazených Ca^{2+} ionty, která umožňují interakci s membránou a hemolytickou aktivitu toxinu na erythrocytech^{87,160}. Očekává se, že Ca^{2+} ionty se váží do ohybu, které spojují přilehlé antiparalelní β -listy nonapeptidových repetitivních v RTX části CyaA, podobně jako tomu je u RTX části alkalické proteasy z *P. aeruginosa*⁸⁹ (**Obr. 7**). Vápenaté ionty se váží k CyaA extrémně kooperativním způsobem. Bylo zjištěno, že kanálotvorná aktivita CyaA se přibližně 50 krát zvýší již po minimálním nárůstu (~15%) v koncentraci volných vápenatých iontů (z 0,7 na 0,8 mM)¹⁶¹.

Druhá část CyaA - invazivní AC doména váže po vstupu do cílových buněk intracelulární kalmmodulin v poměru 1:1. Její enzymatická aktivita poté stoupne více jak 1000 krát a dosáhne tak extrémní katalytické síly $k_{\text{cat}} \sim 2000 \text{ s}^{-1}$. Zdá se, že také translokace přes membránu, nikoli pouhá inserce, je řízená membránovým potenciálem¹⁶². Mechanismus translokace asi 40 kDa AC domény přes lipidovou dvojvrstvu membrány cílových buněk je zatím pouze málo prozkoumán. Navíc translokace AC domény do buněk může být rozlišena od tvorby kation selektivních pórů bodovou mutací v predikovaném membránovém úseku CyaA^{107,163}. Nedávno Guo a spolupracovníci vyřešili krystalovou strukturu adenylát cyklasové domény v komplexu s C-koncovým fragmentem kalmodulinu (C-CaM)¹⁶⁴ (**Obr. 10**). Tato struktura odhalila čtyři oddělené části, kterými se AC doména váže ke kalmodulinu s navázanými vápníkovými ionty.



Obr. 10: Struktura AC domény CyaA v komplexu s kalmodulinem. Modře je vyznačena C-terminální globulární doména kalmodulinu, AC doména pak růžově. Přítomnost vápenatých a hořečnatých iontů (šedé koule) je pro vzájemnou interakci obou proteinů nezbytná¹⁶⁴.

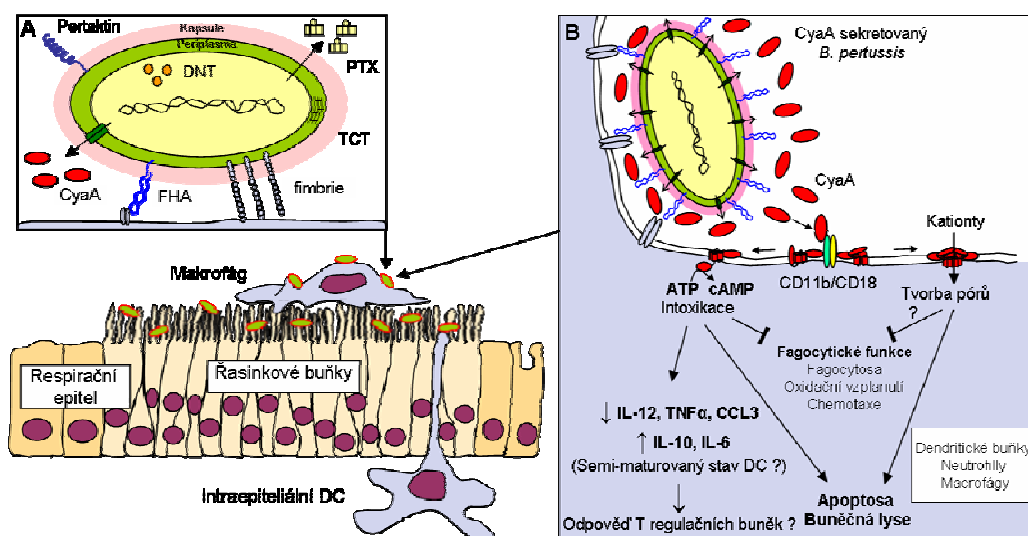
Podobně jako u ostatních RTX toxinů i u CyaA závisí jeho biologická aktivita na posttranslační modifikaci¹⁶⁵. Tu zprostředkovává protein CyaC o velikosti 20 kDa^{140,166}, který je produkován spolu s CyaA v buňkách *B. pertussis*. CyaC katalysuje kovalentní modifikaci ϵ -aminoskupiny Lys-860 a Lys-983 zbytkem kyseliny palmitové^{154,155} a funguje jako acyltransferasa, která katalysuje přenos acylu z acyl-ACP na protoxin^{140,167}. Mechanismus tohoto procesu zatím není znám, ale mutagenese genu pro CyaC napovídá, že katalytickými zbytky by mohly být zbytky serinu a histidinu v pozicích 30 a 33. Jejich záměna vede ke zrušení acylační aktivity CyaC¹⁵⁸. Substituce zbytku alaninu v pozici 140 vede narozdíl od výše zmíněných záměn k rozdílné specifitě CyaC vůči dvěma acylačním místům v proCyaA. Zvláště pak záměna Ala-140 za valinový zbytek vede téměř výhradně k acylaci Lys-983¹⁵⁸.

Rozsah CyaA acylace mastnou kyselinou bakterií *B. pertussis* závisí na kmeni, kterým je toxin produkován. *Bp*-CyaA, izolovaný z kmene *B. pertussis* Tohama I-typ 338, byl acylován jediným zbytkem kyseliny palmitové na Lys-983¹⁵⁴. Dále Basar a spolupracovníci navrhli, že acylace Lys-983 je nezbytná a postačující pro aktivaci CyaA¹⁵⁸. Sekvence CyaA ale zahrnuje dvě charakteristická místa acylace. To naznačuje, že CyaA může být acylován na dvou lysinových zbytcích Lys-860 a Lys-983. Rekombinantní *r-Ec*-CyaA, který je produkován spolu s CyaC v kmeni *E. coli* K12, nese skutečně zbytek mastné kyseliny na zbytku Lys-860¹⁵⁵. Původně se mělo za to, že toto je důvod menší specifické hemolytické aktivity *r-Ec*-CyaA v porovnání s *Bp*-CyaA¹⁵⁵. Rekombinantní *r-Bp*-CyaA, nadprodukováný *B. pertussis* kmenem 18323/pBN nese také acylový zbytek na obou lysinových zbytcích Lys-860 a Lys-983. Zmenšená hemolytická aktivita *r-Ec*-CyaA je proto patrně dána modifikací především nenasycenou palmitoolejovou kyselinou (*cis* Δ 9 C16:1), zatímco u *Bp*-CyaA se vyskytuje pouze modifikace palmitovou kyselinou¹⁶⁸. Acylace CyaA je mimo jiné také

důležitá pro vysokoafinitní vazbu na integrinový receptor CD11b/CD18¹⁵⁹, avšak narozdíl od vazby na erytrocyty je pro vazbu na integrin CD11b/CD18 postačující acylace Lys-860¹⁴³.

Integrin CD11b/CD18 byl v nedávné době identifikován jako vysokoafinitní receptor pro CyaA na myeloidních fagocytujících buňkách², které se zdají být relevantním cílem CyaA za fyziologických podmínek¹⁶⁹. Nicméně CyaA je schopen intoxikovat, byť s menší účinností, celou řadu buněk, kterým schází integrin CD11b/CD18, jako jsou např. savčí erytrocyty^{150,170}. Některé výsledky ukazují, že CyaA je unikátní mezi RTX toxiny schopností translokovat svou AC-doménu přes cytoplasmatickou membránu přímo do cytosolu cílových buněk bez potřeby endocytosy. K intoxikaci buněk cAMP dochází ihned po vystavení CyaA. Veškeré známé inhibitory endocytosy blokují pouze dopravu CyaA do endosomu závislou na CD11b/CD18, ale nikoli akumulaci cAMP^{149,171}, a také jimi není ovlivněna doprava cizích epitopů do cytosolu cílových buněk pomocí AC domény¹⁵¹.

Role CyaA v interakci bakterie *B. pertussis* s buňkami respiračního epitelu, v modulaci imunitní odpovědi a sekreci prozánětlivých cytokinů je pouze málo prozkoumaná (**Obr. 11**). Aktivita CyaA by mohla vyvolávat produkci IL-6 v tracheálním epitelu, který je kolonizován *B. pertussis*¹⁷². CyaA přispívá k mnoha patologickým efektům v myších modelech plicní infekce, jako jsou účinná plicní kolonizace, indukce histopatologických lesí a odvod zánětlivých leukocytů^{8,173}. Ve fyziologicky relevantním modelu přirozené myší infekce bakterií *B. bronchiseptica* jsou kmeny postrádající produkci CyaA zcela avirulentní v B- a T-deficientních myších narozdíl od neutropenických myší (deficientní na neutrofilů), kde jsou plně virulentní¹⁶⁹. To jasně naznačuje, že myeloidní fagocytující buňky, zejména pak neutrofilů, jsou primárním cílem *in vivo* pro CyaA *B. bronchiseptica* a nejspíše také pro CyaA *B. pertussis*¹⁷⁴. Bylo ukázáno, že CyaA zprostředkovaná intoxikace cAMP inhibuje signalizaci z Fc receptorů po vazbě částic, které jsou opsonisované protilátkami, čímž dochází k inhibici fagocytosy *B. pertussis* neutrofilů¹⁷⁵. CyaA dále snižuje chemotaktickou aktivitu a oxidační vzplanutí leukocytů, které jsou důležité pro jejich baktericidní aktivitu¹⁷⁶. CyaA může také vyvolat apoptosu makrofágů^{177,178}, která je pravděpodobně způsobená narušením membránového potenciálu v mitochondriích¹⁷⁹.



Obr. 11: Schematické zobrazení nejdůležitějších kroků v interakci CyaA s cílovými buňkami v průběhu infekce *B. pertussis* na sliznici respiračního traktu hostitele. *B. pertussis* kolonizuje řasinky na respiračním epitelu průdušnice a nosohltanu a zároveň může adherovat na buňky zahrnuté v imunitní odpovědi hostitele (makrofágy, intraepiteliální dendritické buňky). **A)** Hlavní faktory virulence *B. pertussis*. **B)** Sekretovaný CyaA se váže na makrofágy, neutrofile a dendritické buňky pomocí $\alpha_M\beta_2$ integrinového receptoru (CD11b/CD18). Po vazbě a inserci do membrány může toxin buď translokovat svou AC doménu do cytosolu a katalyzovat tvorbu cAMP, nebo tvořit kationt-selektivní póry v buněčné membráně a porušit tak buněčnou homeostasu. Každá z těchto aktivit sama o sobě nebo v součinnosti ovlivňují různorodé signální kaskády, mění nebo potlačují baktericidní funkce a antigenní presentaci nebo indukují lysi a apoptosu buněk¹⁸⁰.

3.3.2.3 Interakce CyaA s cílovými buňkami

Přesný mechanismus vazby CyaA na cílové buňky a jeho inserce do cytoplasmatické membrány, podobně jako mechanismus tvorby kationt-selektivních iontových pórů a přenos hydrofilní AC domény (40 kDa) přes hydrofobní lipidovou membránu buňky zůstávají zatím nejasné. Adenylát cykloasový toxin může interagovat s řadou různých buněčných typů a přenášet svou katalytickou doménu do jejich cytosolu. Zároveň je CyaA schopen dopravovat svou enzymatickou část do cytosolu eukaryotických buněk jiným mechanismem než receptorem zprostředkovanou endocytosou^{151,171}.

Zdá se, že prvotní interakce CyaA s buněčným povrchem je nespecifická a tato adsorpce má velmi nízkou afinitu. Mnohem účinnější je vazba CyaA zprostředkovaná specifickým receptorem CD11b/CD18, který je přítomný na povrchu myeloidních buněk². Skutečnost, že vazbu CyaA na CD11b/CD18 je možné inhibovat anti-CD11b monoklonální protilátkou naznačuje, že se váže k CD11b podjednotce receptoru. Vazba CyaA pomocí CD11b/CD18 receptoru je saturovatelná, závislá na přítomnosti vápenatých iontů a vede k dramatickému zvýšení cytotoxicity vůči buňkám. Detaily interakce CyaA s buňkami nesoucími CD11b/CD18 jsou nyní intenzivně studovány¹⁵⁹. Na integrinový receptor se CyaA váže v oblasti repetitivní domény toxinu mezi aminokyselinovými zbytky 1166 až 1281¹⁵⁹. Po adsorpci následuje ireversibilní inserce CyaA do membrány, průnik AC domény do cytosolu

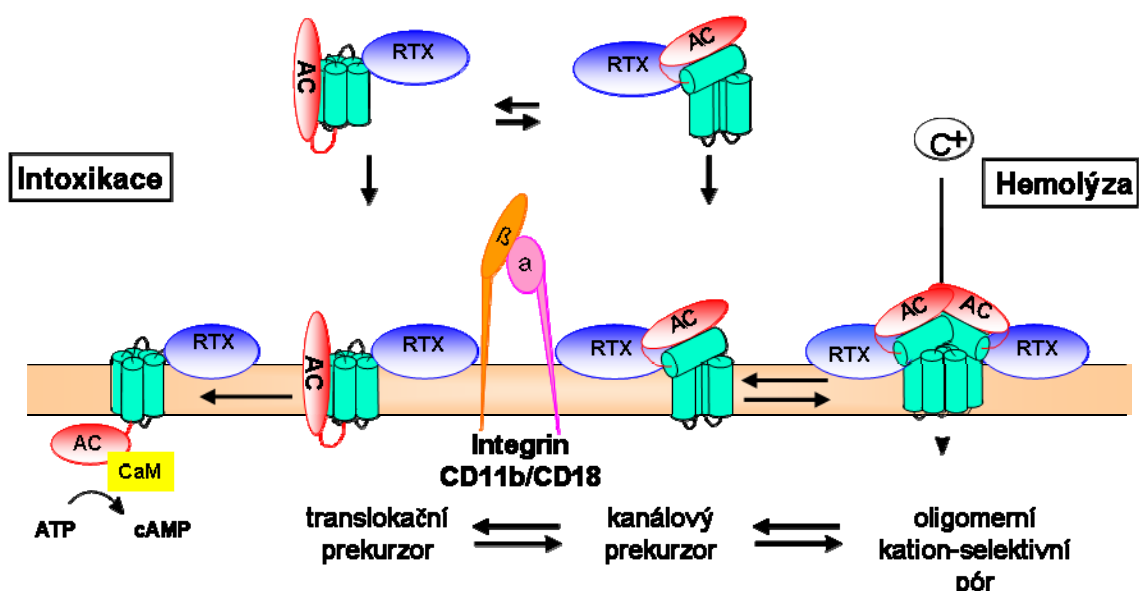
buňky a tvorba pórů. Některé výsledky na jiných buňkách než fagocytech ukazují na existenci alternativního receptoru CyaA neproteinové povahy¹⁸¹.

Adenylát cyklasový toxin má zcela unikátní schopnost vázat se s detekovatelnou aktivitou a pronikat přes cytoplasmatickou membránu celé řady eukaryotických buněk neprodukujících CD11b/CD18, tedy bez pomoci proteinového buněčného receptoru^{3,150,160}, tato vazba je však nesaturovatelná a mnohem méně účinná než saturovatelná vazba toxinu na buňky s receptorem². Tím, že je CyaA schopen dopravovat svou enzymatickou doménu i do cytoplasmu savčích erytrocytů, tedy buněk neschopných endocytosy, je CyaA zcela unikátní. Erytrocyty proto skýtají výborný model pro studii přímé translokace CyaA přes cytoplasmatickou membránu bez účasti proteinového receptoru. Pro interakci CyaA s membránou cílové buňky bez CD11b/CD18, jako jsou například erytrocyty, je nezbytná integrita a kooperace všech částí molekuly CyaA, posttranslační modifikace mastnou kyselinou a přítomnost vápenatých iontů^{118,146}. Prvním krokem v interakci CyaA s cytoplasmatickou membránou bez CD11b je nespecifická adsorpce CyaA na buněčný povrch, která umožní přiblížení hydrofobní domény dostatečně blízko k lipidické dvojvrstvě membrány. Následuje patrně zanoření hydrofobní domény CyaA do membrány. Tento krok je nezávislý na teplotě, probíhá již při 4°C^{150,160} a vyžaduje obsazení vysokoafinních míst vápenatými ionty⁸⁷. V druhém kroku dochází k translokaci adenylát cyklasové domény přes cytoplasmatickou membránu. Tento krok probíhá pouze při teplotě vyšší než 16°C^{118,160} a je potřeba obsazení vysokoafinních i nízkoafinních vazebných míst vápenatými ionty, jejichž vazba vyvolává velké konformační změny v molekule CyaA doprovázející translokaci AC domény^{85,87}. Translokace adenylát cyklasové domény do buněk je také závislá na přítomnosti negativního klidového membránového potenciálu, který je přítomen na většině eukaryotických buněk¹⁶². Právě membránový potenciál by mohl být hnací silou pro přenos AC domény přes cytoplasmatickou membránu^{160,162}.

Původnímu předpokladu, že k translokaci adenylát cyklasové domény dochází přes vytvořený kationt-selektivní pór¹⁶⁰, odporuje několik pozorování. Průměr kationt-selektivního póru CyaA (0,6-0,8 nm) je příliš malý na to, aby jím prošel rozvinutý polypeptidový řetězec¹⁰⁰. Průnik AC domény do cytosolu erytrocytů je lineárně závislý na koncentraci přidaného toxinu, kdežto tvorba membránových pórů vykazuje sigmoidní koncentrační závislost. Toto pozorování poukazuje na možnost, že translokace AC domény a tvorba póru v membráně jsou dva různé, na sobě nezávislé procesy s odlišnými mechanismy^{107,152}. Tyto výsledky zároveň naznačují, že průnik katalytické AC domény do cytosolu erytrocytů je realizován převážně monomery CyaA, zatímco tvorba membránových pórů a hemolytická

aktivita vyžaduje oligomerizaci molekul CyaA^{9,101,107,155,162}. Bylo ukázáno, že záměna glutamátového zbytku 509 za prolinový selektivně ruší schopnost translokace adenylát cyklasové domény do erytrocytů a zároveň nemá vliv na tvorbu pórů¹⁰⁷. Je možné, že si tyto aktivity dokonce vzájemně konkurují, protože pokud je translokace blokována vazbou specifické protilátky proti adenylát cyklasové doméně nebo je AC doména deletována, je hemolytická aktivita toxinu zvýšená¹⁸². Také skutečnost, že odlišná acylace toxinu vede ke snížení tvorby iontových pórů, přičemž nedochází k ovlivnění translokace adenylát cyklasové domény přes cytoplasmatickou membránu, podporuje hypotézu, že translokace AC domény do buněk je realizována monomery toxinu, zatímco tvorba iontových pórů vyžaduje oligomerizaci^{155,183}. Na schopnost CyaA tvořit funkční oligomery poukazuje také funkční komplementace delečních mutant CyaA. Zatímco jednotlivé mutantní toxiny byly inaktivní, při použití směsi dvou mutantních proteinů došlo k částečnému obnovení aktivity CyaA¹¹⁸.

Na základě výše uvedených pozorování byl navržen model interakce CyaA s membránou¹⁰⁷. Tento model předpokládá existenci dvou konformačních stavů CyaA na membráně - translokačního prekurzoru a kanálového prekurzoru. Zatímco translokační prekurzor po inzerci CyaA do membrány translokují svou AC doménu do cytosolu buněk, kanálový prekurzor je zodpovědný za tvorbu oligomerních iontových pórů (**Obr. 12**).



Obr. 12: Model interakce CyaA s membránou cílové buňky. CyaA se může vázat na integrinový receptor CD11b/CD18, translokovat invazivní AC doménu do cytosolu nebo oligomerizovat a vytvářet kationt-selektivní póry. Toxin se však může také vázat do cytoplasmatické membrány nezávisle na proteinovém receptoru¹⁰⁷.

3.4 VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU CIZORODÝCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

Antigen specifické imunitní odpovědi lze rozdělit na buněčně zprostředkované - založené na T-lymfocytech, a na mechanismy humorální - založené na působení protilátek. T-lymfocyty lze velmi zjednodušeně rozdělit na ty, které na svém povrchu nesou koreceptor CD4 (CD4⁺ T-lymfocyty) a na ty, které na svém povrchu nesou koreceptor CD8 (CD8⁺ T-lymfocyty)^{184,185}.

Exogenní antigeny procházejí endosomálním zpracováním a jsou prezentovány na molekulách hlavního histokompatibilitního komplexu druhé třídy (MHC II). Jsou rozeznávány CD4⁺ T-buňkami, jež jsou pomocné a velmi důležité buňky imunitního systému určující průběh imunitní reakce. Pomocné CD4⁺ T_H buňky typu 1 (T_H1) spolupracují s makrofágy a CD8⁺ cytotoxickými T_C lymfocyty (CTL). Zatímco pomocné T_H buňky typu 2 (T_H2) poskytují pomoc B-buňkám v diferenciaci a produkci protilátek. Rozhodnutí o průběhu imunitní reakce je klíčové, vzhledem k tomu, že extracelulární infekce jsou optimálně potlačovány protilátkami (odpověď závislá na T_H2), kdežto intracelulární infekce vyžadují aktivaci makrofágů a CTL (odpověď závislá na T_H1)¹⁸⁶.

Na molekulách hlavního histokompatibilitního komplexu první třídy (MHC I) jsou prezentovány hlavně cytosolické antigeny, které vznikly endogenní cestou, např. proteiny replikujících se virů, intracelulárních parazitů nebo specifické proteiny nádorových buněk. Ty jsou poté rozeznávány CD8⁺ cytotoxickými T_C lymfocyty (CTL), což umožní eliminaci buněk infikovaných viry, intracelulárními bakteriemi nebo eliminaci nádorových buněk¹⁸⁶.

Ačkoli jsou všeobecně na molekulách MHC I. třídy prezentovány endogenně syntetizované proteiny, profesionální antigen prezentující buňky (APC) jsou schopny prezentovat na molekulách MHC I. třídy také exogenní peptidy. Tento proces se nazývá cross-prezentace. Pokud cross-prezentace vede k aktivaci CD8⁺ T-lymfocytů *in vivo*, je tento proces nazýván cross-priming^{187,188}. Při cross-prezentaci dochází k endocytose exogenních proteinů zachycených na povrchu APC a jejich přenosu z fagosomu do cytoplasmy, kde dochází k jejich částečné degradaci proteasomem. Nedávno bylo ukázáno, že fagosomy dendritických buněk mohou fúzovat s endoplasmatickým retikulem. Antigeny v nich obsažené mohou být tedy exportovány do cytoplasmy, štěpeny proteasomem a zpět transportovány do fúzního veziklu fagosom-retikulum, kde se váží na molekuly MHC I¹⁸⁹. To do značné míry objasnilo mechanismus cross-prezentace.

CyaA má schopnost pronikat přes cytoplasmatickou membránu různých typů buněk a specificky se vázat na profesionální antigen prezentující buňky (APC), jež produkují vysoké množství receptoru CD11b/CD18. To vedlo k myšlence, že by CyaA mohl být využit jako nereplikativní invazivní vektor, který by nesl cizorodé epitopy z patogenních virů nebo nádorových markerů. Tyto epitopy by byly pomocí CyaA dopraveny přímo do cytosolu buněk nezávisle na receptorem zprostředkované endocytose a mohly by být proteasomem zpracovány pro prezentaci epitopů na MHC molekulách I. třídy a následně k indukci specifické CD8⁺ imunitní odpovědi.

Nezbytným předpokladem pro použití rekombinantního CyaA, coby vektoru pro dopravu cizorodých CD8⁺ epitopů do cytosolu APC, je zachování jeho biologické invazivní aktivity po vložení antigenního epitopu. To umožňuje vysoká strukturní flexibilita AC domény, jež je schopna pojmout cizí antigenní peptidy až o délce 200 aminokyselinových zbytků, aniž by došlo ke ztrátě invazivity¹⁹⁰⁻¹⁹². Nedávno bylo také ukázáno, že AC doména je schopna přenášet dovnitř buňky i peptidy, které na ni byly připojeny disulfidickou vazbou¹⁹³.

V invazivní katalytické adenylát cyklasové doméně CyaA byla identifikována permissivní místa, do kterých lze vkládat cizorodé peptidy, aniž by byla ovlivněna schopnost vzniklého toxoidu translokovat tuto doménu přes cytoplasmatickou membránu¹⁹⁰. Do permissivní pozice u aminokyselinového zbytku 224 byl vložen modelový CD8⁺ T-buněčný epitop z nukleoproteinu viru lymfocytární choriomeningitidy (LCMV). V *in vitro* experimentech bylo ukázáno, že takový CyaA se dá použít k aktivaci specifických CD8⁺ T-lymfocytů¹⁹⁴. Také v experimentech *in vivo* se potvrdilo, že rekombinantní CyaA s vloženým epitopem LCMV nebo epitopem z V3 regionu HIV-1 gp120 glykoproteinu vyvolává silnou specifickou CD8⁺ cytotoxickou odpověď. Schopnost rekombinantního toxinu vyvolat CTL odpověď je závislá na jeho schopnosti vniknout do cílových buněk, přičemž nezávisí na jeho adenylát cyklasové aktivitě^{6,151,195,196}. Geneticky detoxifikované verze CyaA, neschopné produkovat cAMP, bylo úspěšně použito k indukci specifické CTL buněčné odpovědi účinné v profylaktické vakcinaci proti viru LCMV a rovněž v imunoterapii určitých nádorů^{6,7,197}. Bylo potvrzeno, že prezentace cizorodých peptidů insertovaných v molekule CyaA je zajišťována mechanismy nezávislými na endocytických procesech a že tyto peptidy jsou pomocí CyaA dopravovány do dráhy zajišťující jejich zpracování a prezentaci na molekulách MHC I. třídy¹⁷¹. Dále byl do permissivního místa u aminokyselinového zbytku 224 vložen různý počet epitopů LCMV a u těchto konstruktů byla porovnávána hladina cytotoxické odpovědi *in vivo*. Imunizací myši rekombinantním toxinem nesoucí 1 až 4 epitopy došlo k indukci přibližně stejné hladiny specifické cytotoxické odpovědi proti viru LCMV. To

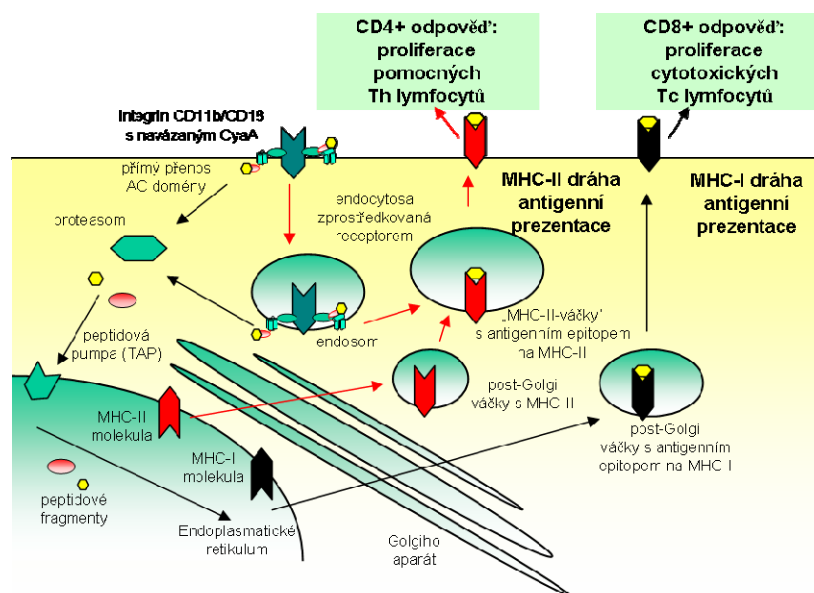
ukázalo, že CyaA je schopen dopravovat do cytosolu buněk velké cizorodé antigeny obsahující několik epitopů pro antigenní prezentaci¹⁹⁸. Byl zkonstruován rekombinantní CyaA nesoucí v různých permisivních pozicích tři různé modelové CD8⁺ T-buněčné epitopy, epitop LCMV, epitop z V3 regionu HIV gp120 glykoproteinu a epitop OVA z kuřecího ovalbuminu. Pomocí CyaA toxoidu nesoucího tento polyepitop bylo dosaženo současné prezentace všech tří epitopů na molekulách MHC I. třídy a byla navozena specifická cytotoxická odpověď¹⁹⁹. Toho by se v budoucnosti dalo využít při vývoji polyvalentní vakcíny. Také bylo ukázáno, že pouze takové rekombinantní CyaA, které mají vložený epitop v invazivní adenylát cyklasové doméně, jsou schopny úspěšně dopravovat epitopy do dráhy zajišťující jejich zpracování a prezentaci na molekulách MHC I. třídy¹⁹¹.

Nedávno bylo také ukázáno, že epitopy vložené do CyaA procházejí rovněž zpracováním v endosomech a jsou prezentovány na molekulách MHC II. třídy a rozeznávány CD4⁺ T-buňkami. Prezentace CD4⁺ T-buněčného epitopu vyžadovala interakci CyaA s CD11b/CD18 a následně klatrinem zprostředkovanou endocytosu^{151,200}. Na **Obr. 13** je znázorněn mechanismus antigenní prezentace epitopů dopravovaných pomocí CyaA do buněk.

CyaA molekuly, neschopné produkovat cAMP, mohou být *in vivo* souběžně použity k dopravě CD8⁺ a CD4⁺ T buněčných epitopů nebo dokonce k dopravě celých antigenů do dráhy antigenní prezentace na molekulách MHC I a MHC II. Toto umožňuje vytvořit současně epitop specifickou CD4⁺ T_{H1} polarizovanou a epitop specifickou CD8⁺ CTL imunitní odpověď účinnou v profylaktické vakcinaci proti letální dávce LCMV viru u myši²⁰¹. Jako velmi významný se jeví T_{H1} profil imunitní odpovědi CD4⁺, který podporuje CD8⁺ CTL imunitní odpověď.

Účinnost CyaA při dopravě antigenů do APC byla v minulosti mnohokrát potvrzena v preklinických studiích na zvířecích modelech. Nyní jsou v přípravě klinické testy fáze I/II pro rekombinantní CyaA toxoid nesoucí CD8⁺ antigen E7 lidského papiloma viru 16²⁰². Probíhá též příprava klinických testů pro terapii metastazujících melanomů¹⁹⁷.

Kromě toho bylo nedávno ukázáno, že fúze CyaA s mykobakteriálními antigeny (CFP10, ESAT-6) může v budoucnu sloužit jako nástroj pro zlepšení diagnostiky latentní tuberkulózy, neboť zvyšuje účinnost jejich rozpoznávání imunitním systémem²⁰³.



Obr. 13: Dva různé mechanismy antigenní prezentace pro dopravu cizorodých epitopů do buněk pomocí CyaA. CyaA se váže na antigen prezentující buňku (APC) a translokuje svou AC doménu s vloženým CD8⁺ T-buněčným epitopem do cytosolu, kde dochází pomocí proteasomu k proteolytické degradaci CyaA. Pomocí peptidových pump jsou epitopy transportovány do endoplasmatického retikula, kde dochází k jejich asociaci s podjednotkami MHC I. Poté jsou molekuly MHC I s navázaným peptidem vystaveny na buněčném povrchu a dochází k jejich interakci s T-buněčným receptorem na povrchu cytotoxických T-lymfocytů a ke spuštění proliferace specifických cytotoxických T-lymfocytů. CyaA se může také do cytoplasmy APC dostat receptorem zprostředkovanou endocytosou. Endosom fúzuje s váčkem, který vznikl odštěpením z Golgiho aparátu, který obsahuje MHC molekuly II. třídy. CD4⁺ epitop se naváže do vazebného místa na MHC molekule a poté je s MHC glykoproteinem II. třídy vystaven na povrchu APC. Komplex MHC molekul II. třídy s navázaným peptidem je rozpoznán receptory CD4⁺ pomocných T-lymfocytů, dochází k jejich aktivaci a ty následně aktivují B-lymfocyty.

3.4.1 IMUNODOMINANTNÍ EPITOPY *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Rod *Mycobacterium* zahrnuje více než 50 druhů, mezi nimiž jsou vedle obligátně patogenních původců onemocnění - tuberkulózy (*M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. africanum*) a lepry (*M. leprae*), též podmíněné patogenní a nepatogenní kmeny, které představují významnou složku přírodních biotopů²⁰⁴.

Mycobacterium tuberculosis je obligátní aerobní acidorezistentní tyčinka s vysokým obsahem lipidů v buněčné stěně, což způsobuje vysokou odolnost mykobakterií vůči nepříznivým podmínkám okolního prostředí a činí tak léčbu tuberkulózy (TBC) velice obtížnou²⁰⁵. Bakterie *M. tuberculosis* byla poprvé izolována Robertem Kochem v roce 1882.

Tuberkulóza je pandemicky rozšířenou infekcí. Téměř třetina světové populace je infikována *M. tuberculosis*, každoročně se objevuje asi 10 miliónů nových případů a ročně umírá téměř 3 milióny nemocných²⁰⁶⁻²⁰⁸. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) připadá na rozvojové země asi 95 % celkového výskytu. V roce 1993 byla tuberkulóza vyhlášena WHO za celosvětový naléhavý problém. Nemocnost v západních zemích, ke kterým je řazena i Česká republika, se pohybuje v rozmezí 13 - 15 nových případů na 100 000 obyvatel. Rizikové skupiny jsou především toxikomani, bezdomovci, vězni, obyvatelé

hromadných zařízení, lidé s oslabenou imunitou (zejména HIV pozitivní) a chabou fyzickou kondicí^{204,205,209}. Nejčastější formou tuberkulózy je její plicní forma, která představuje až 85 % všech onemocnění. Urogenitální postižení je druhou nejčastější formou mimoplicního postižení a tvoří asi 20 % těchto forem^{204,209}.

Rapidně se zvyšující migrace obyvatelstva a rozvoj cestovního ruchu, obliba návštěv „méně civilizovaných“ oblastí světa, stejně jako postupující pandemie AIDS s sebou nesou hrozbu zpětného rozšíření tohoto onemocnění i do vyspělých zemí.

Jako prevence TBC se používá plošné očkování obyvatelstva. Současná vakcína *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) byla vyvinuta začátkem minulého století a je odvozena od oslabeného kmene *M. bovis*^{210,211}. Tento kmen je intracelulární, napadá makrofágy a vyvolává podobnou imunitní odpověď jako *M. tuberculosis* (90 % DNA homologie). Účinnost této vakcíny je stále předmětem sporů. Studie ukazují, že většina lidí vykazuje po aplikaci pozitivní kožní test, ale u některých lidí je vakcína zcela neefektivní (30 %)²¹². Tato její kolísavá účinnost je neuspokojivá zejména u plicní formy TBC (0-80 %). Nicméně hlavním důvodem pro současné využívání BCG vakcíny je fakt, že může zabránit rozšíření TBC u dětí. Po mnoho let proto zůstává hlavním cílem boje proti této nebezpečné chorobě vývoj bezpečné a účinné vakcíny. V poslední době bylo zveřejněno několik slibných strategií pro novou vakcínu. (i) Jako vakcína s lepšími protektivními účinky je testován rekombinantní kmen BCG, který byl modifikován vložením určitých genů a zvýšením exprese definovaných antigenů a zároveň snížením ostatní kapacity pro imunitní stimulaci²¹³; (ii) slibně také vypadá příprava oslabeného kmene *M. tuberculosis*, jenž by měl být bezpečný, ale indukoval by lepší imunitní odpověď než BCG nebo divoký typ (nemutovaný); (iii) další testovanou vakcínou je rekombinantní virus vakcinie, který není schopen replikace a produkuje vysoce imunogenní antigen Ag85A bakterie *M. tuberculosis*²¹⁴; (iv) v neposlední řadě to je podjednotková vakcína²¹⁵, která se skládá z purifikovaných mykobakteriálních proteinů nebo z molekul DNA upravených pro expresi antigenů v hostiteli²¹⁶.

Nedávná sekvenace genomu *M. tuberculosis* umožnila určit nové imunodominantní rodiny genů, které by v budoucnu mohly být zahrnuty v bezbuněčné vakcíně proti TBC. Výběr vhodných kandidátů byl založen na výskytu velkého množství těchto molekul v mediu po kultivaci *M. tuberculosis* (např. Ag85) nebo na jejich „imunodominanci“ po vakcinaci živou bakterií (např. ESAT-6, CFP-10, TB10.4)^{217,218}. V nedávné době byl také objeven RD1 lokus, který kóduje proteiny aktivně sekretované patogenními druhy mykobakterie²¹⁹, nepatogenní druhy včetně BCG však tento lokus postrádají. Lokus RD1 kóduje proteiny z rodiny ESAT-6, která zahrnuje 23 členů v kmenu *M. tuberculosis* H37Rv, nejznámějšími

jsou vysoce imunogenní antigeny CFP-10 (culture filtrate protein 10), ESAT-6 (early secreted antigenic target-6) a TB10.4²²⁰, jehož gen se však nenachází na RD1 lokusu.

Protein TB10.4 je kódován genem Rv0288, který se zdá být esenciální pro virulenci²²¹ a *in vitro* růst *M. tuberculosis*²²². Jak se ukázalo, sekvence TB10.4 je vysoce konzervativní v klinických izolátech *M. tuberculosis*²¹⁷. Tento protein je také cílem antimykobakteriální imunitní odpovědi u lidí^{217,218}, zároveň ho také silně rozeznávají jedinci očkovaní BCG a 70 % nemocných TBC²¹⁷. Tyto výsledky naznačují, že by TB10.4 mohl být slibným kandidátem pro vývoj nové podjednotkové vakcíny proti *M. tuberculosis*.

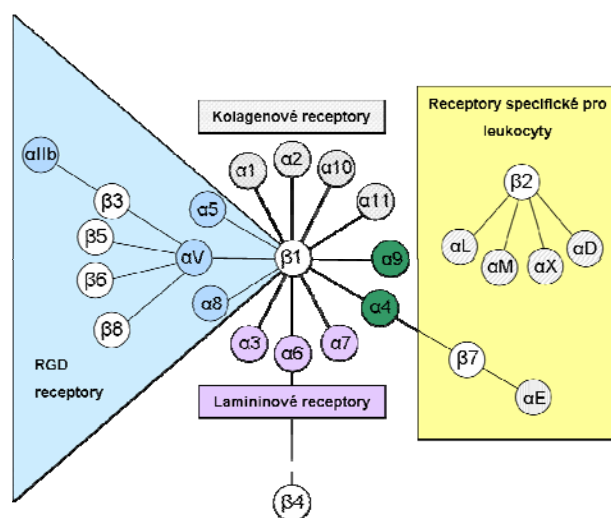
3.5 INTEGRINY

Integriny jsou velkou skupinou adhesivních molekul. Některé integriny váží komponenty mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix), jiné membránové ligandy patřící do imunoglobulinové rodiny¹⁸⁶.

Skládají se ze dvou transmembránových podjednotek α a β . Rozmanitost integrinů je způsobena tím, že jedna podjednotka β (8 typů) se může vázat s různými α podjednotkami (17 typů). Integriny se dělí do 8 rodin nazvaných podle podjednotky β (**Obr. 14**). Většina buněk produkuje jen jeden specifický integrin, přesto jsou čtyři integriny z β_2 rodiny produkovány pouze leukocyty^{186,223,224}.

N-koncové části podjednotek α a β se podílejí na tvorbě vazebného místa pro ligand. Vazebné místo existuje ve dvou konformacích, které se liší svou afinitou k ligandům. V klidovém stavu je v nízkoafinní konformaci, která po aktivaci buňky různými stimuly přejde do vysokoafinního stavu, umožňujícího pevnou vazbu^{186,223,224}.

Integriny vykazují relativně nízkou afinitu ke svým ligandům v porovnání s vysokou afinitou povrchových hormonálních receptorů. Přesto integriny svými mnohonásobnými interakcemi stovek až tisíců molekul k proteinům mezibuněčné hmoty dovolují buňce, aby byla pevně zakotvena. Jestliže buňka migruje, je nezbytné, aby byla schopna vytvořit nebo přerušit tento specifický kontakt. To je usnadněno tím, že jsou jednotlivé interakce slabé. Buňka, produkující různé integriny, které váží stejný ligand, je často schopna regulovat aktivitu každého integrinu zvlášť a tím jemně vyladit jejich interakci s mezibuněčnou hmotou^{186,223,224}.



Obr. 14: Rodiny integrinových receptorů.²²⁵ 8 různých β podjednotek se může vázat se 17 různými α podjednotkami a vytváří tak nejméně 24 integrinů.

3.5.1 RODINA β_2 INTEGRINŮ

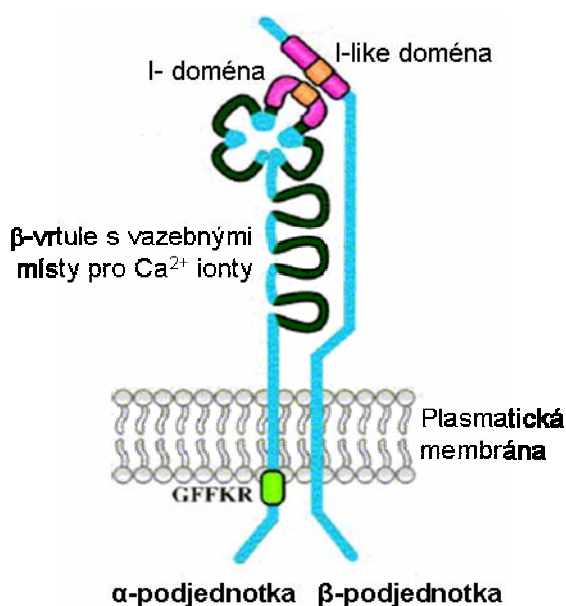
Integriny patřící do β_2 rodiny se označují jako integriny leukocytů, protože jsou jejich hlavními receptory. Tato rodina obsahuje čtyři členy, které mají společnou β podjednotku a liší se svou α podjednotkou, CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$, LFA-1), CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, CR3, Mac-1, Mo-1), CD11c/CD18 ($\alpha_X\beta_2$, p150/95) a CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$)^{226,227}.

Gen pro CD18 (β_2) řetězec, který kóduje transmembránový protein bohatý na cysteinové zbytky, je lokalizován na lidském 21. chromosomu^{226,228}. Cytoplasmatická část této podjednotky obsahuje sekvenci kritickou pro “inside-out“ signalizaci²²⁶.

Geny pro lidské podjednotky CD11a (177 kDa), CD11b (170 kDa), CD11c (150 kDa) a CD11d (160 kDa) jsou lokalizovány na 16. chromosomu^{226,228}. Podjednotky CD11b, CD11c a CD11d se shodují ve své aminokyselinové sekvenci ze 60-66 %, kdežto podjednotka CD11a se s nimi shoduje jen ze 35 %²²⁴. Každá z těchto α podjednotek obsahuje v N-koncové extracelulární části asi 200 aminokyselinových zbytků dlouhou I-doménu (od “inserted” nebo “interactive”), také někdy nazývanou A-doména (podle homologie s A motivem von Willebrandtova faktoru), která je kritická pro vazbu většiny ligandů. Na rozhraní mezi transmembránovou a cytoplasmatickou doménou těchto podjednotek byl identifikován GFFKR motiv (**Obr. 15**), který se účastní asociace podjednotek α a β a v nepřítomnosti aktivačního signálu tvoří “pant”, který zamyká heterodimer v nízkoafinní (neaktivní) konformaci²²⁶.

β_2 integriny dynamicky asociují s ostatními membránovými proteiny a tyto interakce zprostředkovávají adhezi a signalizační funkce β_2 integrinů²²⁶. Každý člen této rodiny rozeznává jeden nebo více členů rodiny molekul intercelulární adheze (ICAM). Integriny

CD11b/CD18, CD11c/CD18 a CD11d/CD18 navíc rozpoznávají i proteiny z ostatních tříd a integriny CD11b/CD18 a CD11c/CD18 kromě toho také polysacharidy²²⁸. Společný rys proteinových ligandů je zřejmě přítomnost kyselých aminokyselinových zbytků uspořádaných do flexibilní kličky, která umožní koordinaci Mg^{2+} nebo Mn^{2+} iontu a tím vytvoření mostu mezi I-doménou v α podjednotce a I-like doménou v β podjednotce. Aminokyselinová sekvence RGD, která je důležitým rysem ligandů ostatních integrinů, není vyžadována pro ligandy β_2 integrinů²²⁶.



Obr. 15: Struktura β_2 integrinů. α -podjednotka obsahuje na svém N-konci sedm homologních repetitiv, které tvoří β -vrtuli, znázorněnou tmavě zeleně. Růžově je znázorněna I-doména v α -podjednotce a I-like doména v β -podjednotce, oranžově pak místo MIDAS (metal ion-dependent site). Zeleně je znázorněna GFFKR sekvence, která je důležitá pro asociaci podjednotek, signalizaci a rozeznání ligandu. Integrin je zobrazen v inaktivním stavu²²⁶.

3.5.2 GLYKOSYLACE β_2 INTEGRINŮ

Oligosacharidové řetězce glykoproteinů jsou velmi rozmanité a dají se rozdělit do dvou skupin; na N-glykosidicky vázané a O-glykosidicky vázané.

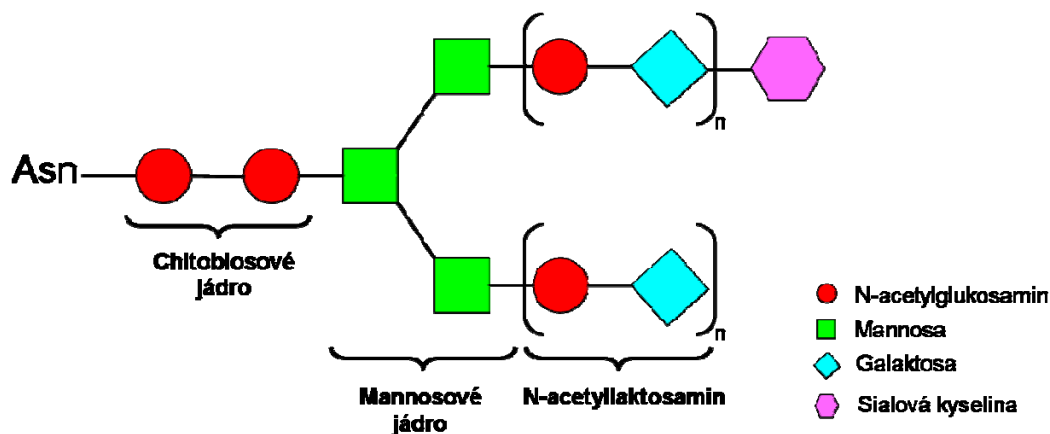
O-glykosidicky vázané sacharidy se váží na: (i) serin nebo threonin, prvním sacharidem pak je N-acetylgalaktosamin, méně často galaktosa, mannososa nebo xylosa.; (ii) hydroxylysin, který je modifikován jediným zbytkem galaktosy nebo disacharidem glukosylgalaktosou; (iii) hydroxyprolin, na který se váže arabinosa.

Prvním sacharidovým zbytkem N-glykosidicky vázaného oligosacharidového řetězce je zpravidla N-acetylglukosamin, který se váže na asparaginový zbytek v proteinu v sekvenci N-X-S/T (kde X je jakýkoli zbytek s výjimkou prolinového a aspartátového). N-glykosidicky vázané oligosacharidy obsahují nejméně 5 sacharidových zbytků - pentasacharidové jádro

tvořené dvěma N-acetylglukosaminovými a třemi mannosovými zbytky, které jsou společně třem základním strukturám: (i) vysokomannosové, (ii) komplexní a (iii) hybridní. Komplexní typ řetězce může zaujímat mono-, bi-, tri-, tetra- a penta-antennární strukturu a obsahovat různé množství zbytků sialové kyseliny. Vysokomannosový typ oligosacharidu obsahuje od 3 do 60 mannosových zbytků.

Biologická role oligosacharidů zahrnuje široké spektrum funkcí od těch nejjednodušších až po ty velmi důležité, jako jsou funkce důležité pro vývoj a růst. Jsou zahrnuty při tvorbě a udržení stability správné konformace proteinu, slouží jako vazebné místo pro mikroorganismy, toxiny a protilátky, zprostředkovávají interakce mezi buňkami nebo buňkou a mezibuněčnou hmotou a v neposlední řadě hrají roli v rozeznávání lymfocytů²²⁹.

Podobně jako ostatní integriny i β_2 intergriny jsou bohatě glykosylovány. Obě podjednotky CD11 (α -podjednotka) i CD18 (β -podjednotka) obsahují několik míst N-glykosylace (N-X-S/T), 10-19 míst v podjednotkách CD11 a 6 míst v podjednotce CD18^{230,231}. Avšak pouze některá z nich jsou modifikována oligosacharidovým řetězcem vázaným N-glykosidicky k asparaginovému zbytku. Studie struktury oligosacharidového řetězce β_2 integrinů, izolovaných z lidských leukocytů, neodhalila žádné rozdíly v glykosylaci jednotlivých podjednotek. Všechny tedy obsahují vysokomannosový typ, vysokomolekulární komplexní typ a malé množství hybridního typu oligosacharidových řetězců²³⁰ (**Obr. 16**).



Obr. 16: Zjednodušené schematické zobrazení N-glykosidicky vázaného komplexního typu oligosacharidu β_2 integrinů. Tento komplexní typ obsahuje chitobiosové jádro (dva N-acetylglukosaminové zbytky, GlcNAc) vázané na asparaginový zbytek v sekvenci N-X-S/T. Z druhé strany je k němu navázáno mannosové jádro (tři mannosové zbytky, Man), na které navazuje N-acetyllaktosaminový zbytek (N-acetylglukosamin a galaktosa, Gal). Ten se může několikrát opakovat nebo je na něj navázána sialová kyselina, nebo zůstává nemodifikovaný.

3.6 INTEGRIN CD11b/CD18

Integrin CD11b/CD18, nazývaný také jako $\alpha_M\beta_2$, komplementový receptor typu 3 (CR3), Mac-1 nebo Mo-1, je heterodimerní povrchový receptor²²³. Tento integrin je produkován leukocyty myeloidní linie, tedy neutrofilů, monocytů, NK (natural killer) buňkami, polymorfonukleárními (PMN) leukocyty a aktivovanými leukocyty, kde se účastní mezibuněčné adheze, fagocytosy a buněčné aktivace²³²⁻²³⁵ a především pak dendritickými buňkami, které jsou klíčové pro prezentaci antigenů a indukci buněčné imunitní odpovědi.

CD11b/CD18 je nejdůležitějším receptorem pro peptid iC3b, který vzniká v komplementové kaskádě. Podle tohoto ligandu dostal CD11b/CD18 jeden ze svých názvů - komplementový receptor typu 3 (CR3). Vazba iC3b zprostředkovává opsonisaci a fagocytosu mikroorganismů pomocí CD11b/CD18 a také zvýšení afinity NK buněk k C3 opsonisovaným částicím²³³.

CD11b/CD18 je velmi promiskuitní receptor, který rozeznává kromě iC3b více než 30 různých proteinových i neproteinových ligandů²³⁶ (**Tab. 1**). Tyto mnohostranné interakce poskytují molekulární základ pro universální roli neutrofilů a monocytů v obraně proti patogenům²³⁴.

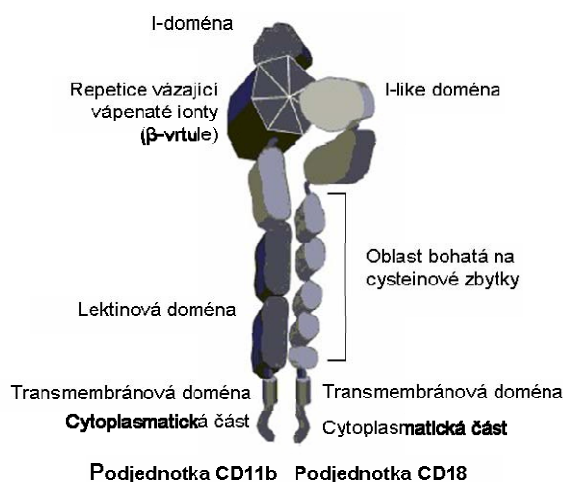
Vazba ligandu na CD11b/CD18 indukuje různé funkce jako např. extravasaci leukocytů, nebo podporu migrace a aktivace neutrofilů a monocytů¹⁸⁶. CD11b/CD18 je receptorem podílejícím se na fagocytose opsonisovaných organismů a částic, protože váže bakterie opsonisované částicemi iC3b²³⁵. Svou lektinovou doménou však může rozpoznat sacharidy na povrchu bakterie a zprostředkovat tak i fagocytosu bez opsonisace²³⁷. CD11b/CD18 je schopen interagovat s GPI-zakotveným proteinem, který postrádá cytosolickou část, ale i s lipopolysacharidovým (LPS) receptorem CD14 a receptorem typu 3B pro Fc část IgG (Fc γ IIIB). V této asociaci poskytuje CD11b/CD18 těmto povrchovým molekulám schopnost transmembránové signalizace^{233,238-241}.

Tab. 1: Ligandy integrinu CD11b/CD18.

Proteinové ligandy	Proteiny extracelulární hmoty	fibronektin ²³² , laminin ²³² , kolagenC ²³² , vitronektin ²³²
	Imunoglobulinová superrodina	ICAM-1 ²³³ , ICAM-2 ²³³
	Proteiny krevní koagulace	fibrinogen ²³² , faktor X ²³² , kininogen ²³⁶
	Produkty komplementu	iC3b ^{228,232,233,236,237,242}
	Ostatní	haptoglobin ²²⁸ , denaturovaný albumin ²²⁸ , elastasa, myeloperoxidasa ^{234,236} , FHA <i>B. pertussis</i> ³⁴
Neproteinové ligandy		lipopolysacharid (LPS) ²³⁷ , zymosan, β -glukany ²²⁸ , heparin, oligodeoxynukleotidy ²³⁶ , glykofosfatidylinositol (GPI) α ²²⁸
Patogenní mikroorganismy		<i>Candida albicans</i> ²⁴² , <i>Leishmania gp63</i> ²⁴² , <i>Bordetella pertussis</i> ²⁴² , <i>Escherichia coli</i> ²⁴²

3.6.1 STRUKTURA CD11b/CD18

CD11b/CD18 je heterodimerní transmembránový glykoprotein, který se skládá z nekovalentně asociovaných podjednotek CD11b (α_M) a CD18 (β_2). Každá podjednotka má rozsáhlou extracelulární doménu, na kterou navazuje krátký transmembránový segment a krátká cytosolická část^{243,244}. V tomto integrinu bylo objeveno několik zajímavých strukturních domén. V podjednotce CD11b to jsou I-doména, repetice vázající vápenaté ionty a lektinová doména²³⁴. V podjednotce CD18 to jsou I-like doména a oblast bohatá na cysteinové zbytky, která je resistantní vůči proteasám²³⁴ (**Obr. 17**).

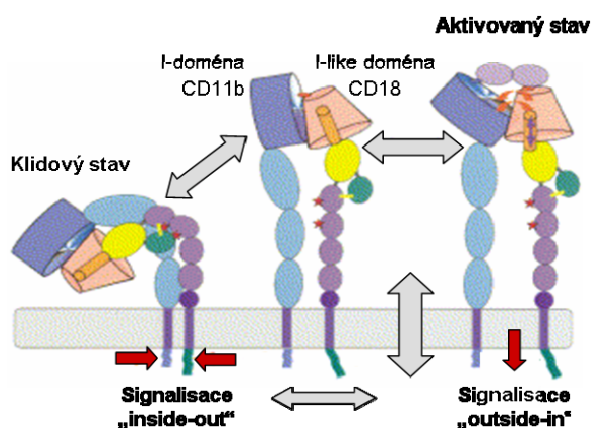


Obr. 17: Strukturní domény integrinu CD11b/CD18. Každá z podjednotek integrinu, CD11b i CD18 má rozsáhlou extracelulární doménu, na kterou navazuje krátký transmembránový segment a krátká cytosolická část. Podjednotka CD11b obsahuje několik strukturních domén, jsou to I-doména, repetice vázající vápenaté ionty a lektinová doména. V podjednotce CD18 je zajímavá I-like doména a oblast bohatá na cysteinové zbytky, která je resistantní vůči proteasám. Struktura celého integrinu připomíná hlavu na dvou nohách. Hlavu tvoří I-doména podjednotky CD11b a I-like doména podjednotky CD18 a jedná se vazebné místo pro většinu ligandů²⁴¹.

Struktura celého integrinu připomíná hlavu na dvou nohách. Hlavu tvoří I-doména podjednotky CD11b a I-like doména podjednotky CD18, zároveň obsahuje vazebné místo pro

většinu ligandů. Je-li integrin v neaktivním (klidovém) stavu, jsou nohy jakoby ohnuty v kolenou a při přechodu do aktivního stavu se narovnají²⁴³ (**Obr. 18**).

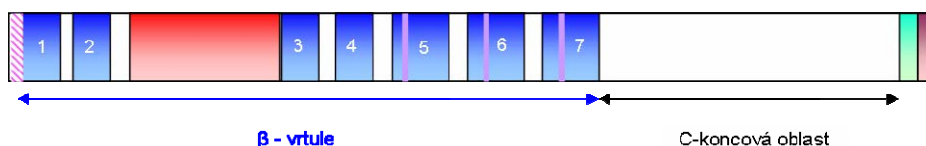
Bylo zjištěno, že tvorba heterodimeru nevyžaduje přítomnost cytoplasmatické a transmembránové části podjednotek CD11b a CD18. Asociace α a β podjednotek vyžaduje pouze přímý kontakt N-koncových oblastí obou podjednotek, v nichž se nachází I-doména a I-like doména²⁴⁵.



Obr. 18: Model přechodu integrinu CD11b/CD18 z klidového do aktivovaného stavu.²²⁵ Struktura celého integrinu připomíná hlavu na dvou nohách. Je-li integrin v klidovém (neaktivním) stavu jsou nohy u sebe a jakoby ohnuty v kolenou. Při přechodu integrinu do aktivovaného stavu se nohy od sebe vzdalují a zároveň se narovnávají, tím dochází k napětí celého integrinu (na obrázku znázorněno šedými šipkami). Přechod integrinu do aktivovaného stavu je indukovan různými stimuly. Může se jednat o přechod aktivovaný vazbou ligandu anebo přechod indukovaný po aktivaci buňky pomocí signalizace „inside-out“. Přechod integrinu do aktivovaného stavu je doprovázen odlišnou vazbou buněčných proteinů na cytosolické domény podjednotek CD11b i CD18. Toto vede k spuštění signalizačních kaskád CD11b/CD18 a signalizaci „outside-in“^{224,225,246}.

3.6.2 STRUKTURA PODJEDNOTKY CD11b

CD11b je protein o 1137 aminokyselinových zbytcích se signálním peptidem dlouhým 16 aminokyselin. Aminokyselinová sekvence podjednotky CD11b má charakteristické rysy transmembránového proteinu s N-koncovou extracelulární doménou dlouhou 1092 zbytků, transmembránovou doménou dlouhou 26 zbytků a C-koncovou hydrofilní doménou dlouhou 19 zbytků. V N-koncové doméně se nachází 19 míst N-glykosylace (N-X-S/T). Molekulová hmotnost neglykosylovaného proteinu činí 125 kDa a glykosylovaného 170 kDa²⁴⁷ (**Obr. 19**).

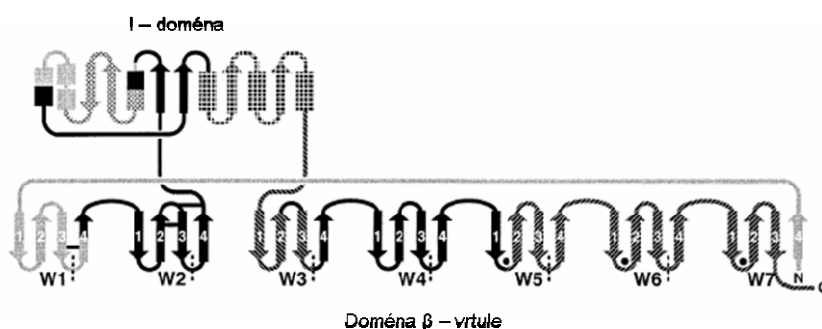


Obr. 19: Schematické znázornění podjednotky CD11b. Obdélník s růžovými proužky představuje signální sekvenci, červeným obdélníkem je znázorněna I-doména, zeleným transmembránová část, fialovým pak cytoplasmatická oblast. Modré obdélníky představují β struktury W1-W7, fialovými proužky v β strukturách 5,6 a 7 jsou znázorněna vazebná místa pro vápenaté ionty.

Primární struktura CD11b zahrnuje sedm vnitřních repeticí o 60 aminokyselinových zbytcích, sbalených do β -struktur^{232,248}, které tvoří β -vrtuli (β -propeller). Každá β -struktura je tvořena čtyřmi antiparalelními β -listy, které tvoří dvojité W. Polypeptidový řetězec tvoří kruh tak, že N- a C-konec β -vrtule spolu sousedí a β -struktura W7 se nachází mezi β -strukturami W6 a W1. β -vrtule je těsně sbalená doména s rozsáhlými hydrofobními kontakty mezi jednotlivými sousedními β -strukturami. Mezi β -strukturami W2 a W3 se nachází I-doména, která tvoří okraj horního povrchu β -vrtule^{232,241,248} (**Obr. 20**).

Repetice W5-W7 vykazují vysoký stupeň homologie a obsahují sekvenci shodnou s kličkou EF-handu pro vazbu Ca^{2+} iontu, která se vyskytuje v proteinech jako je např. kalmodulin. Repetice W1-W4 nemají EF-hand-like sekvence, ale obsahují vysoce konservovanou sekvenci YFGAS/AL a LVTVGAP, která lemují střed repeticí²⁴⁷.

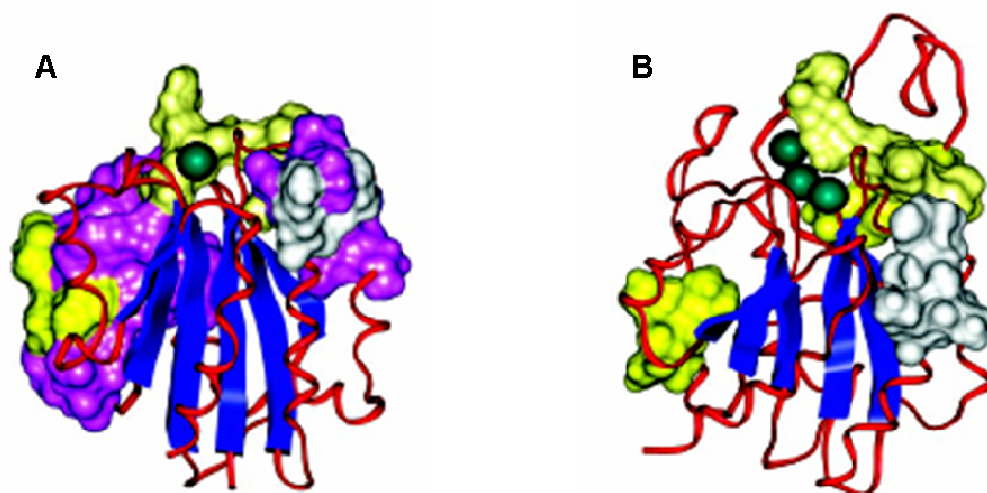
I-doména obsahuje 200 aminokyselinových zbytků, které se skládají do své terciární struktury nezávisle na zbytku podjednotky CD11b. Tato doména má klasické α/β uspořádání se 7 amfipatickými α helixy, které obklopují ze dvou stran 5 převážně paralelních β listů^{224,249,250}. Pět aminokyselinových zbytků lokalizovaných v této I-doméně tvoří vazebné místo pro ion Mg^{2+} , nazývané MIDAS (metal ion-dependent adhesion site). Tento kov koordinují zbytky D140, S142, S144 (tyto tři zbytky tvoří MIDAS motiv – DXSXS), T209 a D242, které jsou kritické pro vazbu ligandu do I-domény^{234,249,251-253}. Kationt Mg^{2+} je uprostřed vazebného místa I-domény a koordinuje konformační změny, které určují zda je CD11b/CD18 ve vysokoafinním nebo nízkoafinním stavu^{228,254} (**Obr. 21**).



Obr. 20: Schematické znázornění struktury β -vrtule²⁴⁸. Černé tečky mezi β listy 1 a 2 W5, W6, W7 znázorňují kation Ca^{2+} .

Lektinová doména se nachází mezi aminokyselinovými zbytky 599 – 1092. Přesná lokalizace a struktura nebyla doposud určena²²⁸.

C-koncová část podjednotky CD11b je složena do domény několikanásobného β sendviče²³².



Obr. 21: Krystalická struktura I-domény podjednotky CD11b^{255,256} a I-like domény podjednotky CD18²⁵⁷. A) I-doména má klasické $\alpha\beta$ uspořádání, kdy sedm amfipatických α helixů (označené červeně) obklopuje ze dvou stran pět převážně paralelních β listů (označené modře). Tmavě zelenou koulí je znázorněn hořečnatý ion, který je vázán v místě MIDAS. Connollyho povrch vazebného místa pro ligandy je znázorněn fialově, šedivě a žlutě²⁵⁸. B) I-like doména podjednotky CD18 vykazuje podobnou strukturu jako I-doména CD11b. Červeně je znázorněna kostra domény a modře pak většinou paralelní β lisy. Tmavě zelené koule představují Ca^{2+} ionty vázané v místě MIDAS. Connollyho povrch vazebného místa je znázorněn šedě (AK 144-148) a žlutě (AK199-203, AK225-230, AK305-309).

3.6.3 STRUKTURA PODJEDNOTKY CD18



Obr. 22: Schematické znázornění podjednotky CD18. Obdélník s růžovými proužky představuje signální sekvenci, červeným obdélníkem je znázorněna I-like doména, zeleným transmembránová část, fialovým cytoplasmatický úsek, modré obdélníky představují čtyři repeticce osmi cysteinových motivů.

CD18 je protein o 769 aminokyselinových zbytcích, který obsahuje rozsáhlou extracelulární doménu, krátkou transmembránovou a cytosolickou část. N-koncový signální peptid o 22 aminokyselinových zbytcích se odštěpuje před zbytkem glutaminu, který je často modifikován na pyroglutamovou kyselinu²⁵⁴. Extracelulární doména obsahuje 677 aminokyselinových zbytků a 6 míst N-glykosylace (N-X-S/T). Na tuto oblast navazuje hydrofobní transmembránová doména o 23 aminokyselinových zbytcích a cytoplasmatická část o 46 aminokyselinových zbytcích, která obsahuje několik nabitých basických zbytků. Molekulová hmotnost neglykosylované podjednotky CD18 po odstranění signální sekvence je 82 kDa a po glykosylaci činí 95 kDa²⁵⁹ (**Obr. 22**).

Zvláštním rysem podjednotky CD18 je vysoký obsah cysteinových zbytků (7,4 %). Aminokyselinové zbytky 445-631 vymezují oblast bohatou na cysteinové zbytky (20 %), která obsahuje čtyři za sebou jdoucí repeticce osmi cysteinových motivů (7 cysteinových zbytků v 1. repeticci). Všech 56 cysteinových zbytků je extracelulárních, což indikuje, že jsou

disulfidicky spojeny. Protože se nevyskytují žádné disulfidické vazby mezi podjednotkami CD11b a CD18, musí být tyto vazby intramolekulární²⁵⁹.

V N-koncové části CD18 je lokalizována I-like doména, která je svou strukturou velmi podobná I-doméně podjednotky CD11b (**Obr. 21**). Obsahuje stejný MIDAS motiv (DXSXS) jako I-doména. Vazebné místo pro ligand je tvořeno čtyřmi na sebe nenavazujícími sekvencemi (R144-K148, Q199-A203, L225-L230 a G305-H309) a je podobné vazebnému místu v I-doméně^{252,257}.

3.6.4 SIGNALIZACE INTEGRINU CD11b/CD18

V oblasti integrinové signalizace existují dva důležité pojmy, a to “inside-out“ a “outside-in“ signalizace. Pojmy znázorňuje **Obr. 18**, který zároveň ukazuje přechod integrinu CD11b/CD18 z klidového do aktivovaného stavu.

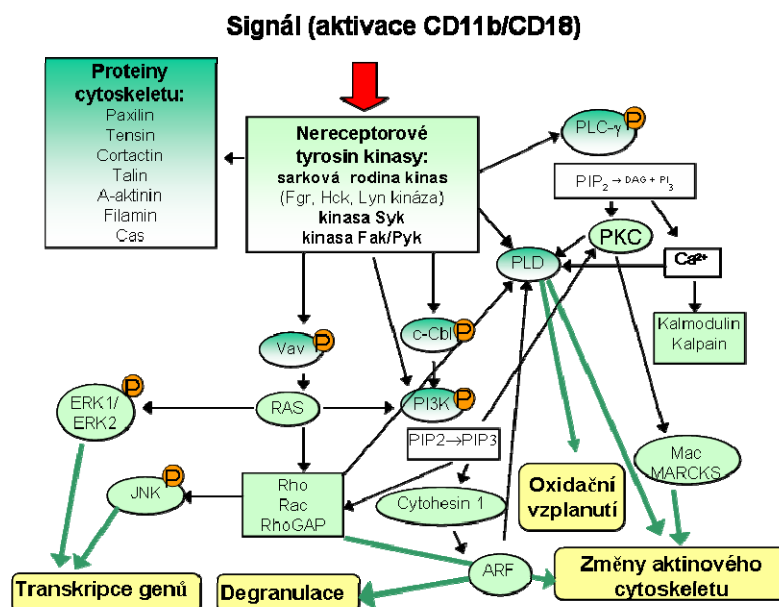
Aktivace fagocytujících buněk různými prozánětlivými mediátory (např. bakteriálními produkty, chemokiny) vyústí v konformační změnu integrinu, která zesílí jeho schopnost vázat ligand. Tento proces se nazývá “inside-out“ signalizace²⁶⁰. Molekulární mechanismus, který zprostředkovává tuto signalizaci, není dosud znám. Předpokládá se však, že tuto signalizaci zprostředkovává více než jedna signalizační dráha²²⁶. Jednou z možných cest by mohl být mechanismus, který je závislý na malé GTPase Rho²⁶¹. “Inside-out“ signalizace zahrnuje změnu afinity i avidity integrinu, která je závislá na buněčném systému a částečně na stimulu, který tuto změnu způsobil²²⁶. Jako stimul pro tuto signalizaci slouží jednak ligandy jiných receptorů, může se jednat o různé prozánětlivé mediátory (např. bakteriální produkty nebo chemokiny), ale také již aktivované molekuly CD11b/CD18, které pozitivně regulují ještě neaktivované molekuly CD11b/CD18. Integriny CD11b/CD18 mohou být rovněž aktivovány v důsledku aktivace jiných integrinů produkovaných buňkou. Komplexnost tohoto systému je dána nutností zprostředkovat buněčnou migraci^{226,262,263}.

Změna afinity, která zahrnuje přechod integrinu z klidového do aktivovaného stavu, může být mimo signalizace “inside-out“ iniciována rovněž vazbou ligandu CD11b/CD18. Mezi klidovým a aktivovaným stavem integrinu existuje určitá rovnováha, kterou je ligand integrinu schopen uzamknout v aktivovaném stavu²²⁵. Tato změna afinity způsobí aktivaci protein kinasy C (PKC) a je regulována GTPasou rodiny Rho. Zvláště cytoplasmatická část podjednotky CD18 a sekvence GFFKR v podjednotce CD11b jsou kritické pro tuto signalizaci, protože asociují s řadou cytoskeletárních proteinů (např. α -aktinem, talinem, filominem, vinkulinem, Rack1)²²⁶.

Změna avidity reguluje množství CD11b/CD18 na povrchu lidských monocytů a neutrofilů²⁶⁴. Je indukována signalizací “inside-out“, ale i vazbou ligandu, zahrnuje shlukování integrinu CD11b/CD18 v určitých membránových oblastech (membrane patches), v klidovém stavu jsou integriny mimo tyto oblasti drženy interakcemi svých cytosolických částí s cytoskeletárními proteiny buňky. Po aktivaci integrinů a změnách v jejich cytosolických doménách pravděpodobně dochází k přerušení těchto interakcí a shlukování integrinů^{226,240,265}. Rovněž je možné, že cytoskeletárními proteiny buňky svou vazbou uzavírají integrin v neaktivním stavu a teprve po přerušení kontaktu cytosolických domén podjednotek CD11b a CD18 s těmito proteiny dochází k interakci cytosolických domén s jinými buněčnými proteiny (jiné cytoskeletární a adaptorové proteiny, nereceptorové tyrosin kinasy) a spuštění “outside-in“ signalizace integrinů²⁶⁶. Signalizace je závislá na fosfoinositol-3-kinase (PI-3-kinase) a reorganizaci cytoskeletárního aktinu. Tuto cestu aktivuje vazba Fc γ receptoru, ale není aktivována, pokud jsou leukocyty aktivovány receptorem pro peptidy zánětu²²⁶. V neutrofilech může cestu vedoucí k “inside-out“ signalizaci zprostředkovat serin/threonin kinasa Pak 1²²⁶. Propojení integrinu s protilátkami, vazba se specifickými ligandy nebo společná vazba s ostatními povrchovými strukturami či receptory způsobí aktivaci některých signalizačních cest, což vede k rozmanitým buněčným odpovědím, např. ke změně v expresi některých genů, diferenciaci buněk či jejich migraci. Tento děj se nazývá “outside-in“ signalizace. Přestože aktivace fokální adhesní kinasy (FAK) je důležitá pro mnoho “outside-in“ signalizací integrinů, protože váže peptidy na bázi cytoplasmatické domény podjednotky CD18, není FAK kritická pro “outside-in“ signalizaci β_2 integrinů²²⁶. Vlastní mechanismus spuštění signalizace “outside-in“ však podobně jako u signalizace “inside-out“ stále není znám (**Obr. 23**).

CD11b/CD18 je dále schopen v cytoplasmatické membráně buňky interagovat s různými GPI-kotvícími proteiny, které postrádají cytosolickou část. Jedná se například o receptor pro LPS (CD14) nebo receptor uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor). V této asociaci poskytuje integrin CD11b/CD18 těmto povrchovým molekulám schopnost transmembránové signalizace^{233,267,268}.

Obecně lze říci, že tak jako váže integrin CD11b/CD18 širokou škálu ligandů, používá i mnoho různých signalizačních cest, které zahrnují MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskádu, PI-3-kinasu, tyrosinové kinasy rodiny Src (Frg, Hck, Lyn), kinasu Syk a FAK^{261,264,269,270}.



Obr. 23: Schematický obrázek “outside-in“ signalizace integrinu CD11b/CD18^{225,233,260,270}. Po vazbě a aktivaci integrinu CD11b/CD18 (na obrázku znázorněno červenou šipkou) dochází k aktivaci mnoha signalizačních drah. Jejich vzájemná spolupráce („cross-talk“) s ostatními signalizačními dráhami buňky aktivovanými jinými stimuly je zodpovědná za rozmanité buněčné odpovědi. Dráhy signalizace CD11b/CD18 jsou schopné zprostředkovat cytoskeletární změny nutné pro migrační pohyb buňky, ale rovněž také pro fagocytózu bakterie. Dráhy také spouští genovou transkripci a aktivují buňku ke zničení bakterie²⁷¹. Vazba ligandu na CD11b/CD18 iniciuje vytvoření multiproteinového signalizačního komplexu složeného z nereceptorových tyrosin kinas, cytoskeletárních a adaptorových proteinů. Signální dráhy CD11b/CD18 jsou závislé na intracelulárních tyrosin kinasách, klíčové se jeví kinasové rodiny (p58^{Fgr}, p59/61^{Hck}, p53/56^{Lyn}) a kinasa Syk^{266,272}. Přestože aktivace FAK (fokální adhezní kinasy) je důležitá pro mnoho “outside-in“ signalizací integrinů, není FAK klíčová pro “outside-in“ signalizaci β_2 integrinů²⁷³. Její zapojení je zprostředkované a nejví se jako kritické. Aktivace kinas vede k fosforylaci asociovaných cytoskeletárních proteinů jako je paxilin, talin, α -aktinin a toto způsobuje cytoskeletární změny. Aktivace tyrosin kinas vede také k aktivaci signálních drah fosfolipasy C (PLC) a fosfatidyl-inositol-3-kinasy (PI3K)^{274,275}. PLC iniciuje uvolnění intracelulárních zásob vápníku a následný vstup vápníku z extracelulárního média²⁷⁶. Tyto události rovněž vedou k aktivaci proteinů depolymerizujících aktin a následně k reorganizaci aktinového cytoskeletu. Zprostředkovaně dochází rovněž k aktivaci fosfolipasy D (PLD) a malých GTPas Rho a Rac²⁷⁷. Vazba ligandu na CD11b/CD18 může rovněž iniciovat aktivaci MAP-kinasových drah (konkrétně ERK a JNK) a tím spustit genovou transkripci a aktivaci buňky^{225,233,260,270,278}.

3.7 INTERAKCE PROTEINŮ SE SACHARIDY

Lektiny jsou proteiny, které se váží na cukerné molekuly, avšak enzymově je nemění²⁷⁹. Zúčastňují se mnoha významných biologických pochodů, jako například iniciace infekce, oplodnění, růst, diferenciace. Jsou však také využívány ke studiu imunitního systému a interakcí proteinů se sacharidy. Jejich specifita je obvykle definována monosacharidy a oligosacharidy, které jsou tak i nejlepšími inhibitory²⁸⁰.

Zbytky kyseliny sialové, které se nachází na koncích oligosacharidových řetězců mnoha plasmatických proteinů, chrání tyto proteiny před degradací v játrech. Například struktura ceruloplasminu obsahuje několik oligosacharidových řetězců končících sialovou kyselinou. Odstranění zbytku kyseliny sialové pomocí neuraminidasy je jedna z metod, kterými se v organismu označují “staré“ proteiny pro jejich degradaci a nahrazení novými. Plasmatická membrána hepatocytů obsahuje lektiny specifické pro nesialované proteiny

(asialoglykoproteinový receptor). Interakce tohoto receptoru s glykoproteinem bez zbytků sialové kyseliny pak vede k endocytose tohoto proteinu a jeho následné degradaci v hepatocytech. Obdobný mechanismus je využit např. i při odstraňování starých erytrocytů z krevního řečiště. Pomocí označení glykoproteinů různými koncovými oligosacharidy a jejich následnou interakcí s hepatocyty je regulován také poločas života mnoha hormonů (luteinizační hormon, thyreotropin)²⁸¹.

Některé mikroorganismy využívají lektiny na zprostředkování bakteriální adheze na hostitelské buňky anebo pro průnik toxinů do buněk. *Helicobacter pylori*, bakterie odpovědná za většinu případů žaludečních vředů, adhezuje na vnitřní povrch žaludku díky interakci mezi bakteriálními membránovými lektiny a specifickými oligosacharidy membránových glykoproteinů epiteliálních buněk. Jedním z vazebných míst rozeznávaných *H. pylori* je oligosacharid Le^b, který je součástí determinantu krevní skupiny O. Toto pozorování vysvětlilo několikrát vyšší výskyt žaludečních vředů u lidí s touto krevní skupinou a současně umožnilo i navržení jednoho ze způsobů léčby - podáváním syntetického analogu Le^b²⁸².

I mnoho virů využívá interakci svých povrchových molekul s glykoproteiny hostitelských buněk. Jedním z příkladů je virus chřipky a jeho povrchový protein hemagglutinin, který je esenciální pro vstup viru do buňky²⁸³.

Vzhledem k tomu, že CyaA je schopen se vázat na mnoho typů buněk, které nemají integrinový receptor CD11b/CD18, je možné, že tuto interakci zprostředkovávají sacharidy na buněčném povrchu. CyaA by tedy mohl mít lektinovou aktivitu.

Tab. 2: Lektiny a jimi rozeznávané oligosacharidy.

Lektin	Zkratka	Rozeznávaný sacharid
Rostliny		
Konkavalin A	ConA	Man α 1-OCH ₃
Aglutinin pšeničných klíčků (Wheat germ agglutinin)	WGA	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc GlcNAc(β 1 \rightarrow 4)GlcNAc
Ricin		Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Aglutinin <i>Lens culinaris</i>	LCA	
Savci		
Galektin-1		Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Manosu vázající protein A (Mannose-binding protein)	MBP-A	Oligosacharidy s vysokým obsahem mannosy
Viry		
Hemagglutinin viru chřipky (Influenza virus hemagglutinin)	HA	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 6)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Protein 1 polyoma viru	VP1	Neu5Ac(α 2 \rightarrow 3)Gal(β 1 \rightarrow 4)Glc
Bakterie		
Enterotoxin	LT	Gal
Cholera toxin	CT	GM1 pentasacharid

4 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

PRODUKCE A PURIFIKACE INTEGRINU CD11b/CD18

- Produkce integrinové podjednotky CD11b v bakterii *E. coli* a její purifikace pro imunizace a přípravu specifických protilátek.
- Produkce integrinu CD11b/CD18 v hmyzích buňkách S2.

ANALYSA INTERAKCE RTX TOXINŮ S β_2 INTEGRINY

- Ověřit roli N-glykosylace β_2 integrinových receptorů při vazbě CyaA a jiných RTX toxinů.

IMUNOLOGICKÉ VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU MYKOBAKTERIÁLNÍCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

(ve spolupráci s laboratoří Dr. C. Leclerc, Institut Pasteur)

- Využít purifikované fúzní proteiny CyaA s mykobakteriálními epitopy ke studiu schopnosti CyaA dopravovat tyto epitopy do antigen prezentujících buněk pro jeho prezentaci na molekulách MHC I. a II. třídy a indukci specifické CD4⁺ a CD8⁺ T-buněčné imunitní odpovědi *in vitro* a *in vivo* a dále k navození imunitní odpovědi proti *M. tuberculosis* a zjistit míru poskytované ochrany proti tomuto patogenu.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

[2,3-³H] cAMP, INC, USA
3-isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), Sigma-Aldrich, USA
[α -³²P]ATP, INC, USA
 β -merkapt ethanol, Merck, SRN
[γ -³²P]ATP, INC, USA
 λ -DNA, MBI Fermentas, Litva
Adenosin-5'-trifosfát (ATP), Sigma-Aldrich, USA
Adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát (cAMP), Sigma-Aldrich, USA
Agarosa pro DNA elektroforesu, Promega, USA
Akrylamid, Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin, Biotika, Slovenská Republika
Antibiotika (10 000 U/ml penicilin G, 10 mg/ml streptomycin a 25 μ g/ml amphotericin B) 100x koncentrovaný roztok, Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný, Sigma-Aldrich, USA
Bacto-tryptone, Oxoid, Anglie
Bakteriologický agar, Oxoid, Anglie
Bromfenolová modř, Sigma-Aldrich, USA
Complete Mini (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets), Roche, SRN
Coomassie Blue G-250, Serva, SRN
Coomassie Blue R-250, Serva, SRN
D-Arabinosa, Sigma-Aldrich, USA
D-Fruktosa, Lachema, Česká republika
D-Mannosa, Sigma-Aldrich, USA
D-Xylosa, Lachema, Česká republika
DEAE-Sepharosa CL-6B, Pharmacia, Česká republika
Dextran T-500, Pharmacosmos, Dánsko
Dihydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lachema, Česká republika
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA
Dithiothreitol (DTT), Serva, SRN
dNTP mix (10 mM roztok), MBI Fermentas, Litva
Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN
Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného, Lachema, Česká republika
Ethanol, Lachema, Česká republika
Ethidiumbromid, Serva, SRN
Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, SRN
Ethylendiamintetraoctová kyselina 0,02 % (w/v), Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha
F-12 médium, Sigma-Aldrich, USA
Fenol, Sigma-Aldrich, USA
Fetální hovězí sérum (FCS), Biochrom, SRN
Ficoll-paque plus, Amersham biosciences, USA
Galakturonová kyselina, Lachema, Česká republika
Glukosa, 25 % (w/v), Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha
Glukosa, Lachema, Česká republika

Glycerol, Lachema, Česká republika
Glycin, Serva, SRN
Hovězí sérový albumin (BSA), frakce V, Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan draselný, Lachema, Česká republika
Hydrogenfosforečnan sodný (heptahydrát), Lachema, Česká republika
Hydrogenuhlíčitán sodný, 7,5 % (w/v), Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha
Hydroxid draselný, Lachema, Česká republika
Hydroxid sodný, Lachema, Česká republika
Chloramfenikol, Merck, SRN
Chlorid draselný, Lachema, Česká republika
Chlorid hořečnatý, Lachema, Česká republika
Chlorid sodný, Lachema, Česká republika
Chlorid vápenatý, Lachema, Česká republika
Chloroform, Penta, Česká republika
Chlorpromazin, Sigma-Aldrich, USA
Imidazol, Fluka, SRN
Isopropanol, Neratovice, Česká republika
Isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin, Sigma-Aldrich, USA
Kvasničný extrakt, Oxoid, Anglie
Kyselina boritá, Lachema, Česká republika
Kyselina chlorovodíková, Lachema, Česká republika
Kyselina fosforečná, Lachema, Česká republika
Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES), Serva, SRN
Kyselina octová, Lachema, Česká republika
L-Fukosa, Sigma-Aldrich, USA
L-glutamin, 3 % (w/v), Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha
Lipofectamine 2000, Invitrogen, USA
Methanol, Lachema, Česká republika
Mléko odtučněné sušené, Milli, Česká republika
Močovina, Lachema, Česká republika
N-acetylgalaktosamin, Sigma-Aldrich, USA
N-acetyllaktosamin, Calbiochem, USA
N-acetylmannosamin, Sigma-Aldrich, USA
N,N'-diacetylchitobiosa, MP biomedical, USA
N,N',N'-triacetylchitobiosa, MP biomedical, USA
N,N'-metylenbis-akrylamid, Serva, SRN
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), Serva, SRN
Ni-NTA agarosa, Qiagen, SRN
Nitroceluloseová membrána BioTrace NT, Pall, USA
Octan drasekný, Lachema, Česká republika
Octan sodný, Lachema, Česká republika
O-nitrophenyl- β -D-galaktosid, Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd, Sigma-Aldrich, USA
Phenyl -Sepharosa, Pharmacia, Česká republika
Peroxid vodíku, Lachema, Česká republika
Persulfát amonný (APS), Serva, SRN
Pyrofosforečnan sodný, Lachema, Česká republika
Pyruvát, 1,1 % (w/v), Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha

RPMI s NaHCO₃, Přípravná medií, ÚMG AV ČR, Praha
Rychloustalovač pro ruční zpracování RTG filmů, Foma, Česká republika
Sestava na izolaci DNA, Top-Bio, Česká republika
Sestava QCL-100 na stanovení LPS, Cambrex, USA
Schneider's Drosophila médium, Gibco, USA
Sialová kyselina, Sigma-Aldrich, USA
Síran hořečnatý, Sigma-Aldrich, USA
Síran sodný, Fluka, SRN
Standardy (High Range Molecular Weight Standards) pro určování hmotnosti proteinů pro SDS-PAGE o složení: myosin (205 kDa), β-galaktosidasa (116,5 kDa), fosforylasa (97,4 kDa), BSA (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), anhydrasa (31 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa) a lysozym (14 kDa); Bio-Rad, USA
Tetracyklin hydrochlorid, Sigma-Aldrich, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Serva, SRN
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN
Triton X-100, Amersham, USA
Trypanová modř, Sigma-Aldrich, USA
Trypsin inhibitor, Sigma-Aldrich, USA
Tunikamycin, Sigma-Aldrich, USA
Tween 20, Sigma-Aldrich, USA
Uhlíčitán sodný, Lachema, Česká republika
Vývojka pro ruční zpracování RTG filmů, Foma, Česká republika
Voda pro tkáňové kultury, ÚMG AV ČR, Praha
Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

5.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Bürkerova komůrka, Marienfeld, SRN
CO₂ inkubátor IG 150, Jouan, Francie
Digitální analytické váhy, Mettler, SRN
Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Fluorescenční průtokový cytometr LSR II, BD Biosciences, USA
Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko
Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, Votice
Laminární box MSC 12, Jouan, Francie
Mrazicí box (-150 °C), Sanyo, USA
Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Jugoslávie
Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Francie
Odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN
Odstředivak Sorvall OTD Combi, Du Pont Instruments, USA
Odstředivka Sorvall RC5C Plus, Du Pont Instruments, USA
Odstředivka Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA
Odstředivka Sorvall RT6000B, Du Pont Instruments, USA
Odstředivka Universal 32R, Hettich Zentrifugen, SRN
pH-metr MV 870, Präcitronick, NDR
Předvážky Nagema, OWA Labor, NDR
Sestava pro magnetickou separaci, MACS Myltenyi Biotec, SRN
Scintilační kapalínový počítač WALLAC 1410, Pharmacia, Švédsko
Spektrofotometr pro mikrotitrační destičky Twinreader Plus, Labsystems, USA
Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie
Suchý termostatovaný blok, Vývojové dílny ČSAV, Česká republika
Temperovaná ploténka, Výroba elektrických zařízení, Česká republika

Termostatovaná vodní lázeň typ 357, Elpan, Polsko
 Termostatovaná vodní lázeň typ U7C, VEC MLW, SRN
 Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, SRN
 Ultrasonikátor S300, Misonix, USA
 Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., USA
 Zařízení pro DNA elektroforesu, Bio Rad, Inc., USA
 Zařízení pro DNA elektroforesu, MBÚ AV, Česká republika
 Zařízení pro izolaci DNA (Lego-kit), TopBio, Česká republika
 Zařízení pro Western blot Semiphor, Hoefler, USA
 Zdroj pro elektroforézu, Vývojové dílny ČSAV, Česká republika
 Zdroj UV záření, Ultra Violet Products, Inc., USA

5.3 POUŽITÉ RESTRIKČNÍ ENDONUKLEASY

Tab. 3: Seznam použitých restričních endonukleas

Enzym	Zásahové místo	Výrobce	Vhodný reakční NEB pufr	Reakční teplota (°C)	Vyžaduje 0,01% BSA
Bal I	TGG/CCA	NEB, USA	4	37	ne
BspE I	T/CCGGA	NEB, USA	3	37	ne
BspLU 11I	A/CATGT	Roche, SRN	zvláštní pufr	37	ne
BsrG I	T/GTACA	NEB, USA	2, 4	37	ano
BstB I	TT/CGAA	NEB, USA	4	65	ne
Ecl136 II	GAG/CTC	MBI Fermentas, Litva	Zvláštní pufr	37	ano
EcoR I	G/AATTC	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
EcoR V	GAT/ATC	NEB, USA	3	37	ano
Fsp I	TGC/GCA	NEB, USA	4	37	ne
Hinc II	GTY/RAC	NEB, USA	2, 3, 4	37	ano
Hind III	A/AGCTT	NEB, USA	2	37	ne
Kpn I	GGTAC/C	NEB, USA	1	37	ano
Nco I	C/CATGG	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne
Nde I	CA/TATG	NEB, USA	2,4	37	ne
Nsi I	ATGCA/T	NEB, USA	3	37	ne
Sal I	G/TCGAC	NEB, USA	3	37	ano
Sph I	GCATG/C	NEB, USA	1, 2, 4	37	ne
Xba I	T/CTAGA	NEB, USA	2	37	ano
Xho I	C/TCGAG	NEB, USA	2, 3, 4	37	ano

Y..... pyrimidinová báze

R..... purinová báze

5.4 OSTATNÍ ENZYMY

- Alkalická fosfatasa (SAP), MBI Fermentas, Litva
- Pankreatická ribonukleasa (RNasa), MBI Fermentas, Litva
- T4 DNA-ligasa, MBI Fermentas, Litva - dodávaný s T4 DNA ligačním pufrům (10x koncentrovaný, pH 7,5, 660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP)
- T4 DNA polymerasa, New England Biolabs, USA
- Phusion polymerasa (Finnzymes, Finsko) s kompletním pufrům (10x koncentrovaný, pH 8,8, 100 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100)
- RNasa A, Qiagen, SRN
- Trypsin, Sigma-Aldrich, USA

5.5 SEZNAM POUŽITÝCH PROTILÁTEK

- anti-6xHis monoklonální protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou, Sigma-Aldrich, USA
- anti-CD11b monoklonální protilátka MEM174, V. Hořejší, ÚMG AV Česká republika
- anti-CD11b monoklonální protilátka konjugovaná s fykoerytrinem M1/70PE, Pharmingen, USA
- anti-CD18 monoklonální protilátka MEM48, V. Hořejší, ÚMG AV Česká republika
- anti-FLAG monoklonální protilátka M2, Sigma-Aldrich, USA
- anti-myší Ig protilátka konjugovaná s AlexaFluor488, Molecular probes, USA
- anti-myší Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA
- anti-králičí Ig protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA
- anti-myší Ig protilátka konjugovaná s magnetickými partikulami, MACS Myltenyi Biotec, SRN

5.6 POUŽITÉ ROZTOKY A PUFRY

30% roztok akrylamidu pro SDS-PAGE:

Akrylamid	29% (w/v)
N,N'-metylenbisakrylamid	1% (w/v)

Alserver:

Glukosa	2,05% (w/v)
Kyselina citrónová	0,055% (w/v)
Dihydrogencitronan sodný	0,683% (w/v)
NaCl	0,42% (w/v)

Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut).

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	225 ml
Voda	225 ml
Kyselina octová	50 ml
Coomassie Brilliant blue G250	0,5 g

BFB (5x koncentrovaný):

Bromfenolová modř	0,25 (w/v)
Glycerol	40 % (v/v)

Blotovací pufr:

Glycin	39 mmol/l
Tris	48 mmol/l
SDS	0,0375 % (w/v)
Methanol	20% (w/v)

pH 8,3

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant blue R250	0,01 % (w/v)
Ethanol	4,7 % (v/v)
H ₃ PO ₄	8,7 % (v/v)

HBSS s 1 % glukosou:

HEPES	10 mmol/l
NaCl	140 mmol/l
KCl	5 mmol/l
Glukóza	1 % (w/v)
CaCl ₂	2 mmol/l

pH 7,4

MgCl₂ 2 mmol/l

Chemiluminiscenční roztok A: pH 8,8

Roztok 1:

Luminol (rozpustit v DMSO) 2,5 mmol/l
Tris-HCl 100 mmol/l

Roztok 2:

Kyselina p-kumarová (rozpustit v DMSO) 90 mmol/l

Výsledný roztok A: k 10 ml roztoku 1 přidat 44µl roztoku 2

Chemiluminiscenční roztok B: pH 8,5

H₂O₂ 5,4 mmol/l
Tris-HCl 100 mmol/l

Před detekcí byly smíchány chemiluminiscenční roztok A a roztok B v poměru 1:1. Roztoky byly před detekcí uchovávány zamrazené při teplotě -80°C.

Lyzační roztok: pH 7,4

Tris-HCl 50 mmol/l
NaCl 150 mmol/l
Triton X-100 1 %

Do lyzačního roztoku byl přidán ještě inhibitor proteas (EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets) v množství 1 tableta do 10 ml lyzačního roztoku (dle instrukcí výrobce) pro inhibici proteolytického štěpení proteinů.

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol 250 ml
Voda 650 ml
Kyselina octová 100 ml

PBS: pH 7,4

NaCl 138 mmol/l
KCl 3 mmol/l
Na₂HPO₄ 12 mmol/l
KH₂PO₄ 2 mmol/l

PBST

Tween 20 0,1 % (w/v)
v PBS

PBST/mléko

Sušené mléko 5 % (w/v)
Tween 20 0,1 % (w/v)
v PBS

PBS/BSA

BSA 2 % (w/v)
v PBS

PBS/BSA-E

BSA 0,5 % (w/v)
EDTA 2 mmol/l
v PBS

Promývací pufr A pro Phenyl-Sepharosu: pH 8,0

Tris-HCl 50 mmol/l

Isopropanol 60 % (v/v)

Promývací pufr B pro Phenyl-Sepharosu: pH 8,0

Tris-HCl 50 mmol/l

Reakční směs pro stanovení cyklosové aktivity:

Tris-HCl (pH 8,0) 60 mmol/l

MgCl₂ 7 mmol/l

CaCl₂ 0,1 mmol/l

Triton X-100 0,1% (v/v)

BSA 1 mg/ml

Kalmodulin 1 μ mmol/l

cAMP 0,1 mmol/l

[2,8-³H]cAMP asi 200 dpm/μl

ATP 2 mmol/l

[α-³²P]ATP asi 10000-20000 dpm/μl

Uchovává se při -20°C.

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 7,5 %: pH 8,8

30 % roztok akrylamidu 1,24 ml

Destilovaná voda 1,8 ml

1 M Tris-HCl pufr 1,87 ml

10 % SDS 50 μl

20 % APS 12,5 μl

TEMED 12,5 μl

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE 15 %: pH 8,8

30 % roztok akrylamidu 2,5 ml

Destilovaná voda 0,55 ml

1 M Tris-HCl pufr 1,87 ml

10 % SDS 50 μl

20 % APS 12,5 μl

TEMED 12,5 μl

Roztok I: pH 8,0

Glukosa 50 mmol/l

Tris-HCl 25 mmol/l

EDTA 10 mmol/l

Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Uchovává se při 4°C.

Roztok II:

NaOH 0,2 mmol/l

SDS 1% (w/v)

Roztok III:

5 mol/l octan draselný 60 ml

Ledová kyselina octová 11,5 ml

Voda 28,5 ml

Uchovává se při 4°C.

TB pufr:

HEPES 10 mmol/l

CaCl₂ 15 mmol/l

KCl 250 mmol/l

pH se upraví na 6,7 pomocí 1 M KOH a poté se přidá $MnCl_2$ do výsledné koncentrace 55 mmol/l. Roztok se sterilizuje filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,45 μm

TBE pufr:		pH 8,3
Tris	90 mmol/l	
Kyselina boritá	90 mmol/l	
EDTA	2 mmol/l	
TBS:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	150 mmol/l	
pH se upraví na 7,6 pomocí HCl		
TBST:		
Tween 20 v TBS	0,1 % (w/v)	
TBST/BSA		
BSA v TBST	2 % (w/v)	
TC pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
$CaCl_2$	2 mmol/l	
TCT pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
$CaCl_2$	2 mmol/l	
Triton X-100	0,1% (v/v)	
TCU pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
$CaCl_2$	2 mmol/l	
Močovina	8 mol/l	
TE pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	10 mmol/l	
EDTA	1 mmol/l	
TN pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	300 mmol/l	
TN-A pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	100 mmol/l	
NaCl	50 mmol/l	
TN-B pufr (Ekvilibrační pufr pro Phenyl-Sepharosu):		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	1 mol/l	
TNE pufr:		pH 8,0
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	150 mmol/l	
EDTA	1 mmol/l	

Tris-glycinový pufr:		pH 8,3
Tris	25 mmol/l	
Glycin	250 mmol/l	
SDS	0,1 % (w/v)	
TS pufr		pH 7,4
Tris-HCl	50 mmol/l	
SDS	10 % (w/v)	
TUMC pufr:		pH 8,0
Močovina	4 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
CaCl ₂	2 mmol/l	
MgCl ₂	2 mmol/l	
Uchovávací roztok pro SDS-PAGE:		
Methanol	25 ml	
Voda	450 ml	
Glycerol	25 ml	
UT pufr:		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
UT-B pufr (Eluční pufr pro Phenyl-Sepharosu):		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
UTN pufr:		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	100 mmol/l	
NaCl	50 mmol/l	
UTN-A pufr (Ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu):		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	120 mmol/l	
UTN-B pufr (Eluční pufr pro DEAE-Sepharosu):		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	200 mmol/l	
UTNI pufr:		pH 8,0
Močovina	8 mol/l	
Tris-HCl	50 mmol/l	
NaCl	300 mmol/l	
Imidazol	250 mmol/l	
Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:		pH 6,8
Tris-HCl	50 mmol/l	
DTT	100 mmol/l	
SDS	2 % (w/v)	
Bromfenolová modř	0,1 % (w/v)	

Glycerol 10 % (v/v)
 Roztok se uchovává zamražený při teplotě -20°C. Před použitím se přidá 2-merkптоethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE 5 %:		pH 6,8
30 % roztok akrylamidu.	266 µl	
Destilovaná voda	1,23 ml	
1 M Tris-HCl pufr (pH 6,8)	200 µl	
10 % SDS	60 µl	
20 % APS	20 µl	
TEMED	5 µl	

5.7 SYNTETICKÉ OLIGONUKLEOTIDY

Oligonukleotidy byly dodány jako jednovláčková DNA v lyofilizované formě (Vienna Biocenter, Rakousko; Generi Biotech, Hradec Králové, ČR). Pro následné použití ke vkládání do plasmidové DNA byly rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 100 µM. Směs dvou komplementárních oligonukleotidů byla inkubována při teplotě 70°C po dobu 10 minut a poté pozvolna ochlazena na pokojovou teplotu. Tímto způsobem byly oligonukleotidy převedeny na dvouvláčkovou formu DNA. Pro použití k sekvenaci DNA byly oligonukleotidy rozpuštěny v TE pufru na výslednou koncentraci 10 pmol/µl.

Tab. 4 Použité oligonukleotidy

Oligonukleotidy kódující úsek od 18. do 30. aminokyseliny epitopu TB 10.4	
TB10.4:18-30-I	5'-GTACCTATGGCTGGTTACGCTGGTACCCTGCAGTCTCTGGGTGCTTAC-3'
TB10.4:18-30-II	5'-GTACGTAAGCACCCAGAGACTGCAGGGTACCAGCGTAACCAGCCATAG-3'
Oligonukleotidy obsahující restriční místo pro endonukleasu <i>Hind</i> III	
TB-ad-I	5'-GTACCACGTCGTCGTCGTAAGCTTACGTCGTCGTCGTTAC-3'
TB-ad-II	5'-GTACGTAACGACGACGACGTAAGCTTTTACGACGACGACGTG-3'
Primery pro amplifikaci celého antigenu TB 10.4 z bakterie <i>M. tuberculosis</i>	
TB-adforw	5'-CATGAAGCTTAATGTCGCAAATCATGTACAACACTAC-3'
TB-adrev	5'-GATGAAGCTTGTAACGCCGCCCATTTGGCGGC-3'
Oligonukleotidy k odstranění signální sekvence podjednotky CD18	
CD 18-1	5'-CCCATGGCACAGGAGTGCACGAAGTTCAAGGTCAGCAGCTGCCGGGAATGCA-3'
CD 18-2	5'-TTCCCGGCAGCTGCTGACCTTGAAGTTCGTGCACTCCTGTGCCATGGGGTAC-3'
Primery pro amplifikaci části podjednotky CD18	
CD 18 for	5'-CGAGTGCCTGAAGTTCGAAA -3'
CD 18 rev	5'-GCGCTGTACAAGTTGTCCTCCAGGTG-3'
Primery pro odstranění signální sekvence podjednotky CD11b	
CD11b orf-1	5'-CGGGGTACCCCATGGCATTCAACTTGGACACTGAAAAC-3'
CD11b orf-2	5'-CGTCCGGAATTCTTCAGAGTAC-3'
Primery pro amplifikaci části podjednotky CD11b	
CD11b for	5'-CTGAACCAGACTGTCATATGGG-3'

CD11b rev	5'-CGCGGTCGACGGGGTTGGGGACCTCGAA-3'
Primery pro amplifikaci 4 fragmentů podjednotky CD11b	
CD11bI for	5'-CGCGCATATGTTCAACTTGGGACACTGAAAACG-3'
CD11bI rev	5'-CGCGCTCGAGCGTGATGACAACACTAGGATCTT-3'
CD11bII for	5'-CGCGCATATGGATGGAGAAAAGTTTGGCGAT-3'
CD11bII rev	5'-CGCGCTCGAGCCTGGGCAAGGGGCACAC-3'
CD11bIII for	5'-CGCGCATATGGGGCAGAGGGCTCGGTGG-3'
CD11bIII rev	5'-CGCGCTCGAGCACCAGAGAGAAGTTCAGGC-3'
CD11bIV for	5'-CGCGCATATGGGAACGCCATTGTCTGCTTT-3'
CD11bIV rev	5'-CGCGCTCGAGGACAGTCTGGTTCAGCCGG-3'

5.8 POUŽITÁ KULTIVAČNÍ MÉDIA

5.8.1 KULTIVAČNÍ MÉDIA PRO BAKTERIÁLNÍ KULTURY

5.8.1.1 Tekutá kultivační média

LB médium (Luria-Bertani médium):

Bacto-tryptone	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
Deionizovaná voda	do 1000 ml

MDO médium:

NaH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
Thiamin	10 mg
Kvasničný extrakt	20 mg
Glycerol	20 mg
Deionizovaná voda	do 1000 ml

Upraví se na pH 7,0 pomocí 5 mol/l NaOH. Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut).

SOB médium:

Bacto-tryptone	20 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,2 g
Deionizovaná voda	ad 990 ml

Steriluje se autoklávováním (0,12 MPa, 20 minut). Poté se přidá 10 ml sterilního roztoku 1 mmol/l MgCl₂ a 1 mmol/l MgSO₄.

Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

Médium s antibiotikem:

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilaci a vychladnutí se k médiu přidá příslušné antibiotikum do výsledné koncentrace (**Tab. 5**).

5.8.1.2 Tuhá kultivační média**LB médium s antibiotikem:**

Připraví se LB médium a před sterilací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilaci a vychladnutí se k médiu příslušné antibiotikum do výsledné koncentrace (**Tab. 5**).

Tab. 5: Koncentrace antibiotik pro bakteriální kultury

Antibiotikum	Koncentrace (µg/ml)
Ampicilin	150
Chloramfenikol	100
Kanamycin	60
Tetracyklin	12,5

5.8.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA PRO TKÁŇOVÉ LINIE**F-12 médium**

5,75 g práškového média bylo rozpuštěno v 16,7 ml 7,5 % NaHCO₃ (Přípravna médií, ÚMG AV ČR, Praha), objem byl doplněn vodou pro tkáňové kultury (Přípravna médií, ÚMG AV ČR, Praha) do 450 ml. Poté bylo uoraveno pH na hodnotu 7,3 a médium bylo přefiltrováno přes 0,22 µm filtr. K takto připravenému médiu bylo přidáno 50 ml FCS a 5 ml 100x koncentrovaného roztoku antibiotik.

RPMI (Roswell Park Memorial Institute):

K 450 ml média RPMI s NaHCO₃ (Přípravna médií, ÚMG AV ČR, Praha) byl přidán L-glutamin (5 ml 3 % L-glutaminu), glukóza (9 ml 25 % glukózy), pyruvát (2,5 ml 1,1 % pyruvátu), antibiotika (5 ml 100x koncentrovaného roztoku Sigma-Aldrich) a FCS (50 ml).

Schneider's Drosophila medium

K 450 ml média Schneider's Drosophila medium (Gibco, USA) bylo přidáno FCS (50 ml)

Schneider's Drosophila medium s antibiotikem

K 45 ml média Schneider's Drosophila medium (Gibco, USA) bylo přidáno FCS (5 ml) a antibiotikum do výsledné koncentrace (**Tab. 6**).

Tab. 6: Koncentrace antibiotik pro tkáňové kultury

Antibiotikum	Koncentrace (µg/ml)
Blasticidin	25
Hygromycin	100

5.9 **PLASMIDY**

Název	Rezistence	Popis/Původ	Citace
pT7CACT1	Ampicilin	Gen <i>cyaA</i> kódující CyaA a gen <i>cyaC</i> kódující CyaC, protein nezbytný pro posttranslační modifikaci CyaA mastnou kyselinou; oba geny pod kontrolou inducibilního <i>lac</i> promotoru, použit pro produkci celého adenylát cyklosového toxinu v <i>E.coli</i> .	191

pT7CACT233/BsrG I	Ampicilin	Odvozen od plasmidu pT7CACT1, do jehož genu <i>cyaA</i> bylo vloženo unikátní restriční místo rozeznávané endonukleasou BsrG I, použit pro inzerci DNA sekvencí jednotlivých antigenů.	191
pT7CACT336/BsrG I	Ampicilin	Odvozen od plasmidu pT7CACT1, do jehož genu <i>cyaA</i> bylo vloženo unikátní restriční místo rozeznávané endonukleasou BsrG I, použit pro inzerci DNA sekvencí jednotlivých antigenů.	191
pT7CACT/108OVA-E5	Ampicilin	Odvozen od plasmidu pT7CACT1, do jehož genu <i>cyaA</i> za 108. aminokyselinu byl vložen OVA epitop a 188. aminokyselinu dipeptid, čímž byla zrušena enzymatická aktivita CyaA, použit pro inzerci epitopu OVA do plasmidů pT7CACT233/BsrG I a pT7CACT336/BsrG I, nesoucí antigen TB10.4 z bakterie <i>M. tuberculosis</i> a jeho část od 18. do 30. aminokyselinového zbytku.	191
pT7CACT/233FLAG	Ampicilin	Odvozen od plasmidu pT7CACT1 a použit pro produkci adenylát cyklosového toxinu nesoucího za 233. aminokyselinovým zbytkem FLAG epitop	159
pET28b	Kanamycin	Obsažena sekvence pro histidinovou kotvu, použit pro vložení extracelulární domény CD11b a jejich fragmentů.	Novagen, USA
pET28b/BsrG I	Kanamycin	Derivát plasmidu pET28b, použit pro inzerci antigenu TB10.4 bakterie <i>M. Tuberculosis</i> .	M. Šimšová, MBÚ, AV ČR
pTZ19R	Ampicilin	Použit pro vložení celých genů podjednotek integrinu CD11b/CD18.	Pharmacia, Švýcarsko
pCDM1	Ampicilin	Obsahuje gen pro CD11b a gen pro supresor tRNA <i>supF</i> .	247
pCDB1	Ampicilin	Obsahuje gen pro CD 18 a gen pro supresor tRNA <i>supF</i> .	259
pAc5.1/V5-His/A	Ampicilin	Obsažena sekvence pro histidinovou kotvu, použit pro produkci integrinu CD11b/CD18 v S2 buňkách.	Invitrogen, USA
pMT/V5-His	Ampicilin	Obsažena sekvence pro histidinovou kotvu, použit pro produkci integrinu CD11b/CD18 v S2 buňkách.	Invitrogen, USA
pMT/BiP/V5-His	Ampicilin	Obsažena sekvence pro histidinovou kotvu a signální peptid specifický pro S2 buňky, použit pro produkci integrinu CD11b/CD18 v S2 buňkách.	Invitrogen, USA
pCoBlast	Ampicilin, Balsticidin	Použit pro přípravu konstruktů nesoucích gen pro CD18 a gen pro rezistenci k blastidinu.	Invitrogen, USA
pCoHygro	Ampicilin, Hygromycin	Použit pro přípravu konstruktů nesoucích gen pro CD11b a gen pro rezistenci k hygromycinu.	Invitrogen, USA
pSHH	Ampicilin	Obsaženy Ltx promotor, geny <i>ltxC</i> , <i>ltxA</i> a <i>ltxB</i> , část genu <i>ltxD</i> , použit pro produkci leukotoxinu v <i>E.coli</i>	E. T. Lally, University of Pennsylvania, Philadelphia,

			USA
pTZHly11	Ampicilin	Obsaženy geny <i>hlyA</i> , <i>hlyC</i> , použit pro produkci hemolysinu v <i>E.coli</i> .	V. Sheshko, MBÚ, AV ČR
pLG575	Chloramfenikol	Obsaženy geny <i>hlyB</i> a <i>hlyD</i> kódující transportní aparát pro HlyA, použit pro produkci hemolysinu v <i>E.coli</i> .	100

5.10 BAKTERIÁLNÍ KMENY

Kmen	Genotyp	Citace
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene, USA
<i>E. coli</i> BL21 (λDE3)	<i>F⁻ ompT gal[dcm] [lon] hsdS_B (r_B⁻m_B⁻; an <i>E. coli</i> B strain) s DE3 λ profágem nesoucím gen pro T7 RNA-polymerasu</i>	Novagen, USA
<i>E. coli</i> MC1061/P3	<i>F⁻ hsdR (r_K⁻, m_K⁺) araD139 Δ(araABC-leu)7679 galU galK ΔlacX74 rpsL thi mcrB (am) Tet^R (am)}</i>	Invitrogen, USA

5.11 POUŽITÉ TKÁŇOVÉ LINIE

Tkáňová linie	Popis	Citace
J774A.1	Myší makrofágová linie	ATCC Catalog No. TIB-67, USA
Jurkat	T-buněčná linie	ATCC
S2 buňky	Schneider 2 cells, odvozeny od primární kultury pozdního stádia embryí <i>Drosophila melanogaster</i> .	Invitrogen, USA
CHO-K1	Chinese Hamster Ovary cells	ATCC, Catalog No. CCL 61
CHO-CD11b/CD	CHO-K1 buňky, transfekované geny kódujícími lidský integrin CD11b/CD18.	D. Golenbock, Boston University School of Medicine, Boston, USA

Buňky Jurkat a J774A.1 byly pěstovány v RPMI médiu, S2 buňky v Schneider's *Drosophila* médiu a buňky CHO-K1 nebo CHO-CD11b/CD18 v médiu F-12.

5.12 METODY A PRACOVNÍ POSTUPY

5.12.1 UCHOVÁVÁNÍ BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ

Kmeny *E. coli* byly krátkodobě uchovávány na tuhém LB médiu s příslušným antibiotikem. Dlouhodobě byly uchovávány ve 40 % roztoku glycerolu při teplotě -80°C. Bakteriální kmeny vzniklé transformací plasmidové DNA do kompetentních buněk *E. coli* byly krátkodobě uchovávány na tuhém médiu s příslušným antibiotikem při 4°C.

5.12.2 PŘÍPRAVA SUPERKOMPETENTNÍCH BUNĚK *ESCHERICHIA COLI*

Kmen *E. coli* XL-1 Blue byl reizolován na tuhém LB médiu s tetracyklinem do izolovaných kolonií (37°C, 16-24 hodin). Poté byly 2 - 3 kolonie *E. coli* z tuhého LB média přeneseny do 50 ml SOB média a po kultivaci bakterií při teplotě 19°C a dosažení požadované optické denzity bakteriální kultury (OD₆₀₀ = 0,6) byla kultura prudce ochlazena v lázni voda - led a centrifugována (6000 g, 4°C,

10 minut). Sediment bakteriálních buněk *E. coli* byl resuspendován v 16 ml ledového TB pufru. Následovala inkubace buněčné suspenze v lázni voda - led (4°C, 10 minut) a opětovná centrifugace buněk (6000 g, 4°C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru. K buněčné suspenzi bylo přidáno DMSO do koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v lázni voda - led (4°C, 10 minut) byla buněčná suspenze rozplněna po 200 µl do mikrozkušavek a zamražena v tekutém dusíku. Takto připravené superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě - 80°C.

5.12.3 TRANSFORMACE PLASMIDOVÉ DNA DO SUPERKOMPETENTNÍCH BUNĚK

K 200 µl suspenze superkompetentních buněk byl přidán 1 µl plasmidové DNA získané minipreparativní izolací, obsah byl šetrně, ale důkladně zamíchán. V případě, že byla transformována DNA získaná ligací, bylo ke stejnému množství superkompetentních buněk přidáno 15 µl ligační směsi DNA. Směs byla inkubována (4°C, 30 minut) a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37°C a poté ochlazena v ledu. Po přidání 1 ml tekutého LB média byla kultura inkubována (37°C, 60 minut). Během této doby se plasmid uvnitř transformovaných buněk replikuje a zároveň dochází k produkci určitého množství produktu genu pro rezistenci k určitému antibiotiku. V závěru celého procesu bylo vyseto 50-200 µl suspenze na tuhé LB médium s příslušným antibiotikem. Buňky byly inkubovány (37°C, 12-16 hodin).

5.12.4 IZOLACE PLASMIDOVÉ DNA

5.12.4.1 Minipreparace plasmidové DNA

Jednou čerstvě narostlou bakteriální kolonií byly zaočkovány 2 ml LB média s příslušným antibiotikem a byly kultivovány za intenzivního třepání (37°C, 12-14 hodin). Bakteriální kultura byla centrifugována (12000 g, 20°C, 60 sekund) a sediment byl resuspendován ve 100 µl roztoku I, buňky byly lyzovány přídatkem 200 µl roztoku II, šetrně promíchány a inkubovány v ledu. K lyzovaným buňkám bylo přidáno 150 µl roztoku III a následně byla směs promíchána a inkubována (4°C, 15 minut). Centrifugací (12000 g, 4°C, 15 minut) byly odstraněny zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromosomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a plasmidová DNA byla sražena stejným objemem isopropanolu (4°C, 10 minut). Po centrifugaci (12000 g, 4°C, 15 minut) byl pelet sražené DNA promyt 500 µl 70 % ethanolu. Sediment byl vysušen na vzduchu 10 minut a následně rozpuštěn ve 40 µl TE pufru pH 8,0 s termostabilní pankreatickou RNasou (20 µg/ml). Směs byla inkubována (70°C, 30 minut) a plasmidová DNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě -20°C.

5.12.4.2 Midipreparace plasmidové DNA

Bakteriální kolonií po transformaci požadovanou plasmidovou DNA bylo zaočkováno 50 ml LB média s příslušným antibiotikem a kultivováno (37°C, 10 hodin). Centrifugací (6000 g, 4°C, 10 minut) byly odděleny bakteriální buňky a resuspendovány v 1 ml roztoku I. Suspenze buněk byla rozdělena do tří mikrozkupek na tři stejné objemové díly. Do každé mikrozkupek bylo přidáno 0,5 ml roztoku II a promícháno pomalou inverzí. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku III a obsah byl intenzivně promíchán. Centrifugací (12000 g, 20°C, 7 minut) byly odstraněny vysrážené proteiny, chromosomální DNA a ostatní buněčné struktury. Supernatant byl převeden do 10 ml zkupek a smíchán s 3,5 ml DNA vazebného pufru. Směs byla postupně nanesena na dvě minikolonky s křemičitými partikulami umístěné na vakuové odsávače a byla prosáta za mírného podtlaku. Minikolonky s navázanou plasmidovou DNA byly promyty 4×1 ml DNA promývacího pufru, přeneseny do nové mikrozkupek a centrifugací byly odstraněny zbytky promývacího pufru (12000 g, 20°C, 2 minuty). Plasmidová DNA byla eluována z náplně minikolonky přidáním 50 µl sterilní vody, která byla přehřátá na 50°C. Plasmidová DNA připravená tímto způsobem byla vysoce koncentrovaná a uchovávala se při -20°C. DNA vazebný pufr, promývací pufr a vazebné křemičité partikule jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro izolaci plasmidové DNA (Top Bio, Praha, ČR).

5.12.5 MANIPULACE S PLASMIDOVOU DNA

5.12.5.1 Štěpení plasmidové DNA restrikčními endonukleasami

Plasmidová DNA získaná minipreparativní izolací (5 µl) nebo plasmidová DNA získaná midipreparativní izolací (1 µl), v obou případech odpovídá toto množství 0,5 µg DNA, byla smíchána s 2 µl 10x koncentrovaného příslušného pufru a 2 µl 10x koncentrovaného BSA, vše podle optima dané endonukleasy. Objem byl doplněn na 20 µl deionizovanou vodou a dobře promíchán. K promíchané směsi byly přidány 1 až 2 U požadované restrikční endonukleasy a směs byla inkubována 2 hodiny ve vodní lázni o vhodné teplotě. V případě potřeby byly enzymy s doporučenou reakční teplotou 37°C inaktivovány zahřátím na 70°C po dobu 20 minut.

5.12.5.2 Defosforylace 5'-konců lineární plasmidové DNA

Do mikrozkupek obsahující 10 µl naštěpené plasmidové DNA byl přidán 1 µl 10x koncentrovaného NEB 2 pufru a objem byl doplněn deionizovanou vodou do 19 µl. Po promíchání byl přidán 1 µl alkalické fosfatasy (1 U), směs byla opětovně promíchána a inkubována při teplotě 37°C po dobu 60 minut. Alkalická fosfatasa byla inaktivována 20 minut při teplotě 70°C.

5.12.5.3 Zatupení kohesních konců fragmentů plasmidové DNA

K 20 µl směsi plasmidové DNA, která byla štěpena restrikčními endonukleasami byl přidán 1 µl 10x koncentrovaného NEB pufru (T4 DNA polymerasa je aktivní ve všech čtyřech standardních

NEB pufrech), 0,5 μ l 4 mmol/l dNTP, 7,5 μ l deionizované vody a 1 μ l T4 DNA polymerasy. Po promíchání byla směs inkubována 30 minut při 12°C. T4 DNA polymerasa byla inaktivována inkubací 10 minut při 75°C.

5.12.5.4 Ligace fragmentů DNA

Štěpený plasmid byl smíchán s vkládaným DNA fragmentem (oba většinou purifikovány z agarosového gelu) nebo syntetickým oligonukleotidem v molárním poměru 1:10, 3 μ l 10x koncentrovaného ligačního pufru (660 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5), 50 mmol/l MgCl₂, 100 mmol/l dithiotreitol, 10 mmol/l ATP) a deionizovanou vodou, která byla doplněna do 29 μ l. Po promíchání byl přidán 1 μ l T4 DNA-ligasy (5 U) a reakční směs se nechala inkubovat 2 hodiny při pokojové teplotě při ligaci kohesních konců DNA nebo 12 až 16 hodin při ligaci zatupených konců DNA.

5.12.5.5 Amplifikace fragmentů plasmidové DNA

Do tenkostěnné mikrozkušavky určené pro amplifikaci pomocí metody PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction) bylo k 1 μ l templátové DNA (200 ng/ μ l) přidáno 5 μ l 10x koncentrovaného kompletního pufru. Následně bylo přidáno 1,5 μ l 10 μ mol/l primeru I a 1,5 μ l 10 μ mol/l primeru II, které byly rozpuštěny v TE pufru. Dále bylo přidáno 5 μ l 2 mmol/l dNTP, 35,5 μ l deionizované vody a 0,5 μ l Phusion DNA polymerasy. Templátová DNA byla denaturována zahřátím na 94°C po dobu 2 minut, dále následoval nastavený cyklus, který se opakoval celkem 30-krát: 15 sekund při teplotě 94°C (denaturační fáze), 30 sekund při teplotě 60°C pro amplifikaci antigenu TB10.4 z *M. tuberculosis* nebo 58°C pro amplifikaci podjednotek CD18, CD11b a jejich fragmentů (nasednutí primerů) a 72°C po dobu 1 minuty (polymerační fáze). Po proběhnutí všech 30 cyklů byly zkumavky s reakční směsí ponechány 10 minut v PCR přístroji při teplotě 72°C a poté byl jejich obsah ochlazen na teplotu 4°C a podle potřeby buď okamžitě zpracován, či zamražen při teplotě -20°C.

5.12.5.6 Elektroforesa DNA fragmentů v agarosovém gelu

Koncentrace agarosového gelu byla zvolena podle velikosti dělených fragmentů, přičemž ve většině případů byl používán 0,6 % (w/v) a 1 % (w/v) agarosový gel obsahující ethidiumbromid o výsledné koncentraci 0,5 μ g/ml. Příprava suspenze: vařením až do úplného rozpuštění agarosy a ochlazením na teplotu 50°C. Poté byla takto připravená směs nalita do obdélníkové formy z plexiskla asi do výšky 0,5-1 cm. Výška hřebínku pro nanášení vzorků byla nastavena tak, aby dno jamky bylo ode dna formy vzdáleno asi 0,2-0,3 cm. Gel byl vložen do aparatury pro agarosovou elektroforesu a převrstven TBE pufrům do výšky asi 2 mm nad gel. Do jamek byl nanesen vzorek DNA a standard k určování velikostí DNA o známých velikostech fragmentů (λ DNA štěpená restriční endonukleasou Pst I). Zařízení bylo zakryto krytem z plexiskla a na elektrody bylo vloženo napětí o takové velikosti, aby vytvořený potenciálový gradient činil 5 V/cm. Elektroforesa probíhala většinou po dobu 2 hodin,

poté byla aparatura odpojena od zdroje napětí, odebrán kryt a vyjmut gel. Rozdělení jednotlivých DNA fragmentů bylo pozorováno při UV světle. U všech gelů byl pořízen elektroforeogram pomocí CCD kamery.

5.12.5.7 Izolace DNA fragmentů z agarosového gelu

Fragment DNA byl vyříznut z agarosového gelu a přenesen do mikrozkušavky, do které bylo přidáno 900 μ l DNA vazebného pufru. Takto připravený vzorek byl inkubován při 55°C 10 minut do úplného rozpuštění agarosy. Směs byla nanášena na minikolonku s křemičitými partikulami a vystavena mírnému podtlaku. Navázaná plasmidová DNA byla dvakrát promyta jedním mililitrem promývacího roztoku a přebytek tohoto roztoku byl odstraněn centrifugací (12000 g, 20°C, 2 minuty). Plasmidová DNA byla uvolněna z náplně minikolonky přidáním 40 μ l sterilní vody, která byla přehřívána na 50°C. Získané DNA fragmenty byly uchovávány při teplotě -20°C.

5.12.6 SEKVENACE PLASMIDOVÉ DNA

Plasmidová DNA určená k sekvenaci byla izolována pomocí kitu NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH, SRN) nebo pomocí kitu QIAprep (QIAGEN GmbH, SRN). Sekvence byla provedena Sangerovou metodou kombinovanou s technikou cyklického sekvenování. Bylo použito kitu pro cyklické sekvenování (ABI PRISM Big Dye terminator ready reaction cycle sequencing kit, Applied Biosystems, USA), neznačeného primeru komplementárního k sekvenované DNA a vyhodnocení pomocí DNA sekvenátoru ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, USA). *Tato část práce byla provedena v sekvenační laboratoři MBÚ AV ČR, Praha (Dr. J. Felsberg).*

5.12.7 PŘÍPRAVA MOČOVINOVÉHO EXTRAKTU PROTEINŮ PRO PURIFIKACI

5.12.7.1 Produkce proteinů v 500 ml třepané kultuře

Bakterie *E. coli* XL1-Blue nebo *E. coli* BL21(λ DE3) byly transformovány plasmidem určeným k produkci požadovaného proteinu a inkubovány na LB plotnách s příslušným antibiotikem. Druhý den byly do 50 ml tekutého MDO média obsahujícího příslušné antibiotikum přeneseny 2 - 3 bakteriální kolonie, které nesly plasmid s genem pro požadovaný protein, a bakterie *E. coli* byly kultivovány za stálého třepání 12 - 16 hodin při 37°C. Z noční kultury bylo odebráno 5 ml suspenze bakteriálních buněk a těmi bylo zaočkováno čerstvé 500 ml MDO médium s příslušným antibiotikem přehříváno na 37°C. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při teplotě 37°C do optické density $OD_{600} = 0,6$. Poté byla produkce proteinu indukována přidáním IPTG o výsledné koncentraci 1 mmol/l a kultura se nechala růst další 4 hodiny. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v lázni voda - led.

Pro analýzu vyprodukovaného množství proteinu v buňkách *E. coli* byl z narostlé bakteriální kultury odebrán vzorek (1 ml), který byl dále centrifugován (10000 g, 4°C, 1 minuta). Po odstranění

supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 μ l UT pufru. Následně bylo odebráno 20 μ l pro analýzu pomocí SDS-PAGE.

5.12.7.2 Izolace proteinů z bakteriální kultury

Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (6000 g, 4°C, 20 minut). Pelet buněk byl resuspendován v TC pufru (20 ml) a sonikován (3x 50 W, 18 kHz, 4°C, 30 vteřin s 30 vteřinovými přestávkami na chlazení). Celistvé buňky *E. coli* byly stočeny centrifugací (6000 g, 4°C, 5 minut). Supernatant byl převeden do nové zkumavky a centrifugován (13000 g, 4°C, 15 minut), čímž došlo ke stočení proteinu přítomného v inkluzních tělískách bakterií. Membrány buněk stočené spolu s inkluzními tělísky byly odstraněny odmyváním sedimentu v UT-A pufru a inkluze s proteinem byly poté resuspendovány v deionizované vodě. Následovala centrifugace (13000 g, 4°C, 10 minut) a po odstranění supernatantu bylo na sediment inkluzních tělísek nasypáno 4,8 g pevné močoviny a přidáno asi 6 ml TN-A pufru, tak aby výsledný objem směsi byl 10 ml. Směs byla inkubována při pokojové teplotě 60 minut s občasným promícháním, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 mol/l. Centrifugací směsi (13000 g, 4°C, 30 minut) byl dále získán močovinový extrakt toxinu.

Pro analýzu na SDS-PAGE byl z močovinového extraktu a odmytých membrán odebrán vzorek 20 μ l, ke kterému bylo přidáno 5 μ l 5x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE.

5.12.8 PŘÍPRAVA CYTOSOLICKÉHO EXTRAKTU LtxA

Bakterie *E. coli* XL1-Blue byly transformovány plasmidem pSHH a inkubovány na LB plotnách s ampicilinem (150 μ g/ml). Druhý den byly jednou vekou kolonií zaočkovány 2 ml LB média s ampicilinem a buňky byly inkubovány přes noc ve 37°C. Z noční kultury byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze a tím bylo zaočkováno čerstvé 50 ml LB médium s ampicilinem. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při 37°C do optické density $OD_{600} = 0,6$. Poté byla bakteriální kultura centrifugována (6000 g, 4°C, 20 minut). Pelet byl resuspendován v 5 ml PBS a sonikován (1x 50 W, 18 kHz, 4°C, 40 vteřin). Suspenze byla centrifugována (13000 g, 4°C, 15 minut) a supernatant obsahující aktivní leukotoxin byl použit ke stanovení cytotoxické aktivity LtxA.

5.12.9 PRODUKCE α -HEMOLYSINU

Bakterie *E. coli* XL1-Blue byly transformovány plasmidem pLG575 a poté plasmidem pTZHly11, byly inkubovány na LB plotnách s ampicilinem (150 μ g/ml) a chloramfenikolem (100 μ g/ml). Druhý den byly jednou vekou kolonií zaočkovány 2 ml LB média s ampicilinem a buňky byly inkubovány přes noc ve 37°C. Z noční kultury byl odebrán 1 ml bakteriální suspenze a tím bylo zaočkováno čerstvé 50 ml LB médium s ampicilinem a chloramfenikolem. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při 37°C do optické density $OD_{600} = 0,4$. Poté byla produkce

HlyA indukována přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mmol/l a kultura se nechala růst další 4 hodiny. Po uplynutí této doby byla bakteriální kultura centrifugována (6000 g, 4°C, 20 minut) a supernatant obsahující aktivní hemolysin byl použit ke stanovení cytotoxické aktivity HlyA.

5.12.10 PURIFIKACE CyaA

5.12.10.1 Purifikace toxinu iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose

Chromatografická kolona byla důkladně promyta deionizovanou vodou a byla naplněna 10 ml gelu DEAE-Sepharosy a opět byla propláchnuta deionizovanou vodou, čímž došlo k odstranění ethanolu, ve kterém je DEAE-Sepharosa uchovávána. Kolona byla ekvilibrována UTN-A pufrem do doby, než pH pufru, který vytékal z kolony, bylo stejné jako pH nanášeného pufru (asi 100 ml UTN-A pufru). Purifikace toxinu iontoměničovou chromatografií probíhá při pH 8 vzhledem k tomu, že pI CyaA je 4,17.

Byl změřen objem močovinového extraktu toxinu a bylo přidáno takové množství NaCl, aby konečná koncentrace NaCl v močovinovém extraktu dosahovala 50 mmol/l. Takto upravený vzorek byl nanesen na předem připravenou kolonu s DEAE-Sepharosou, kde došlo k zachycení CyaA. Většina ostatních zachycených proteinů na koloně s DEAE-Sepharosou mimo toxinu byla následně odstraněna promýváním kolony UTN-A pufrem (25 ml). Navázaný toxin byl z kolony poté eluován 16 ml UTN-B pufru v postupně odebíraných 2 ml frakcích.

Přítomnost a čistota CyaA v jednotlivých eluovaných frakcích z DEAE-Sepharosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE. Z každé frakce byl odebrán vzorek 20 µl, ke kterému bylo přidáno 5 µl 5x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Po zahřátí (100 °C, 5 minut) byl vzorek připraven k nanesení na SDS-PAGE pomocí které bylo množství toxinu ve frakcích analyzováno.

Frakce obsahující CyaA byly poté spojeny a vzorek byl připraven k purifikaci toxinu hydrofóbní chromatografií na Phenyl-Sepharose.

5.12.10.2 Purifikace toxinu hydrofóbní chromatografií na Phenyl-Sepharose

Chromatografická kolona byla důkladně promyta deionizovanou vodou a byla naplněna 2 ml Phenyl-Sepharosy a poté opět propláchnuta deionizovanou vodou. Kolona byla následně ekvilibrována TN-B pufrem (20 ml).

Vzorek obsahující toxin, jenž byl purifikován na DEAE-Sepharose, byl ředěn 4x pomocí TN-B pufru a byl nanesen na předem připravenou kolonu s Phenyl-Sepharosou. Kolona s navázaným toxinem byla poté střídavě promyta 20 ml 60 % isopropanolu v 50 mmol/l Tris pH 8,0 a 20 ml 50 mmol/l Tris pH 8,0. Právě promytí kolony 60 % isopropanolem je klíčové pro odstranění bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) z purifikovaného toxinu. Promytí kolony s navázaným toxinem na Phenyl-Sepharose bylo opakováno celkem 3x a navázaný toxin byl z kolony poté eluován 10 ml UTE-B pufru v postupně odebíraných 1 ml frakcích.

Přítomnost a čistota CyaA v jednotlivých eluovaných frakcích z Phenyl-Sepharosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE stejným postupem, jako při purifikaci toxinu iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose. Frakce obsahující CyaA byly spojeny a vzorek purifikovaného toxinu byl ředěn 4x pomocí TN-B pufru. Celý postup purifikace toxinu hydrofóbní chromatografií na Phenyl-Sepharose byl opakován, čímž došlo k dalšímu snížení množství LPS v purifikovaném toxinu. Jednotlivé eluované frakce z Phenyl-Sepharosy byly poté analyzovány stejným způsobem pomocí SDS-PAGE a následně byly spojeny frakce obsahující CyaA.

5.12.11 PURIFIKACE ANTIGENU TB10.4 A FRAGMENTŮ PODJEDNOTKY CD11b AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ NA NI-NTA AGAROSE

Močovinný extrakt byl nanesen na 7 ml Ni-NTA agarosy ekvilibrované 8-násobkem objemu náplně kolony UTN pufrém. Nenavázané proteiny byly odmyty 8-násobným množstvím objemu náplně kolony přídatkem stejného pufru. Zachycený protein byl eluován po 1 ml frakcích 250 mmol/l imidazolem v UTN pufru. Množství a čistota proteinu v průběhu všech purifikačních kroků byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE a koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena metodou podle Bradfordové.

5.12.12 PURIFIKACE EXTRACELULÁRNÍ DOMÉNY PODJEDNOTKY CD11b AFINITNÍ CHROMATOGRAFIÍ NA NI-NTA AGAROSE

Membránová frakce byla nanesen na 7 ml Ni-NTA agarosy ekvilibrované 8-násobkem objemu náplně kolony TUMC pufrém. Nenavázané proteiny byly odmyty 8-násobným množstvím objemu náplně kolony přídatkem stejného pufru. Zachycený protein byl eluován po 1 ml frakcích 250 mmol/l imidazolem v TUMC pufru. Množství a čistota proteinu v průběhu všech purifikačních kroků byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE a koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích byla stanovena metodou podle Bradfordové.

5.12.13 STANOVENÍ LIPOPOLYSACHARIDU

Do mikrotitrační destičky (Nunc, Dánsko) předehřáté na 37°C bylo vneseno 50 µl vzorku naředěného tak, aby výsledné hodnoty LPS spadaly do lineární oblasti kalibrační křivky (dle instrukcí výrobce). Veškerá ředění byla prováděna v apyrogenní vodě. V čase $t = 0$ minut bylo přidáno ke vzorku v jamce 50 µl lyzátu z ostrorepa (dodávaného v soupravě pro stanovení) a v 10-ti sekundových intervalech nastartovány reakce v případných dalších jamkách přídatkem stejného objemu lyzátu. Doba jedné reakce trvá 10 minut. Po uplynutí této doby bylo do první jamky přidáno 100 µl chromogenního substrátu (dodávaného v soupravě pro stanovení) a v 10-ti sekundových intervalech byl substrát přidáván i do jamek ostatních. V čase $t = 16$ minut od začátku experimentu byla reakce zastavena přídatkem 100 µl roztoku 25 % kyseliny octové a to opět v 10-ti sekundových intervalech

do každé jamky dle původního pořadí. Množství LPS v jednotlivých vzorcích bylo po spektrofotometrické analýze odečteno z přiložené kalibrační křivky.

5.12.14 ELEKTROFORESA V POLYAKRYLAMIDOVÉM GELU (SDS-PAGE)

K 20 μ l vzorku proteinu bylo přidáno 5 μ l vzorkového pufru určeného pro elektroforesu v SDS-polyakrylamidovém gelu. Po zahřátí na 100°C po dobu 5 minut byly takto připravené vzorky nanášeny na gel, sestávající ze zaostřovacího 5 % gelu a ze 7,5 %, resp. 15 % rozdělovacího gelu. Po proběhnutí elektroforesy (8 V/cm² pro zaostřovací gel a 15 V/cm² pro rozdělovací gel) v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3) byly rozdělené proteiny v gelu barveny barvicím roztokem po dobu 2 hodin. Poté byly tyto gely odbarveny odbarvovacím roztokem a přeneseny do uchovávacího roztoku, případně vysušeny. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností.

5.12.15 WESTERN BLOT

Po skončení elektroforetického rozdělení vzorků byl z polyakrylamidového gelu odstraněn zaostřovací gel. K přenosu proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulosovou membránu pomocí elektrického pole byla použita polosuchá metoda. Přenos proteinů probíhal při konstantní hustotě proudu 0,8 mA/cm² nitrocelulosové membrány po dobu 1 hodiny. Po skončení přenosu proteinů byla nitrocelulosová membrána inkubována s 5 % nízkotučným mlékem rozpuštěným v PBS přes noc ve 4°C, čímž došlo k vysycení nespecifických vazebných míst, do kterých by se následně mohla nespecificky vázat protilátka.

Pro detekci proteinů ve fúzi s histidinovou kotvou následovala inkubace s anti-6xHis protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou, která byla před použitím 3000 x naředěna v roztoku 1 % mléka v PBST. Inkubace probíhala 1 hodinu při 37°C. Po specifické vazbě protilátky byla membrána promyta 4x 10 minut roztokem PBST.

Pro detekci integrinu CD11b/CD18 byla membrána inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě s anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (ředění 1:1000). Po vazbě primární protilátky byla membrána promyta v PBST pufru (4x 5 minut, RT, mírné třepání), čímž došlo k odmytí nespecificky vázané primární protilátky. Specificky vázaná primární protilátka byla detekována pomocí anti-myší Ig sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou. Inkubace membrány probíhala s 3000x ředěnou sekundární protilátkou v PBST pufru s 5 % (w/v) nízkotučným mlékem (RT, 60 minut, mírné třepání). Po specifické vazbě sekundární protilátky byla membrána promyta 4x 10 minut roztokem PBST.

Vizualizace byla provedena chemiluminiscenční metodou.

5.12.16 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINŮ

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové²⁸⁴. Nejdříve byla v rozmezí 10-100 µg/ml připravena série ředění BSA, který byl použit jako kalibrační standard. K ředění byl použit stejný pufr jako k přípravě měřeného vzorku. Poté bylo ke 100 µl jednotlivých ředěných standardů, 100 µl vzorku a 100 µl samotného pufru (referenční standard) přidáno 900 µl činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Absorbance série standardů a měřeného vzorku byla měřena proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm. Nakonec byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku odečtením z proměřené kalibrační křivky.

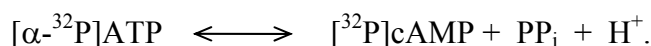
5.12.17 STANOVENÍ VLASTNOSTÍ ADENYLÁT CYKLASOVÉHO TOXINU

5.12.17.1 Ředění močovinového extraktu

K 10 µl močovinového extraktu bylo přidáno 90 µl 8 mmol/l roztok močoviny v TCT pufru. K 5 µl takto naředěného extraktu bylo přidáno 495 µl TCT, čímž došlo ke zředění močoviny a renaturaci CyaA. Ředění vzorku 1:1000 (v/v) bylo prováděno v pufru o teplotě 4°C bezprostředně před stanovením adenylát cykласové aktivity.

5.12.17.2 Stanovení adenylát cykласové aktivity

Adenylát cykласový toxin bakterie *B. pertussis* obsahuje enzymaticky aktivní doménu, jenž po vstupu do cílových buněk katalysuje přeměnu molekuly ATP na molekuly cAMP. Adenylát cykласová aktivita byla stanovena na základě reakce, kterou enzym katalysuje:



Při stanovení bylo použito radioaktivně značeného substrátu $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, který je v průběhu reakce přeměňován na radioaktivní $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$. Ten byl po proběhnutí reakce oddělen z reakční směsi pomocí adsorpční chromatografie na oxidu hlinitém při pH 7,6, přičemž se cAMP na rozdíl od negativně nabitých látek (ATP, ADP, AMP a PP_i) nedsorbuje na kolonu, ale volně prochází. Po změření radioaktivity eluentu bylo vypočítáno množství vzniklého cAMP ^{166,285,286}.

Vzorek s ředěným renaturovaným CyaA byl zamíchán, od hladiny bylo co možná nejpřesněji odebráno 5 µl a přidáno k 50 µl reakční směsi v mikrozkuhavce. Obsah byl zamíchán vortexem a umístěn do lázně o teplotě 30°C. Ve stejných časových rozestupech (20-30 s) byly postupně spuštěny reakce v ostatních vzorcích. Zároveň byl připraven slepý pokus, který obsahoval pouze reakční směs bez CyaA a také pozitivní kontrolní vzorek, který obsahoval w.t. CyaA. Reakce probíhala 5 minut při teplotě 30°C, byla zastavena přidáním 200 µl 0,5 mol/l HCl a vzorky byly vloženy na 5 minut do termostatovaného suchého bloku s teplotou 100°C. Zde proběhla kyselá hydrolysa kontaminant, které

by mohly interferovat při následné adsorbční chromatografii, přičemž cAMP zůstává stabilní. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7,6 pomocí 0,2 ml 1,5 mol/l imidazolu. Směs byla nanášena na chromatografickou kolonu (Poly-Prep, Bio-Rad, USA) naplněnou neutrálním oxidem hlinitým a cAMP byl eluován roztokem 10 mmol/l imidazolu pH 7,6. K eluátu bylo přidáno 10 ml scintilačního roztoku a obsah byl důkladně protřepán. V takto připravených vzorcích byla po dobu 1 minuty měřena radioaktivita pro [³²P] i [³H] (vnitřní standard). Také byla změřena radioaktivita v původní reakční směsi.

Naměřené hodnoty pro jednotlivé vzorky byly upraveny vzhledem k ztrátám na koloně, pomocí hodnot radioaktivity vnitřního standardu ([³H]cAMP). Dále byly od každé hodnoty odečteny hodnoty pro slepý pokus a ze známého množství [³²P]ATP a jeho hodnoty radioaktivity a ze změřené radioaktivity [³²P]cAMP bylo vypočítáno množství vzniklého cAMP. Tato hodnota byla poté přepočítána jako procento aktivity původního CyaA. Při výpočtu se postupovalo podle vztahu:

$$A = \frac{n \times (A_{PV} - A_{PB}) \times d \times A_{HR}}{A_{PR} \times V_{ME} \times t \times A_{HV}}$$

A. adenylát cyklosová aktivita vzorku [μmol/min/ml extraktu]

A_{PV}.radioaktivita ³²P ve vzorku [DPM]

A_{PB}.radioaktivita ³²P v slepém vzorku [DPM]

A_{PR}.radioaktivita ³²P v 50 μl reakční směsi [DPM]

A_{HV}.radioaktivita [2,8-³H]cAMP ve vzorku [DPM]

A_{HR}.radioaktivita [2,8-³H]cAMP v 50 μl reakční směsi [DPM]

n. látkové množství ATP v 50 μl reakční směsi [μmol]

d. ředění močovinnového extraktu

V_{ME}. objem přidaného ředěného močovinnového extraktu k 50 μl reakční směsi [ml]

t. reakční čas [min]

Tento pokus provedl RNDr. J. Mašín, Ph.D. (MBÚ, AV ČR, Praha)

5.12.17.3 Příprava suspenze erytrocytů

Ke 3 ml beraní krve bylo přidáno 30 ml TN pufru, vychlazeného na 4°C a vzniklá směs byla odstředěna (4000 RPM, 4°C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byly krvinky resuspendovány ve 30 ml TN pufru a znovu odstředěny (4000 RPM, 4°C, 10 minut). Tento proces byl ještě dvakrát opakován. Poté byly krvinky resuspendovány ve 30 ml TN pufru. Bylo stanoveno množství krvinek a to tak, že 100 μl suspenze krvinek bylo lysováno 900 μl TCT pufru a množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 541 nm (z čehož bylo vypočítáno množství krvinek v suspenzi). Suspenze krvinek, byla naředěna TN pufrům tak, aby výsledná absorbance nově odebraného alikvotu po přidavku TCT pufru byla 3,0, což odpovídá asi 5.10⁸ erytrocytů v 1 ml suspenze. Nakonec byl k takto připravené suspenzi erytrocytů přidán roztok CaCl₂, aby výsledná koncentrace vápenatých iontů byla 2 mmol/l.

5.12.17.4 Odstranění N-glykosidicky vázaných oligosacharidových řetězců

5×10^8 erytrocytů bylo inkubováno 1 hodinu ve 37°C buď v samotném pufru TN nebo v pufru TN, který obsahoval 500 mU/ml Endo H, PNGasy F a 40 mU/ml neuraminidasy. Následně byly buňky 3x promyty pufrům TN a použity v dalších pokusech.

5.12.17.5 Stanovení invazivní aktivity CyaA

Do zkumavky bylo odebráno 0,5 ml suspenze erytrocytů, zkumavka byla vložena do ledu a ke krvinkám bylo přidáno 5 μl močovinového extraktu CyaA. Obsah byl promíchán a uchovávan v ledu. Poté byly vzorky inkubovány 30 minut při teplotě 37°C . Po inkubaci, při které CyaA interaguje s membránou a adenylát cyklasová doména je translokována přes cytoplasmatickou membránu erytrocytů, byly vzorky opět umístěny do ledu a ke každému byl přidán 1 ml TNE pufru a erytrocyty byly odstředěny (13000 RPM, 4°C , 1 minuta). Supernatant byl odstraněn a sediment erytrocytů byl resuspendován v 1 ml TNE pufru. Vzorky byly odstředěny (13000 RPM, 4°C , 1 minuta) a po odstranění supernatantu byly erytrocyty resuspendovány v 0,5 ml TNE pufru. Všechny vzorky takto promytých krvinek byly umístěny do ledu a ke každému bylo přidáno 10 μl roztoku trypsinu o koncentraci 2 mg/ml. Obsah byl dobře promíchán a inkubován 10 minut při teplotě 37°C . Došlo k rozštěpení těch částí molekul CyaA, které nebyly zabudovány do membrány erytrocytů. Po inkubaci bylo ke každému vzorku přidáno 10 μl inhibitoru trypsinu o koncentraci 4 mg/ml a 1 ml TNE pufru. Po promíchání byla směs centrifugována (13000 RPM, 4°C , 1 minuta). Supernatant byl odstraněn a k sedimentu bylo ve stejných časových intervalech přidáno 50 μl reakční směsi pro stanovení adenylát cyklasové aktivity. Naměřené hodnoty odpovídaly míře translokace adenylát cyklasové domény do erytrocytů (invazivní aktivita) a byly procentuelně vztaženy k míře invazivní aktivity w.t. CyaA.

Tento pokus provedl RNDr. J. Mašín, Ph.D. (MBÚ, AV ČR, Praha)

5.12.17.6 Stanovení hemolytické aktivity CyaA

Do mikrozkušavky bylo odebráno 0,5 ml suspenze erytrocytů k ní bylo přidáno 5 μl močovinového extraktu CyaA. Množství přidávaného CyaA bylo určeno stanovením adenylát cyklasové aktivity nebo odhadnutím množství CyaA z SDS-PAGE v případě enzymaticky neaktivních toxinů. Směs byla promíchána a inkubována 5-10 hodin při teplotě 37°C . Jako slepý pokus byl použit vzorek, který neobsahoval CyaA. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (13000 RPM, 25°C , 1 minuta). Supernatant obsahující uvolněný hemoglobin byl odebrán do spektrofotometrické kyvety. Absorbance při 541 nm byla stanovena proti slepému pokusu. Získané hodnoty absorbance byly přepočteny na koncentraci přidávaného toxinu a procentuelně vztaženy k míře hemolytické aktivity w.t. CyaA.

5.12.18 STANOVENÍ HEMOLYTICKÉ AKTIVITY HlyA

Do mikrozkušavky bylo odebráno 0,5 ml suspenze intaktních nebo deglykosylovaných erytrocytů k nim bylo přidáno 10 μ l media, ve kterém byla kultivována bakteriální kultura produkující HlyA nebo bakteriální kultura nesoucí pouze prázdný vektor. Po různě dlouhé inkubaci ve 37°C byly vzorky centrifugovány (13000 RPM, 25°C, 1 minuta). Supernatant obsahující uvolněný hemoglobin byl odebrán do spektrofotometrické kyvety. Absorbance při 541 nm byla stanovena proti slepému pokusu. Získané hodnoty absorbance byly procentuálně vztaženy k míře hemolytické aktivity HlyA na intaktních erytrocytech.

5.12.19 IZOLACE LIDSKÝCH NEUTROFILŮ

Ke 20 ml čerstvé lidské krve bylo přidáno 30 ml 1 % roztoku dextransu T-500 a směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Plasma (vrchní vrstva) byla přenesena do nové centrifugační zkumavky a centrifugována 250 g 10 minut při 4°C. Pelet byl resuspendován v 30 ml PBS a touto suspenzí bylo převrstveno 10 ml roztoku Ficoll-Paque. Směs byla centrifugována 40 minut při 20°C bez brždění. Pelet byl resuspendován v 20 ml ledově vychlezeného roztoku 0,2 % NaCl a inkubován 30 s na ledu po této době bylo přidáno 20 ml ledově vychlazeného roztoku 1,6 % NaCl. Buňky byly centrifugovány (250 g, 6 minut, 4°C) a supernatant byl odstraněn. Tento postup byl ještě jednou zopakován a poté byly neutrofilů resuspendovány v PBS (4°C) a použity k dalším pokusům.

5.12.20 PRÁCE S TKÁŇOVÝMI LINIEMI

5.12.20.1 Uchovávání tkáňových linií

Myší makrofágová linie J774A.1, T-buněčná linie Jurkat, buňky CHO-K1 a CHO-CD11b/CD18 byly krátkodobě uchovávány v konzervách s kryoprotektivním roztokem (FCS 450 μ l/ml, 450 μ l/ml růstového média a 100 μ l/ml DMSO) při teplotě -80°C. Tyto konzervy byly dlouhodobě skladovány při teplotě -150°C. Pro buněčnou linii S2 byl použit jiný kryoprotektivní roztok - 450 μ l/ml čerstvého růstového média, 450 μ l/ml použitého růstového média a 100 μ l/ml DMSO.

5.12.20.2 Rozmražení buněk

Konzerva buněk s kryoprotektivním roztokem byla rychle rozmrazena ve vodní lázni o teplotě 56°C a buňky byly převedeny do růstového média. Aby došlo k odstranění kryoprotektivního roztoku, byla suspenze buněk následně centrifugována (120 g, 37°C, 3 minuty) a po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v 10 ml, resp. 5 ml (buňky S2 a Jurkat) růstového média. Buňky byly dále vysety na Petriho misku, resp. do lahve T-25 pro tkáňové kultury (buňky Jurkat) a kultivovány v CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % hladina CO₂). Buňky S2 byly vysety do lahve T-25 pro

tkáňové kultury a inkubovány v inkubátoru bez CO₂ při 25°C. Maximální doba, po kterou byly buňky od svého rozmrazení kultivovány, činila tři týdny.

5.12.20.3 Pasážování tkáňové linie

Tkáňová linie J774A.1 je linií adherentní a její pasážování probíhalo zhruba při 80-90 % konfluenci buněk (asi 8-9 miliónů buněk J774.A1 na Petriho misku o průměru 9 cm). Adherentní buňky byly během pasážování staženy buněčnou škrabkou do média RPMI a následně centrifugovány (120 g, 37°C, 3 minuty). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v 10 ml čerstvého média RPMI. Buňky byly dále vysety na Petriho misky asi v 30 % konfluenci buněk a umístěny do CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % hladina CO₂), kde byly dále kultivovány. Médium RPMI bylo kultivovaným buňkám vyměňováno každý druhý den.

Tkáňové linie CHO-K1 a CHO-CD11b/CD18 jsou adherentní linie a jejich pasážování probíhalo zhruba při 80-90 % konfluenci buněk (asi 5-6 miliónů buněk na Petriho misku o průměru 9 cm). Adherentní buňky byly během pasážování uvolněny 5 mmol/l roztokem EDTA (Přípravna médií, ÚMG AV ČR, Praha) a následně centrifugovány (120 g, 37°C, 3 minuty). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v 10 ml čerstvého média F-12. Buňky byly dále vysety na Petriho misky asi v 30 % konfluenci buněk a umístěny do CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % hladina CO₂), kde byly dále kultivovány. Médium F-12 bylo kultivovaným buňkám vyměňováno každý druhý den.

Tkáňové linie Jurkat a S2 jsou suspenzními liniemi a jejich pasážování probíhalo při dosažení hustoty buněk 5x10⁶/ml. Buňky byly centrifugovány (120 g, 37°C, 3 minuty) a po odstranění média resuspendovány v 5 ml čerstvého růstového média. Buňky byly vysety do lahví T-25 pro tkáňové kultury v hustotě 5x10⁵/ml.

5.12.20.4 Stanovení počtu buněk v suspenzi pomocí Bürkerovy komůrky

Suspenze buněk byla nanesena do Bürkerovy komůrky. Bylo počítáno množství buněk v 32 polích (2 x 16) a byl stanoven průměrný počet buněk v jednom poli o objemu 4 pl.

Celkový počet buněk n v 1 ml buněčné suspenze byl poté stanoven podle vzorce:

$$n = 2,5 \times 10^5 \times \text{průměrný počet buněk v jednom poli.}$$

5.12.21 IMUNOPRECIPITACE

Buňky CHO-CD11b/CD18 byly inkubovány s glykosidasami, tunikamycinem nebo pouze s růstovým médiem při 37°C 13 hodin. 20x10⁶ buněk bylo promyto 2x pufrem HBSS a lyzováno při stálém míchání 1 ml lyzačního roztoku 30 minut při 4°C. Buněčný lyzát byl centrifugován (13000 RPM, 15 minut, 4°C) a supernatant byl přenesen do nové vychlazené mikrokumavky. K supernatantu bylo přidáno 20 µl anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 kovalentně navázané na agarosové kuličky (L. Bumba, MBÚ AV ČR, Praha), vzorky byly poté za stálého míchání

inkubovány 3 hodiny při 4°C. Agarosové kuličky byly 5x promyty lyzačním pufrům, smíchány s elučním pufrům TS a centrifugovány 13000 RPM, 5 s. Supernatant obsahující integrin CD11b/CD18 byl analyzován pomocí SDS-PAGE a Western blotu.

5.12.22 ODSTRANĚNÍ N-GLYKOSIDICKY VÁZANÉHO OLIGOSACHARIDOVÉHO ŘETĚZCE

1x10⁶ buněk CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidských neutrofilů bylo inkubováno 30 minut při 4°C s inhibitory proteas a chlorpromazinem - inhibitorem na klatrinu závislé endocytosy v pufru HBSS. Po této době byly buňky promyty pufrům HBSS a inkubovány další 1 hodinu ve 37°C buď v samotném pufru HBSS nebo v pufru HBSS, který obsahoval 500 mU/ml Endo H, PNGasy F a 40 mU/ml neuraminidasy. Následně byly buňky 3x promyty pufrům HBSS a použity v dalších pokusech.

5.12.23 INHIBICE TVORBY N-GLYKOSIDICKY VÁZANÉHO OLIGOSACHARIDOVÉHO ŘETĚZCE

Buňky CHO-CD11b/CD18 nebo J774A.1 byly inkubovány 24 hodin v růstovém médiu s 10 µg/ml tunikamycinu, poté byly 3x promyty pufrům HBSS a použity v dalších pokusech.

5.12.24 INHIBICE VÁZBY CyaA/233FLAG K BUŇKÁM VOLNÝMI SACHARIDY

0,5 µg/ml CyaA/233FLAG bylo inkubováno 15 minut při 4°C s roztokem 10 mmol/l L-fukosy, D-arabiny, N-acetylgalaktosaminu, N-acetylmannosaminu, D-mannosou, sialovou kyselinou, galakturonovou kyselinou, D-fruktosou, D-xylosou, N-acetylaktosaminem, N,N'-acetylchitobiosou, N,N',N'-acetylchitotriosou v pufru HBSS nebo samotným pufrům HBSS. Po této době byla směs použita pro vazebný experiment.

5.12.25 VÁZBA CyaA/233FLAG K BUŇKÁM

1x10⁶ buněk CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidských neutrofilů bylo inkubováno s 0,5 µg/ml CyaA/233FLAG v 500 µl HBSS (30 minut, 4°C), poté byly 3x promyty pufrům HBSS a navázaný CyaA/233FLAG byl detekován 1000x naředěnou anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 v PBS/BSA (30 minut, 4°C). Buňky byly 3x promyty HBSS a inkubovány dalších 30 minut při 4°C s 1000x ředěnou anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 v PBS/BSA. Buňky byly 3x promyty, resuspendovány v 150 µl HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji LSR II v přítomnosti 5 µg/ml propidium iodidu (značení mrtvých buněk).

Při vyhodnocování byly brány v potaz pouze živé buňky. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento vazby CyaA k intaktním buňkám, které bylo získáno podle vzorce:

$$\text{Vazba CyaA (\%)} = \frac{\text{MFI}_T - \text{MFI}_N}{\text{MFI}_P - \text{MFI}_N}$$

MFI_N. průměr hodnot intenzity fluorescence (**m**ean **f**luorescence **i**ntensity) intaktních buněk, které nebyly inkubovány s CyaA

MFI_P. průměr hodnot intenzity fluorescence intaktních buněk, které byly inkubovány s CyaA

MFI_T. průměr hodnot intenzity fluorescence buněk, které byly inkubovány s glykosidasami, tunikamycinem nebo sacharidy a poté s CyaA

5.12.26 DETEKCE INTEGRINU CD11b/CD18 NA BUNĚČNÉM POVRCHU

1x10⁶ buněk bylo inkubováno s anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 nebo s anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (ředění 1:1000 v PBS/BSA, 30 minut, 4°C), po promytí byla primární protilátka značena anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Buňky byly 3x promyty, resuspendovány v 150 µl HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji LSR II v přítomnosti 5 µg/ml propidium iodidu (značení mrtvých buněk).

5.12.27 STANOVENÍ INTRACELULÁRNÍHO cAMP

1x10⁵ buněk CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidských neutrofilů bylo přeneseno do mikrozkušavky a inkubováno 20 minut se 100 µmol/l roztokem IBMX (3-isobutyl-1-methylxantin, inhibitor fosfodiesteras) v pufru HBSS.

CyaA/233FLAG byl nejprve naředěn na 100x vyšší koncentraci než byla požadovaná konečná koncentrace roztokem TCU, poté byly ještě 25x ředěn puftrem HBSS. 50 µl takto naředěného toxinu bylo ihned přidáno k buňkám.

Buňky byly inkubovány 30 minut při 37°C s různými koncentracemi CyaA/233FLAG, reakce byla zastavena přidáním roztoku 0,1 % Tweenu 20 ve 100 µmol/l HCl a vzorky byly zahřáty na 100°C 15 minut. Poté byly vzorky neutralizovány 150 µmol/l imidazolem a koncentrace cAMP byla stanovena metodou kompetitivní ELISA²⁸⁷.

Na ELISA mikrotitrační destičku (Nucn-Immuno, Maxisorp, Dánsko) byl navázán konjugát cAMP-BSA (D. Ladant, Pasteurův institut, Francie) naředěný na koncentraci 5 µg/ml v roztoku 0,1 mol/l Na₂CO₃ pH 9,5. Poté byla destička 2x promyta TBST, inkubována 3 hodiny při 37°C s TBST/BSA a následně 3x promyta TBST. Ke konjugátu cAMP-BSA bylo přidáno 100 µl vzorků nebo cAMP standardu a 100 µl 3000x ředěné anti-cAMP králičí protilátky (A. Ullmann, Pasteurův institut, Francie) v TBST/BSA. Destička byla inkubována 13-14 hodin při 4°C, promyta 4x TBST a následně inkubována 2 hodiny při 37°C s anti-králičí Ig protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1:1000). Poté byla destička 4x promyta TBST a při 492 nm byla stanovena peroxidasová aktivita pomocí substrátu o-fenylendiaminu.

Tento pokus provedl RNDr. J. Mašín, Ph.D. (MBÚ, AV ČR, Praha).

5.12.28 STANOVENÍ CYTOTOXICKÉ AKTIVITY LtxA A HlyA

Buňky Jurkat byly inkubovány s glykosidasami nebo pouze s růstovým médiem 12-14 hodin při 37°C. 1x10⁵ buněk bylo inkubováno s konreolním bakteriálním lysátem nebo s bakteriálním

lysátem, který obsahoval LtxA, resp. s médiem, ve kterém byla kultivována bakteriální kultura produkující HlyA nebo bakteriální kultura nesoucí pouze prázdný vektor. Po různě dlouhé inkubaci byly buňky přeneseny na led a smíchány se 100 μ l 0,4 % roztoku barvy Trypanová modř. Živé buňky, které byly schopny vylučovat barvu, byly spočítány v Bürkerově komůrce. Tato metoda je založena na skutečnosti, že negativně nabitá barva Trypanová modř neinteraguje s buňkami, pokud není poškozena buněčná membrána.

Výsledek byl vyjádřen jako procento živých buněk:

$$\text{Živé buňky (\%)} = 100 \times \frac{\text{počet živých buněk po inkubaci s LtxA nebo HlyA}}{\text{počet živých buněk v negativní kontrole}}$$

5.12.29 PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18 V S2 BUŇKÁCH

5.12.29.1 Příprava transfekční směsi

2 μ l Lipofektaminu 2000 bylo smícháno s 50 μ l bezsérového média Opti-MEM I a inkubováno 5 minut při pokojové teplotě. Mezitím bylo smícháno 0,8 μ g DNA s 50 μ l média Opti-MEM I. Naředěná DNA byla smíchána s naředěným Lipofektaminem 2000 a inkubována 20 minut při pokojové teplotě.

5.12.29.2 Transfekce S2 buněk

3×10^5 S2 buněk bylo vyneseno do jedné jamky 24 jamkové destičky, po 6 hodinách inkubace při 25°C byla k buňkám přidána směs pro transfekci a buňky byly inkubovány 12-14 hodin při 25°C. Druhý den byly buňky při výměně media přeneseny do nové jamky, pokud byly buňky transfekovány inducibilními plasmidy, byla produkce proteinu indukována roztokem 0,5 μ mol/l CuSO_4 . Po 24 hodinové inkubaci při 25°C byla analysována hladina produkce integrinu CD11b/CD18 nebo byla ustanovena stabilní buněčná linie.

5.12.29.3 Ustanovení stabilní buněčné linie

48 hodin po transfekci bylo růstové médium vyměněno za médium selekční, které obsahovalo příslušné antibiotikum. Selekční médium se vyměňovalo každé 4 dny, za tři týdny byla ustanovena stabilní buněčná linie.

5.12.29.4 Magnetická separace S2 buněk produkujících CD18

Kolonka s feromagnetickou náplní (MiniMACS column) byla umístěna v silném magnetickém poli a ekvilibrována 0,5 ml PBS/BSA-E.

1×10^7 S2 buněk bylo označeno anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (ředění 1:1000, 30 minut, 4°C) v 0,5 ml ledového PBS/BSA. Buňky byly 3x promyty 1 ml PBS/BSA a poté značeny 10x ředěnou sekundární anti-myší Ig protilátkou konjugovanou s magnetickými kuličkami (super-

paramagnetic MACS MicroBeads) v ledovém PBS/BSA (15 minut, 4°C). Buňky byly promyty 3x 0,5 ml ledového PBS/BSA-E a takto označená buněčná suspenze byla nanášena na ekvilibrovanou kolonku s feromagnetickou náplní, která byla umístěna v silném magnetickém poli. Magneticky označené buňky byly zadrženy na koloně a odděleny od buněk neprodukcujících podjednotku CD18, které byly odstraněny promytím kolony 3x 0,5 ml ledového PBS/BSA-E. Po odstranění kolonky z magnetického pole byly označené buňky eluovány 1 ml PBS, převedeny do růstového media a dále kultivovány. Anti-myší Ig protilátka konjugovaná s magnetickými kuličkami (super-paramagnetic MACS MicroBeads), kolonka s feromagnetickou náplní a magnet jsou součástí komerčně dodávaného kitu pro magnetickou separaci (MACS Myltenyi Biotec, SRN).

5.12.29.5 Selekce S2 buněk produkujících sekretovaný integrin CD11b/CD18

S2 buňky pro svůj růst potřebují přítomnost růstových faktorů, proto bylo do každé jamky v 96-ti jamkové destičce umístěno 3×10^5 předem usmrcených S2 buněk v daném selekčním médiu, buněčná kultura S2 buněk produkujících sekretovaný integrin CD11b/CD18 byla naředěna a kultivována tak, aby v každé jamce byla pouze jedna buňka. Poté, co se buňky rozrostly, produkce extracelulární domény byla indukována přidávkem Cu^{2+} iontů. Množství produkovaného integrinu v růstovém mediu bylo analysováno metodou ELISA.

5.12.29.6 Analýza produkce sekretovaného integrinu CD11b/CD18

Na ELISA mikrotitrační destičku (Nucn-Immuno, Maxisorp, Dánsko) byla navázána anti-CD11b monoklonální protilátka MEM174 nebo anti-CD18 monoklonální protilátka MEM48 naředěna na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ v roztoku 0,1 mol/l Na_2CO_3 pH 9,5. Poté byla destička 4x promyta PBST a inkubována 1 hodinu při 37°C s PBST/BSA a následně 4x promyta PBST. Do každé jamky bylo přidáno 100 μl média, ve kterém byly kultivovány transfekované buňky S2. Destička byla inkubována 1 hodinu při 37°C, promyta 4x PBST a následně inkubována 1 hodinu při 37°C s anti-6xHis monoklonální protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (ředění 1:1000). Poté byla destička 4x promyta PBST a při 492 nm byla stanovena peroxidasová aktivita pomocí substrátu o-fenylendiaminu.

5.12.29.7 Stanovení intracelulární hladiny CD11b a CD18

1×10^6 transfekovaných buněk S2 bylo fixováno 3,7 % formaldehydem v PBS 20 minut při 4°C, poté byly buňky promyty a permeabilizovány 0,2 % roztokem Tween 20 v PBS 2 minuty při 4°C. Nespecifické vazbě protilátky se zabránilo inkubací buněk v přítomnosti 7 % FCS v PBS 30 minut při pokojové teplotě. Buňky byly 3x promyty PBS/BSA a inkubovány s anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 nebo s anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (ředění 1:1000 v PBS/BSA, 30 minut, 4°C), po promytí byla primární protilátka značena anti-myší Ig

protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Buňky byly 3x promyty, resuspendovány v 150 μ l HBSS a analyzovány průtokovou cytometrií na přístroji LSR II.

5.12.30 STANOVENÍ PREZENTACE ANTIGENŮ NA MHC MOLEKULÁCH I. TŘÍDY

Dendritické buňky odvozené z kostní dřeně (**B**one-**M**arrow derived **D**endritic **C**ells, BM-DC) byly kultivovány v RPMI médiu, které obsahovalo 2 ng/ml růstového faktoru (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Suspenzní a semiadherentní buňky, které obsahovaly až 70 % buněk produkujících CD11b a CD11c, byly sklizeny 7.-8. den.

Pro studium prezentace epitopu OVA:257-264 byly jako antigen prezentující buňky (APC) použity BM-DC z C57BL/6 myši (Charles Rivers, Francie), které byly inkubovány s různými koncentracemi epitopu OVA:257-264 nebo rekombinantních CyaA-TB-OVA toxoidů (10^5 buněk, 4 hodiny). Tyto APC byly kokultivovány s anti-OVA:257-264 CD8⁺ T-buněčnými hybridomy (B3Z, 10^5 buněk, 18 hodin)²⁸⁸ (N. Shastri, University of California, USA), které jsou schopny specificky rozpoznávat komplexy molekul MHC I s navázaným OVA peptidem na povrchu APC, a jejichž stimulace může být monitorována pomocí interleukinu 2 (IL-2) uvolňovaného do supernatantu (testem CTLL-2).

Pro studium prezentace epitopu TB10.4:20-28 byly jako antigen prezentující buňky (APC) použity BM-DC z BALB/c myši (Charles Rivers, Francie), které byly inkubovány s různými koncentracemi epitopu TB10.4:20-28 nebo rekombinantních CyaA-TB-OVA toxoidů (10^5 buněk, 4 hodiny). Tyto APC byly kokultivovány s anti-TB10.4:20-28 CD8⁺ T-buněčnými hybridomy²⁸⁹ (YB8, 10^5 buněk, 18 hodin), které jsou schopny specificky rozpoznávat komplexy molekul MHC I s navázaným TB10.4:20-28 peptidem na povrchu APC, a jejichž stimulace může být monitorována pomocí interleukinu 2 (IL-2) uvolňovaného do supernatantu (testem CTLL-2).

Po 18 hodinách kultivace byly supernatanty z těchto kultur zamrazeny po dobu 2 hodin při teplotě -80°C a poté inkubovány (100 μ l) s cytotoxickými T-lymfocyty (CTLL-2, 10^4 buněk), jejichž proliferace je stimulována v přítomnosti IL-2. Po 24 hodinách byl do jamky přidán radioaktivní [³H]thymidin v koncentraci 50 μ Ci na jamku. Po 6 hodinách byly buňky sklizeny a byla stanovena koncentrace inkorporovaného [³H]thymidinu.

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

5.12.31 IMUNIZACE MYŠÍ

Jako adjuvans byla použita směs adjuvans DMT, která se skládala z **D**imethyl-dioktadecyl-ammonium bromidu (DDA) (250 μ g), **M**onofosforyl-lipidu A (MPL) (25 μ g) a **T**rehalosa-dikorynomykolátu (TDM) (25 μ g). Roztok DDA (Sigma-Aldrich, USA) v destilované vodě o koncentraci 10 mg/ml byl zahříván 30 minut při 80°C a vortexován každých 5 minut. Lyofilizovaná směs MPL-TDM (Sigma-Aldrich, USA) byla rozpuštěna v 1 ml PBS do výsledné koncentrace 0,5 mg/ml obou složek. Těsně před použitím byly DDA a MPL-TDM a antigen TB10.4 smíchány.

Myši byly imunizovány jednou subkutánní (s.c) dávkou bakterie BCG (10^6 CFU), proteinu TB10.4 (10 μ g) v DMT nebo samotným DMT adjuvans. Při imunizaci rekombinantním CyaA obdržely myši dvě intraperitoneální (i.p.) dávky (v den 0 a 15) rekombinantního CyaA (50 μ g) v alum ($\text{Al}(\text{OH})_3$).

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

5.12.32 T-BUNĚČNÉ TESTY

Myši slezinné buňky byly izolovány a analysovány 21 dní po imunizaci myší, v některých pokusech byly CD4^+ nebo CD8^+ T-buňky odstraněny negativní selekcí za použití Automacs (Miltenyi Biotech, SRN).

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

5.12.32.1 T-buněčná proliferace

Slezinné buňky byly inkubovány s různými koncentracemi antigenů v 96-ti jamkové destičce (1×10^6 buněk na jamku) v médiu RPMI, které obsahovalo 2 mmol/l glutamazu, 100 U/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu a 50 μ mol/l 2-merkaptoetanolu. Po 72 hodinách byl do jamky přidán radioaktivní [^3H]thymidin v koncentraci 1 μ Ci na jamku. Po 18 hodinách byly buňky sklizeny a byla stanovena koncentrace inkorporovaného [^3H]thymidinu.

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

5.12.32.2 ELISPOT

Na mikrotitrační destičku (Multiscreen filtration plates, Millipore, Francie) byla navázána anti-IFN- γ monoklonální protilátka (R4-6A2, BD Pharmingen, USA), do jednotlivých jamek bylo dáno 5×10^5 slezinných buněk z neimunizovaných myší, které byly ozářeny γ -zářením (3000 radů), buď s antigeny nebo pouze v médiu. Poté k nim byly přidány slezinné buňky z imunizovaných myší. Buňky byly inkubovány 40 hodin při 37°C, destička byla poté promyta destilovanou vodou a PBST. Spoty byly detekovány biotinylovanou anti-IFN- γ monoklonální protilátkou a streptavidin-alkalickou fosfatou (BD Pharmingen, USA) a pomocí substrátu 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-nitroblue tetrazolium (Sigma-Aldrich, USA).

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

5.12.33 TEST OCHRANY PROTI INFEKCI *M. TUBERCULOSIS*

Naivní i imunizované myši byly infikovány nízkou dávkou *M. tuberculosis* H37Rv v aerosolu 30 dní po imunizaci. 2 ml suspenze obsahující 5×10^6 CFU/ml bylo převedeno na aerosol tak, aby výsledná dávka činila $\approx 100 \pm 10$ CFU na myš. Plíce a sleziny byly 30 dní po infekci homogenizovány v orgánovém homogenizátoru MM300 (Qiagen, Francie) a pomocí skleněných kuliček o průměru

2,5 mm. Sériově pětkrát naředěné homogenáty byly kultivovány na 7H11 agaru s ADC (Difco, Becton Dickinson, USA) 15-18 dní při 37°C a poté bylo počítáno CFU.

Tato část práce byla provedena v laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

6 VÝSLEDKY

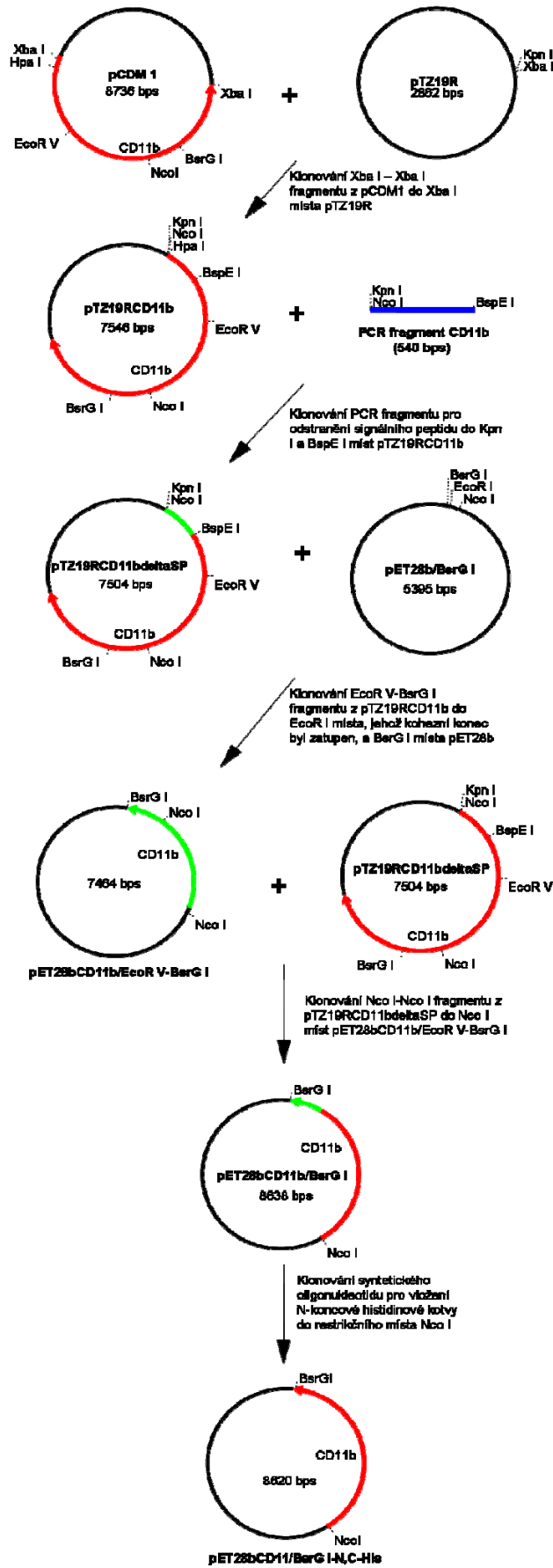
6.1 PRODUKCE A PURIFIKACE PODJEDNOTKY CD11b PRO PŘÍPRAVU PROTILÁTEK VHODNÝCH K DETEKCI METODOU WESTERN BLOT

V současné době není na trhu žádná protilátka vhodná k detekci integrinové podjednotky CD11b metodou Western blot, která by byla velmi užitečná pro studium interakce CyaA-CD11b/CD18. Proto jsme se rozhodli připravit rekombinantní CD11b jako antigen pro imunizaci a přípravu protilátky. K produkci podjednotky CD11b jsme použili bakteriální systém *E. coli* z důvodu snadné a rychlé produkce proteinů.

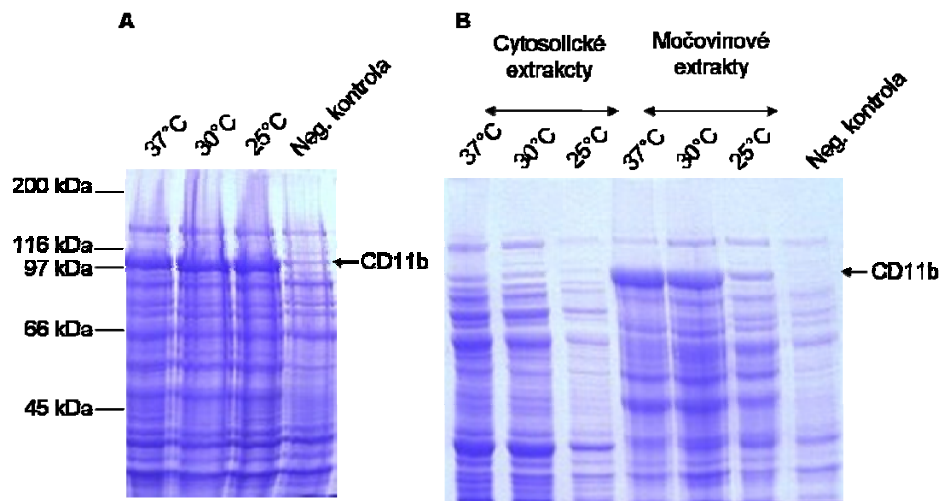
Pro snadnější produkci proteinu CD11b byla cDNA kódující podjednotku CD11b vložena do plasmidu pTZ19R. Gen kódující podjednotku CD11b byl vyštěpen z plasmidu pCDM1 restriktasou Xba I a vložen do plasmidu pTZ19R štěpeného stejným enzymem. Pro odstranění signální sekvence byla pomocí PCR reakce amplifikována část genu kódující podjednotku CD11b. Jako primery byly použity syntetické oligonukleotidy. 5', 3'- primer byl komplementární k sekvenci v genu pro podjednotku CD11b, která následuje za sekvencí pro signální peptid, a na svém 5'-konci byl opatřen sekvencí rozeznávanou enzymem Nco I. 3', 5'- primer byl komplementární k sekvenci uprostřed genu pro podjednotku CD11b, ve které bylo obsaženo restriční místo pro enzym BspE I. Jako templátová DNA byl použit plasmid pTZ19RCD11b.

Produkt PCR byl štěpen dvojicí endonukleas Nco I a BspE I a vložen do plasmidu pTZ19RCD11b štěpeného stejnými enzymy. Získaný plasmid pTZ19RCD11b-ΔSP byl následně použit ke konstrukci extracelulární domény podjednotky CD11b s C-koncovou histidinovou kotvou. Plasmid pET28b/BsrG I byl nejprve štěpen enzymem EcoR I a po zatupení kohesních konců byl štěpen enzymem BsrG I a následně defosforylován. Do takto upraveného vektoru byl vložen fragment BsrG I–EcoR V o velikosti 2100 bp z plasmidu pTZ19RCD11b-ΔSP. Do získaného plasmidu pET28b-CD11b/EcoR V-BsrG I, který byl štěpen endonukleasou Nco I, byl vložen fragment o velikosti 2797 bp vyštěpený stejným enzymem z plasmidu pTZ19RCD11b-ΔSP (**Obr. 24**).

Rekombinantní extracelulární doména podjednotky CD11b s C-koncovou histidinovou kotvou byla produkována v buňkách *E. coli* BL21(λDE3). Pro produkci byly použity teploty 37°C, 30°C a 25°C, protože jsme chtěli extracelulární doménu CD11b získat jako rozpustný protein. Produkce a správná velikost domény byla ověřena SDS elektroforesou (**Obr. 25**).

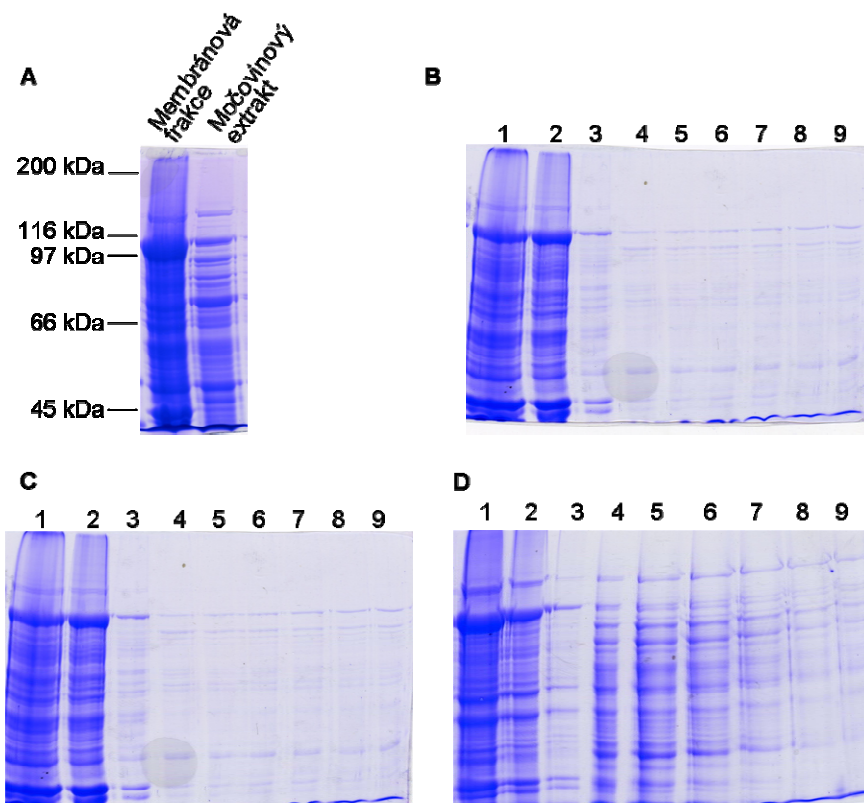


Obr. 24: Schema konstrukce plasmidu pro produkci extracelulární domény podjednotky CD11b.



Obr. 25: Produkce podjednotky CD11b Δ SP s C-koncovou histidinovou kotvou. A) SDS elektroforesa celobuněčných lysátů; B) SDS-PAGE cytosolu a močovinových extraktů v 7,5% polyakrylamidovém gelu. Jako negativní kontrola byly použity buňky *E. coli* BL21 (λ DE3) nesoucí prázdný plasmid pET28b/BsrG I.

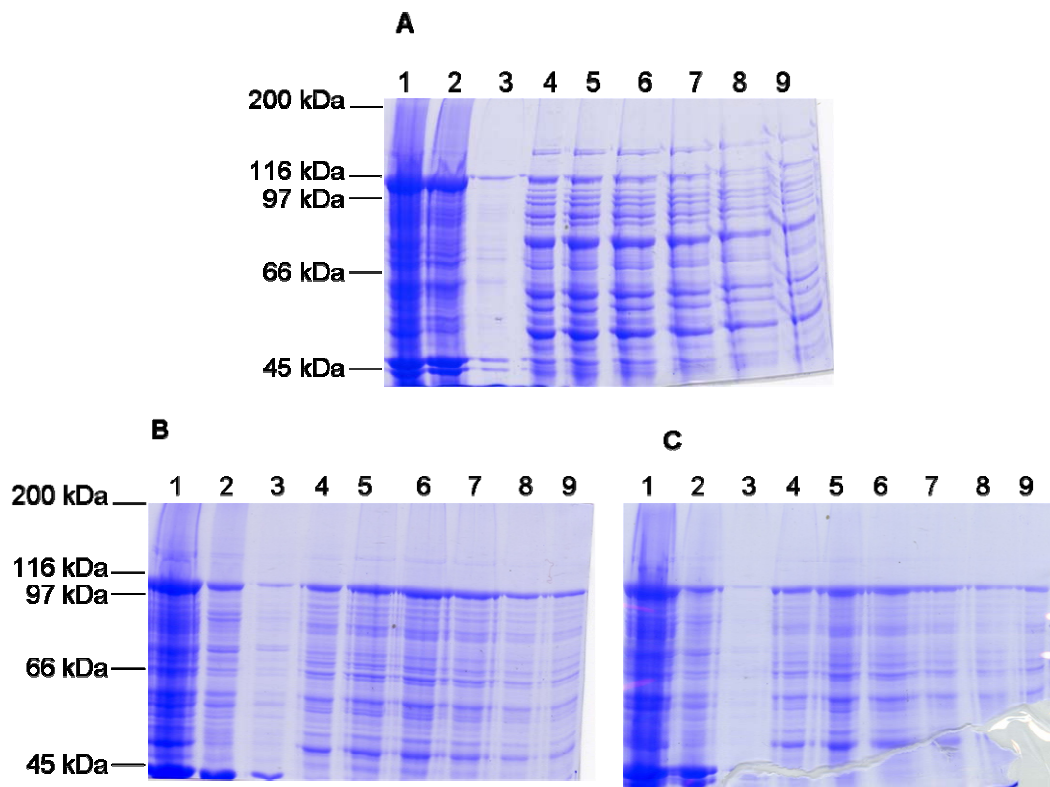
Vzhledem k tomu, že se nám nepodařilo zvýšit rozpustnost proteinu CD11b ani při nižších teplotách, byla pro další produkci extracelulární domény podjednotky CD11b ve větším množství použita teplota 37°C. Při přípravě močovinového extraktu byla na SDS-PAGE analysována také membránová frakce. Jak je vidět na **Obr. 26A** produkovaná extracelulární doména CD11b je asociována s membránami. K takto připravené membránové frakci byl přidán roztok Tritonu X-100 nebo Tweenu 20 do výsledné koncentrace 1% a nebo byla ponechána v samotném pufru TUMC. Pro purifikaci extracelulární domény CD11b byla použita afinitní chromatografie na Ni-NTA agarose. Nicméně ani jedna ze zvolených podmínek, tj. purifikace v pufru TUMC, v pufru TUMC s přísávkem Tritonu X-100 nebo Tweenu 20, nevedla k úspěšnému získání čisté podjednotky CD11b (**Obr. 26B-D**). Proto jsme se rozhodli pro fúzi extracelulární domény CD11b s N-koncovou histidinovou kotvou.



Obr. 26: Purifikace extracelulární domény podjednotky CD11b fúzované s C-koncovou histidinovou kotvou.
 A) Analýza membránové frakce a močovinnového extraktu (7,5 % SDS-PAGE). Získané membránové frakce byly naneseny na chromatografickou kolonu obsahující Ni-NTA agarosu v přítomnosti samotného TUMC pufru (B), TUMC pufru s 1 % Tritonem X-100 (C) nebo TUMC pufru s 1 % Tweenem 20 (D). Na 7,5 % polyakrylamidový gel s SDS byly vzorky naneseny vždy v tomto pořadí: 1. membránová frakce; 2. nezachycená frakce; 3. promytí; 4.-9. frakce po eluci.

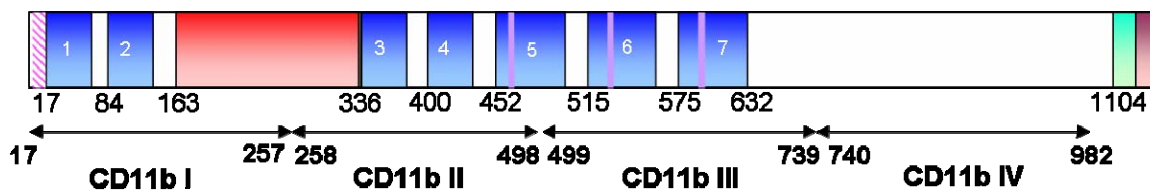
Plasmid pET28bCD11b/BsrG I byl štěpen endonukleasou Nco I, fragment o velikosti 2797 bp byl izolován z gelu a uchován pro zpětné vložení. Do takto upraveného plasmidu pET28bCD11b-ASP byl vložen oligonukleotid kódující N-koncovou histidinovou kotvu, který byl navržen tak, aby na N-konci bylo po vložení zrušeno zásahové místo pro enzym Nco I. Získaný plasmid byl opět štěpen restriktasou Nco I a do tohoto místa byl vložen dříve izolovaný fragment o velikosti 2797 bp. Výsledný plasmid pET28bCD11b/BsrG I-N,C-His byl použit pro produkci rekombinantní extracelulární domény podjednotky CD11b s N- a C-koncovou histidinovou kotvou (**Obr. 24**).

Podobně jako v předchozím případě i nyní byla extracelulární doména CD11b nalezena v membránové frakci. Pro purifikaci jsme opět použili afinitní chromatografii na Ni-NTA agarose za tří různých podmínek. Membránová frakce byla na chromatografickou kolonu nanesena v TUMC pufru, v TUMC pufru s 1 % Tritonem X-100 nebo v TUMC pufru s 1 % Tweenem 20. Ani tentokrát však purifikace nebyla úspěšná (**Obr. 27**).



Obr. 27: Purifikace extracelulární domény podjednotky CD11b fúzované s N- i C-koncovou histidinovou kotvou. Membránová frakce obsahující extracelulární doménu CD11b byla nanesena na chromatografickou kolonu obsahující Ni-NTA agarosu v přítomnosti samotného TUMC pufru (A), TUMC pufru s 1 % Tritonem X-100 (B) nebo TUMC pufru s 1 % Tweenem 20 (C). Na 7,5 % polyakrylamidový gel s SDS byly vzorky naneseny vždy v tomto pořadí: 1. membránová frakce; 2. nezachycená frakce; 3. promytí; 4.-9. frakce po eluci.

Je pravděpodobné, že nízká účinnost purifikace afinitní chromatografií byla dána asociací extracelulární domény CD11b s membránami. Rozhodli jsme se tedy, že tuto doménu rozdělíme na čtyři přibližně stejně velké části (**Obr. 28**), z nichž každá bude opatřena N- i C-koncovou histidinovou kotvou. Doufali jsme, že tím předejdeme asociaci s membránou.



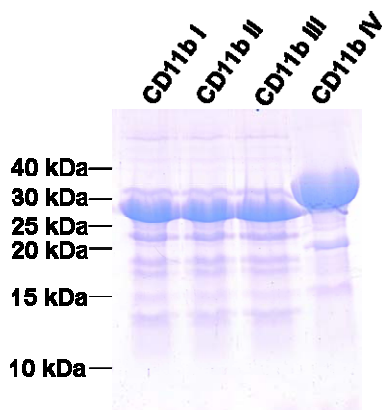
Obr. 28: Schematické znázornění podjednotky CD11b a její rozdělení na 4 části. Čísla označují jednotlivé aminokyselinové zbytky.

Pomocí PCR byly amplifikovány jednotlivé části genu pro CD11b. 5', 3'-primer byl vždy komplementární k začátku úseku, tj. začínal 17., 258., 499. nebo 740. aminokyselinovým zbytkem proteinu CD11b, a na svém 5'-konci byl opatřen sekvencí kódující zásahové místo pro endonukleasu Nde I. 3', 5'-primer byl komplementární ke konci každého úseku a na svém 5'-konci nesl sekvenci pro zásahové místo enzymu Xho I.

Plasmid pET28b byl štěpen enzymy Nde I a Xho I, do takto upraveného plasmidu byly vloženy jednotlivé fragmenty podjednotky CD11b. Přítomnost DNA a bezchybnost sekvence kódující fragmenty CD11b byla ověřena sekvenováním.

Výsledné plasmidy pET28bCD11bI-IV byly použity pro produkci jednotlivých fragmentů podjednotky CD11b s N- a C-koncovou histidinovou kotvou. Jednotlivé fragmenty byly purifikovány z močovinnového extraktu afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose (**Obr. 29**). Vypurifikované proteiny byly použity pro imunizaci a přípravu protilátky.

Získané výsledky tedy ukazují, že nízká účinnost purifikace celé podjednotky CD11b byla skutečně zapříčiněna její asociací s membránami, protože po rozdělení podjednotky na čtyři části byla již purifikace vysoce účinná.



Obr. 29: Elektroforetická analýza výsledných purifikovaných proteinů. Alikvoty proteinů po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí 15 % SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie blue.

6.2 PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18 V S2 BUŇKÁCH - HMYZÍM EXPRESNÍM SYSTÉMU

Expresní systém založený na S2 buňkách (Schneider 2 cells) mušky *Drosophila melanogaster* jsme vybrali, protože spojuje nejlepší vlastnosti jak savčích tak hmyzích expresních systémů. Používá velmi dobře charakterizované S2 buňky, které jsou odvozeny od primární kultury pozdního stádia embryí (20-24 hodin staré) mušky *Drosophila melanogaster*. Tyto buňky rostou jako semi-adherentní kultura při pokojové teplotě a bez potřeby CO₂, produkují proteiny s eukaryotickou posttranslační modifikací, avšak s rozdílnou glykosylací – poskytují vysokomannosový typ N-glykosylace. V neposlední řadě, expresní vektory pro tento systém jsou dostupné jak pro konstitutivní, tak pro indukibilní produkci, a také pro produkci proteinů sekretovaných do média.

6.2.1 KONSTRUKCE PLASMIDŮ PRO PRODUKCI INTEGRINOVÝCH PODJEDNOTEK CD11b A CD18 A JEJICH EXTRACELULÁRNÍCH DOMÉN

Endonukleasou Xba I byl z plasmidu pCDB1, (Dr. T. A. Springer, Harvard Medical School, Boston, USA), který obsahuje cDNA kódující podjednotku CD18, vyštěpen gen kódující podjednotku CD18 a vložen do plasmidu pTZ19R, linearizovaného stejným enzymem. Plasmid pTZ19RCD18 byl štěpen dvojicí endonukleas Kpn I a Nsi I, získaný fragment o velikosti 5470 bp byl ligován se syntetickým oligonukleotidem, jenž obsahoval sekvenci, která se nalézá těsně za sekvencí pro signální peptid v genu pro podjednotku CD18. Získané plasmidy pTZ19RCD18 a pTZ19RCD18 Δ SP byly použity pro konstrukci plasmidů pro produkci podjednotky CD18 v S2 buňkách (**Obr. 30**).

Plasmid pTZ19RCD11b, resp. pTZ19RCD11b Δ SP byl štěpen endonukleasami Kpn I a Fsp I. Takto získaný fragment byl vložen do expresních vektorů pAc5.1/V5-His A, pMT/V5-His A, pMT/BiP/V5-His A, které byly štěpeny enzymy Kpn I a EcoR V (**Obr. 31**). Stejným způsobem byly připraveny i expresní plasmidy pro podjednotku CD18, pouze gen kódující CD18 byl vyštěpen enzymy Kpn I a Bal I z plasmidu pTZ19RCD18, resp. pTZ19RCD18 Δ SP (**Obr. 32**).

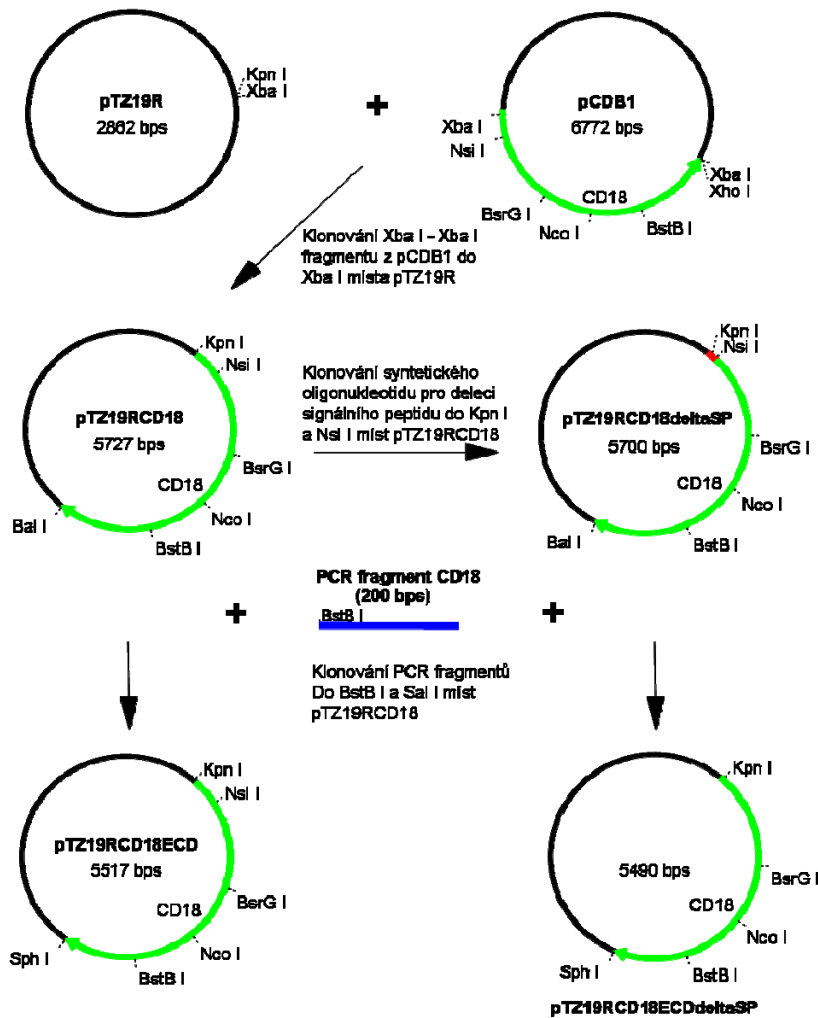
PCR fragment části genu podjednotky CD11b (AK 1011-1106) byl štěpen endonukleasou Nde I, která byla obsažena v 5', 3'-primeru. Takto upravený fragment byl vložen do plasmidu pTZ19RCD11b nebo pTZ19RCD11b Δ SP štěpeného enzymy Nde I a Sal I. Ze získaných plasmidů pTZ19RCD11bECD nebo pTZ19RCD11bECD Δ SP byly vyštěpeny úseky kódující extracelulární doménu podjednotky CD11b enzymy Sph I (tento kohesní konec byl zatupen pomocí T4 DNA polymerasy) a Kpn I. Po izolaci byly tyto fragmenty vloženy do vektorů pAc5.1/V5-His A, pMT/V5-His A (fragment z plasmidu pTZ19RCD11bECD) nebo pMT/BiP/V5-His A (fragment z plasmidu pTZ19RCD11bECD Δ SP), které byly štěpeny enzymy Kpn I a EcoR V. Extracelulární doména podjednotky CD11b byla ve fúzi s C-koncovou histidinovou kotvou, jejíž sekvence byla obsažena v původním expresním vektoru (**Obr. 33**).

Pro přípravu vektorů pro produkci extracelulární domény podjednotky CD18 byl PCR fragment (AK 633-699) štěpen restriktasou BstB I a vložen do plasmidů pTZ19RCD18 a pTZ19RCD18 Δ SP, které byly štěpeny enzymy BstB I a Sal I (**Obr. 30**). Ze získaných plasmidů pTZ19RCD18ECD nebo pTZ19RCD18ECD Δ SP byly vyštěpeny úseky kódující extracelulární doménu podjednotky CD18 enzymy Sph I (tento kohesní konec byl zatupen pomocí T4 DNA polymerasy) a Kpn I. Po izolaci byly tyto fragmenty vloženy do vektorů pAc5.1/V5-His A, pMT/V5-His A (fragment z plasmidu pTZ19RCD18ECD) nebo

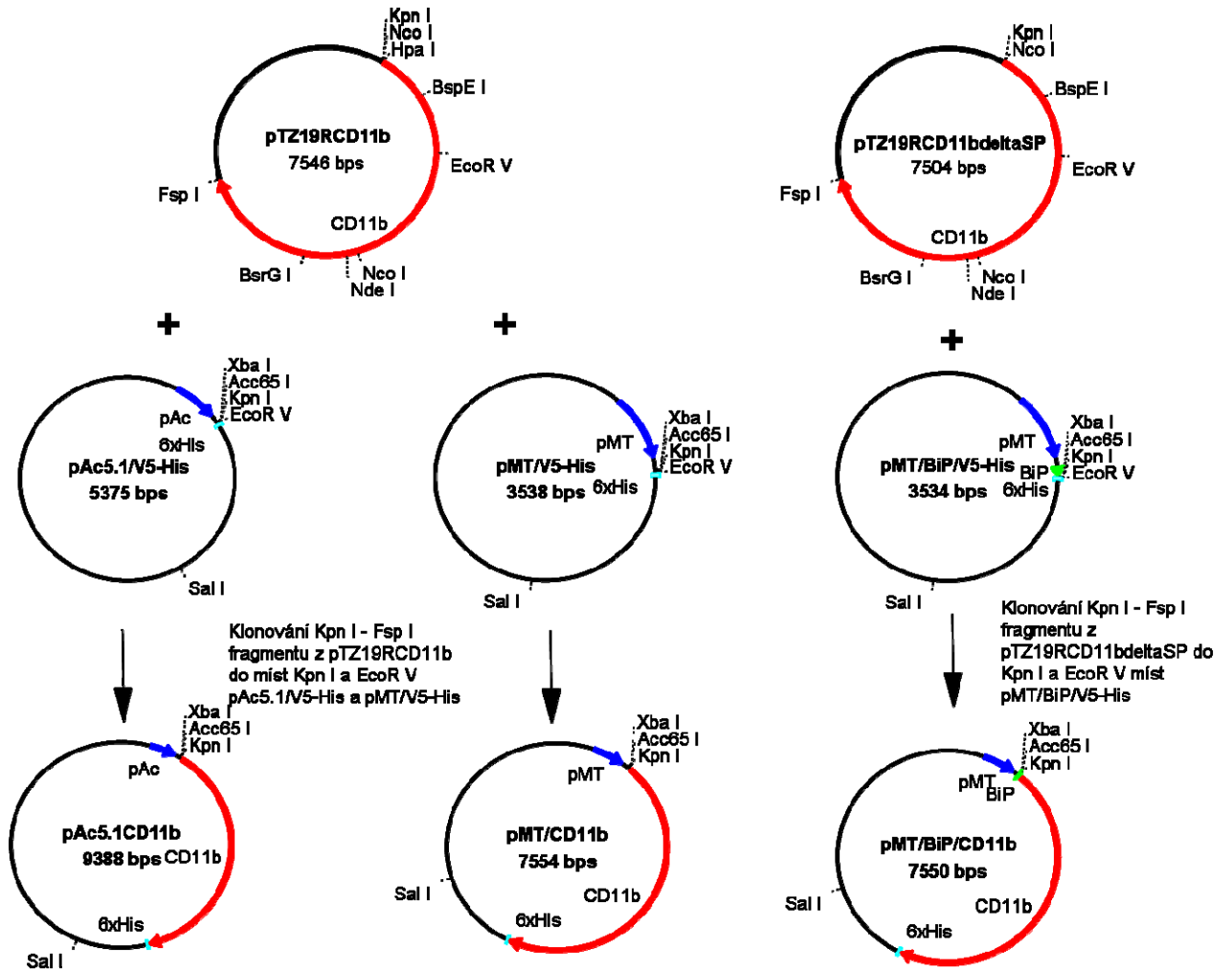
pMT/BiP/V5-His A (fragment z plasmidu pTZ19RCD18ECDΔSP), které byly štěpeny enzymy Kpn I a EcoR V. Extracelulární doména podjednotky CD18 byla ve fúzi s C-koncovou histidinovou kotvou, jejíž sekvence byla obsažena v původním expresním vektoru (Obr. 34).

Fragment kódující gen pro rezistenci k blasticidinu, který byl vyštěpen enzymy Hinc II a Ecl136 II z plasmidu pCoBlast, byl vložen do zásahového místa pro endonukleasu Sal I v plasmidech pAc5.1CD18, pAc5.1CD18ECD, pMT/CD18, pMT/CD18ECD, pMT/BiP/CD18 a pMT/BiP/CD18ECD. Do plasmidů pAc5.1CD11b, pAc5.1CD11bECD, pMT/CD11b, pMT/CD11bECD, pMT/BiP/CD11b a pMT/BiP/CD11bECD byl vložen do zásahového místa pro restriktasu Sal I fragment kódující gen pro rezistenci k hygromycinu, který byl vyštěpen endonukleasami Hinc II a Ecl136 II z plasmidu pCoHygro.

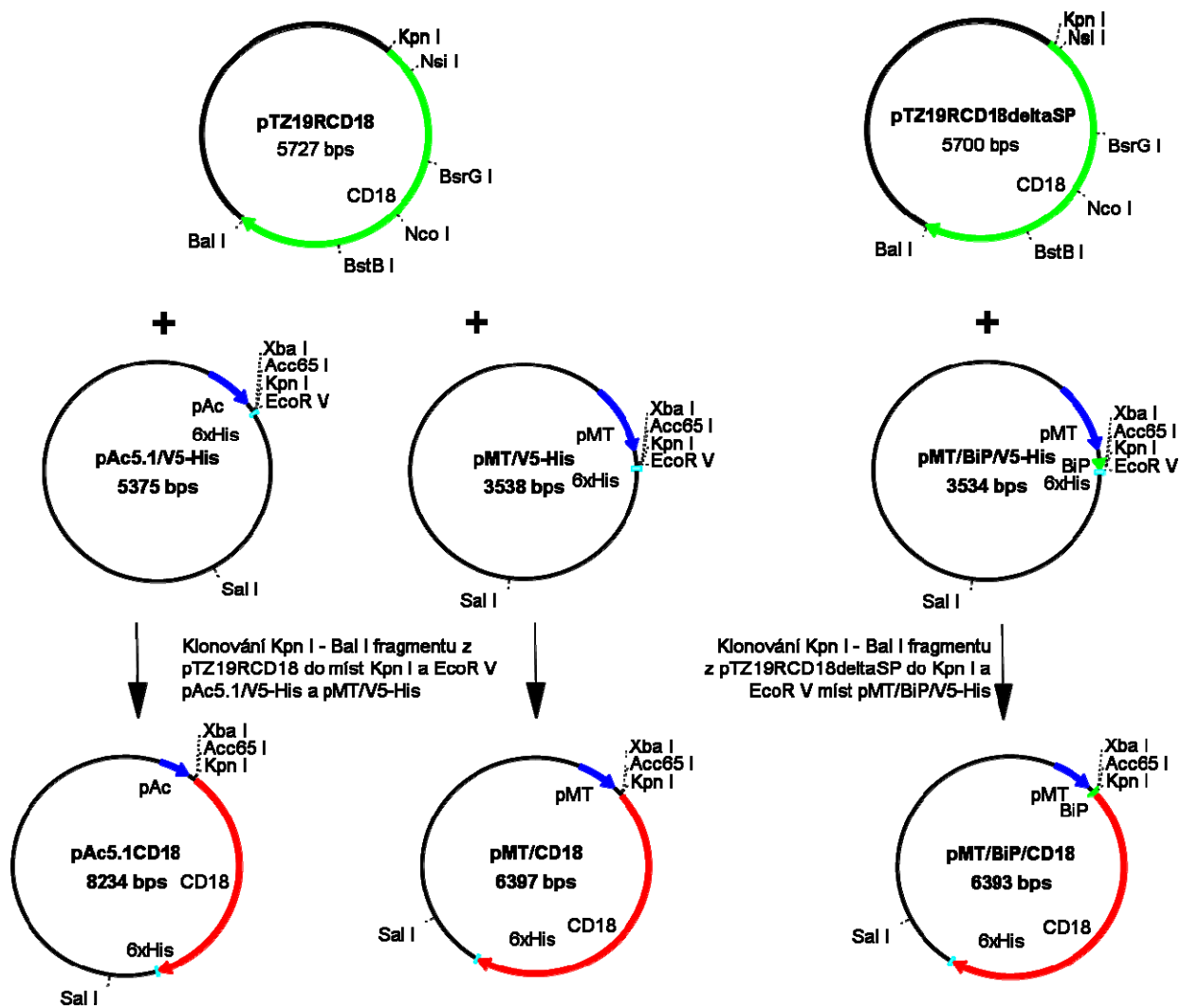
Všechny konstrukty byly systematicky kontrolovány DNA sekvenováním, aby se předešlo nežádoucím mutacím.



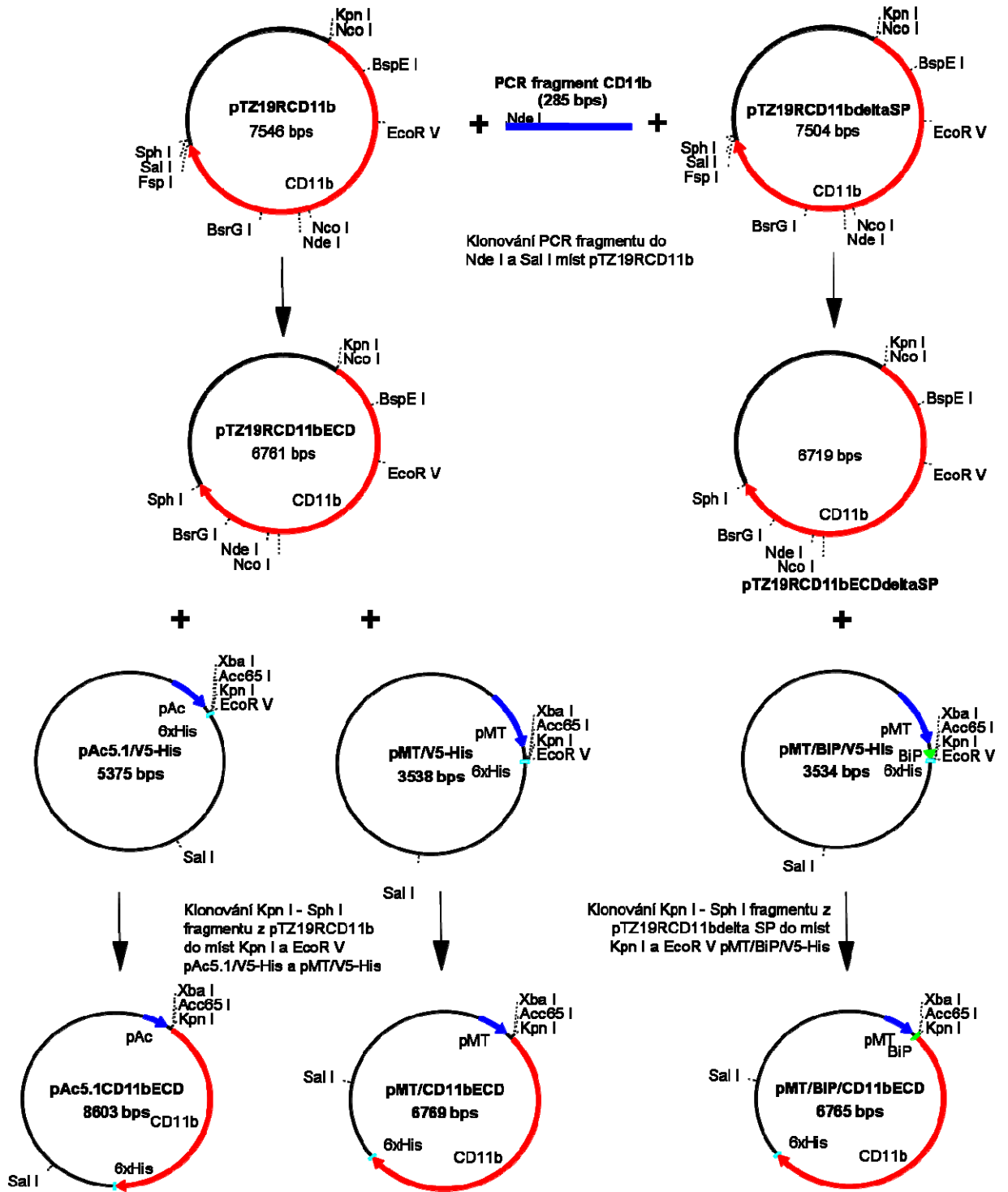
Obr. 30: Schema konstrukce plasmidu pTZ19R, který nesl gen pro podjednotku CD18 nebo její extracelulární doménu, ve kterém byla sekvence pro signální peptid zahrnuta nebo odstraněna.



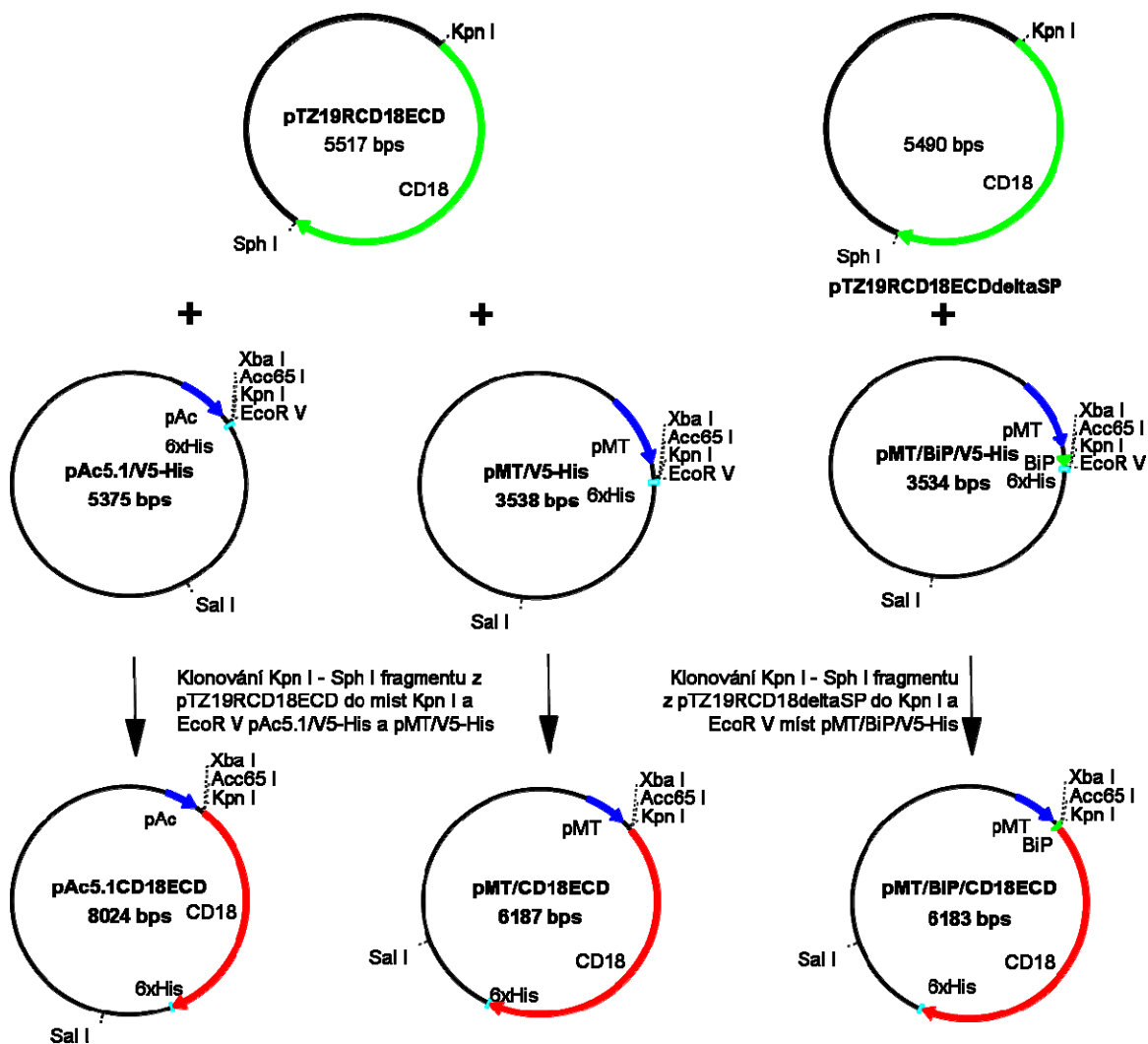
Obr. 31: Schema konstrukce plasmidu pro produkci podjednotky CD11b v S2 buňkách.



Obr. 32: Schema konstrukce plasmidu pro produkci podjednotky CD18 v S2 buňkách.



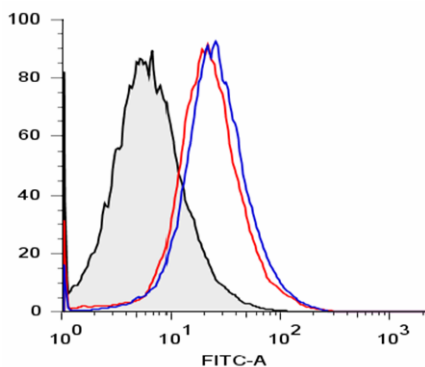
Obr. 33: Schema konstrukce plasmidu pro produkci extracelulární domény podjednotky CD11b v S2 buňkách.



Obr. 34: Schema konstrukce plasmidu pro produkci extracelulární domény podjednotky CD18 v S2 buňkách.

6.2.2 PRODUKCE PODJEDNOTEK CD11b A CD18 V S2 BUŇKÁCH

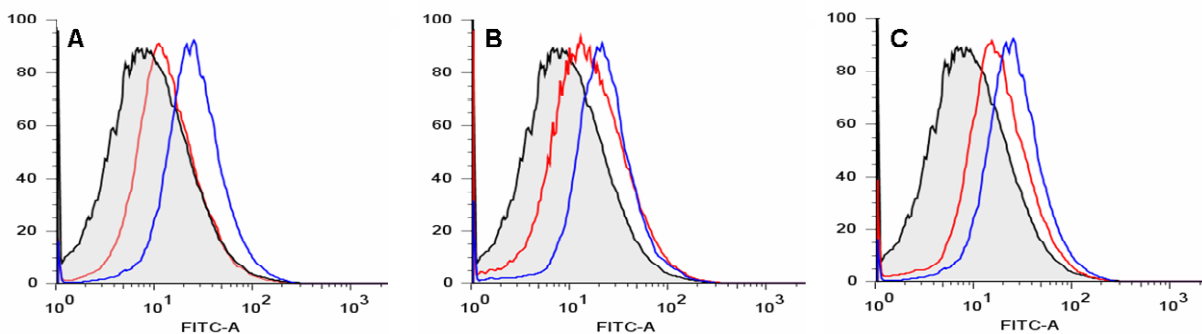
Do jedné jamky 24 jamkové destičky bylo vyneseno 3×10^5 S2 buněk, po 6 hodinách inkubace při 25°C byla k buňkám přidána směs pro transfekci, která obsahovala lipofektamin 2000, médium Opti-MEM I a plasmidy pAc5.1CD11b a pAc5.1CD18 v poměru 1:1. Buňky byly inkubovány přes noc. Po 14-18 hodinách byly buňky při výměně media přeneseny do nové jamky a inkubovány 24 hodin. Po této době byla analysována hladina produkce integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu pomocí průtokové cytometrie. Podjednotky CD11b a CD18 byly značeny anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 nebo anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 a anti-myši protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Jak je vidět na **Obr. 35** obě integrinové podjednotky byly na buněčném povrchu detekovány ve stejném množství, což naznačovalo, že pravděpodobně tvoří na buněčném povrchu heterodimer.



Obr. 35: Detekce integrinu CD11b/CD18 po transiení transfekci. S2 buňky byly transfekovány směsí plasmidů pAc5.1CD11b a pAc5.1CD18. Produkce integrinu CD11b/CD18 byla analysována průtokovou cytometrií. Podjednotky CD11b a CD18 byly značeny anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 (červená) nebo anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (modrá) a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Jako negativní kontrola (šedá) byly použity netransfekované buňky S2.

V druhém kroku jsme se rozhodli pro stabilní produkci integrinu CD11b/CD18. Buňky S2 byly transfekovány směsí plasmidů pro konstitutivní (pAc5.1CD11b-Hygro a pAc5.1CD18-Blast) nebo indukibilní produkci (pMTCD11b-Hygro a pMTCD18-Blast) a také plasmidy, které obsahovaly signální sekvenci specifickou pro tyto hmyzí buňky (pMT/BiP/CD11b-Hygro a pMT/BiP/CD18-Blast), abychom zjistili, který systém je nejvhodnější pro produkci integrinových podjednotek. Růstové médium bylo 48 hodin po transfekci vyměněno za médium selekční, které obsahovalo antibiotikum blasticidin a hygromycin. Selekční médium se vyměňovalo každé 4 dny, za tři týdny byla ustanovena stabilní buněčná linie. Produkce integrinu v buněčných liniích, které byly transfekovány expresními plasmidy odvozenými od pMT/V5-His a pMT/BiP/V5-His, byla indukována Cu^{2+} ionty o výsledné koncentraci 500 μM . Produkce integrinu CD11b/CD18 byla analysována průtokovou cytometrií. Podjednotky CD11b a CD18 byly značeny anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 nebo anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488.

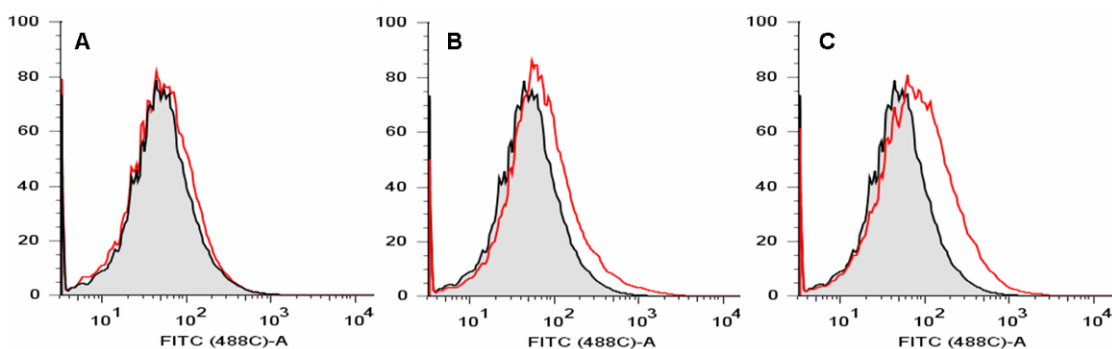
Jak je vidět na **Obr. 36**, účinnost transfekce a produkce podjednotek CD11b a CD18 nebyly příliš vysoké (20% pro podjednotku CD18 a 3% pro podjednotku CD11b). Příčinnou nízké účinnosti transfekce by mohla být vzájemná kompetice obou podjednotek při jejich současné transfekci. Rozhodli jsme se tedy, že se pokusíme zvýšit účinnost transfekce transfekcí pouze jedné podjednotky. Po ustanovení stabilní linie a selekci nejlépe produkujících buněk bude pak transfekována podjednotka druhá.



Obr. 36: Produkce podjednotek CD11b a CD18 po ustanovení stabilní linie. Plasmidy pAc5.1CD11b-Hygro a pAc5.1CD18-Blast (A), nebo pMTCD11b-Hygro a pMTCD18-Blast (B), popř. pMT/BiP/CD11b-Hygro a pMT/BiP/CD18-Blast (C) byly smíchány v poměru 1:1 a pomocí lipofektaminu 2000 byla tato směs transfekována do S2 buněk. Produkce integrinu CD11b/CD18 byla analysována průtokovou cytometrií. Podjednotky CD11b a CD18 byly značeny anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 (červená) nebo anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (modrá) a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Jako negativní kontrola (šedá) byly použity netransfekované buňky S2.

Transfekce S2 buněk byla opět provedena lipofektaminem 2000 a k transfekci byly použity plasmidy pro konstitutivní (odvozené od pAc5.1/V5-His) nebo inducibilní produkci (odvozené od pMT/V5-His) a také plasmidy, které obsahovali signální sekvenci specifickou pro tyto hmyzí buňky (odvozené od pMT/BiP/V5-His).

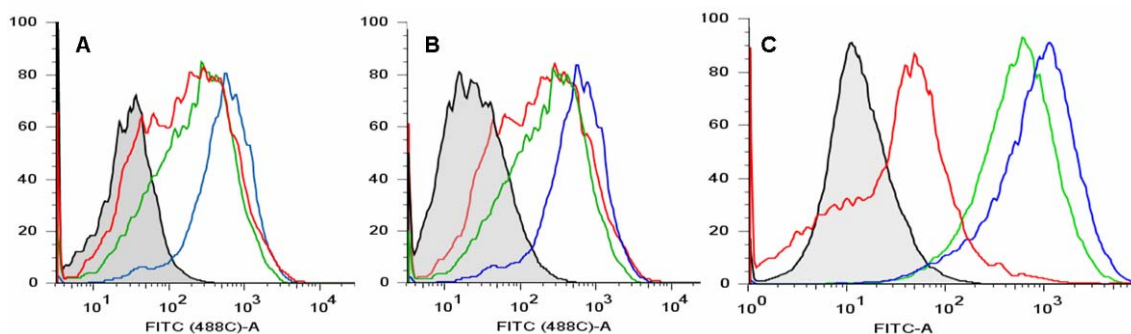
Účinnost transfekce a produkce podjednotky CD11b byla velmi nízká (Obr. 37). Zdá se tedy, že tuto integrinovou podjednotku nelze produkovat samostatně.



Obr. 37: Produkce integrinovou podjednotku CD11b samostatně bez podjednotky CD18. S2 buňky byly transfekovány plasmidy pAc5.1CD11b-Hygro (A), pMTCD11b-Hygro (B) nebo pMT/BiP/CD11b-Hygro (C). Po ustanovení stabilní linie byla produkce CD11b detekována pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 a analysována průtokovou cytometrií (červená). Jako negativní kontrola (šedá) byly použity netransfekované S2 buňky.

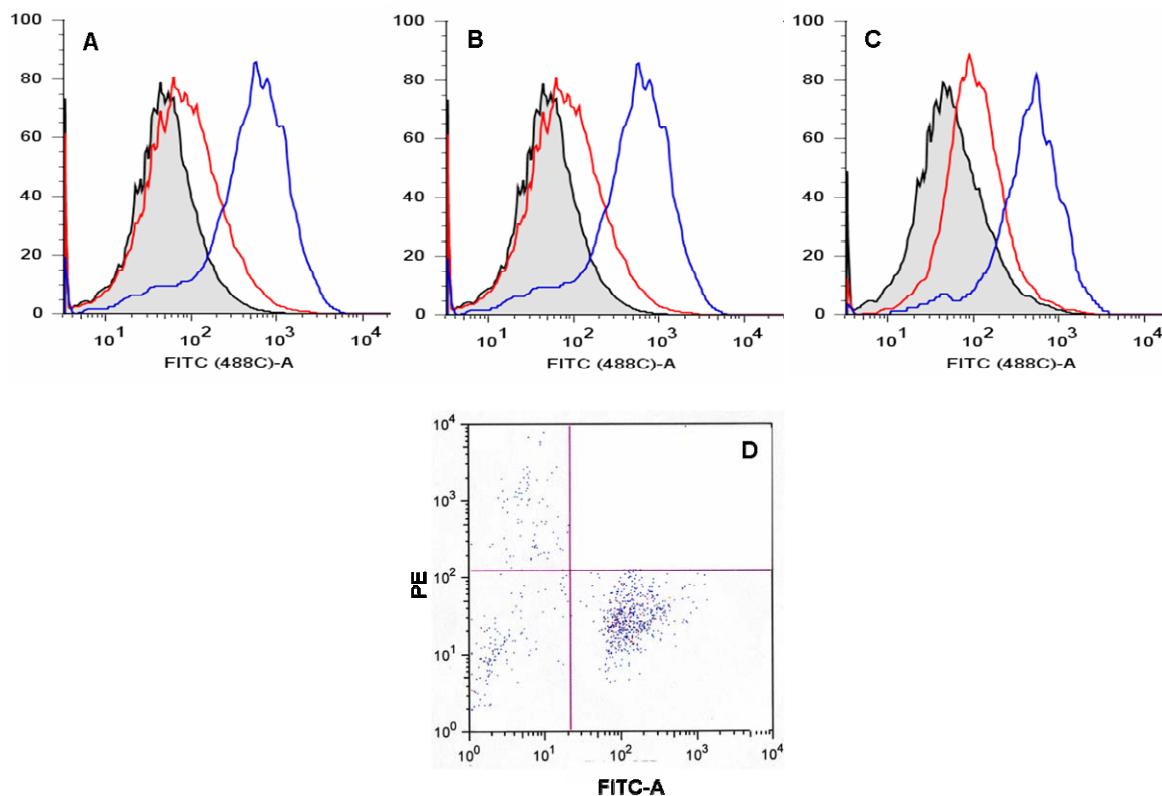
Naopak produkce podjednotky CD18 byla velmi dobrá. Po ustanovení stabilní linie, byly provedeny dvě magnetické separace, kterými jsme nabohatili buňky, které nejlépe produkovaly CD18. Buňky byly označeny anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 a poté anti-myší protilátkou konjugovanou s magnetickými kuličkami (super-paramagnetic MACS MicroBeads). Takto označená buněčná suspenze byla nanesena na kolonku s feromagnetickou náplní, která byla umístěna v silném magnetickém poli. Magneticky označené buňky byly zadrženy na koloně a odděleny od buněk, které neprodukovaly podjednotku CD18. Po odstranění kolonky z magnetického pole byly označené buňky

eluovány PBS, převedeny do růstového media a dále kultivovány. Produkce podjednotky CD18 byla analysována průtokovou cytometrií po ustanovení stabilní linie, po první a druhé magnetické separaci (**Obr. 38**).



Obr. 38: Produkce integrinové podjednotky CD18 samostatně. S2 buňky byly transfekovány plasmidy pAc5.1CD18-Blast (**A**), pMTC18-Blast (**B**) nebo pMT/BiP/CD18-Blast (**C**). Po ustanovení stabilní linie byly provedeny dvě magnetické separace buněk, které nejvíce produkovaly CD18. Produkce CD18 byla detekována pomocí anti-CD18 monoklonální protilátky MEM48 po ustanovení stabilní linie (červená), po první (zelená) a druhé (modrá) magnetické separaci a analysována průtokovou cytometrií. Jako negativní kontrola (šedá) byly použity netransfekované S2 buňky.

Do S2 buněk produkujících integrinovou podjednotku CD18 byl transfekován plasmid obsahující gen pro CD11b. K produkci integrinu CD11b/CD18 byly použity všechny tři dostupné expresní systémy. Po ustanovení stabilní buněčné linie bylo detekováno množství integrinových podjednotek CD11b a CD18 průtokovou cytometrií. Jak je vidět z **Obr. 39A-C** ani transfekce nejprve podjednotky CD18 a poté podjednotky CD11b nezvýšila množství integrinu CD11b/CD18 na povrchu S2 buněk. Z rozdílného množství podjednotek CD11b a CD18 lze také usuzovat, že pravděpodobně nejsou asociovány v heterodimer. Abychom ověřili tuto domněnku, byly buňky S2-CD11b/CD18 nejprve označeny anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 a poté anti-CD11b monoklonální protilátkou konjugovanou s fykoerytrinem M1/70PE a analysovány průtokovou cytometrií. Pokud by podjednotky CD11b a CD18 tvořili na povrchu buněk heterodimer, měly by tyto buňky být pozitivní jak pro fykoerytrin tak pro AlexaFluor488. Jak je však vidět na **Obr. 39D** v této oblasti se žádné buňky nevyskytují, proto můžeme tvrdit, že podjednotky CD11b a CD18 netvoří v S2 buňkách heterodimery.



Obr. 39: Detekce integrinu CD11b/CD18 na povrchu S2 buněk. Buňky S2-CD18 byly transfekovány plasmidy pAc5.1CD11b-Hygro (A), pMTCD11b-Hygro (B) nebo pMT/BiP/CD11b-Hygro (C). Po ustanovení stabilní linie byla detekována produkce integrinu CD11b/CD18 pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 (červená) nebo anti-CD18 monoklonální protilátky MEM48 (modrá) a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Jako negativní kontrola (šedá) byly použity netransfekované S2 buňky. **D)** Dvojitě značení integrinu CD11b/CD18. Buňky S2-CD11b/CD18 byly nejprve označeny anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 a poté anti-CD11b monoklonální protilátkou konjugovanou s fykoerytrinem M1/70PE.

6.2.3 PRODUKCE EXTRACELULÁRNÍ DOMÉNY INTEGRINU CD11b/CD18

Kromě produkce integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu byla naším záměrem také produkce extracelulární domény tohoto integrinu a také jeho samostatných podjednotek pro další funkční studie. Bylo totiž ukázáno, že tvorba heterodimeru nevyžaduje přítomnost cytoplasmatické a transmembránové části podjednotek CD11b a CD18²⁴⁵.

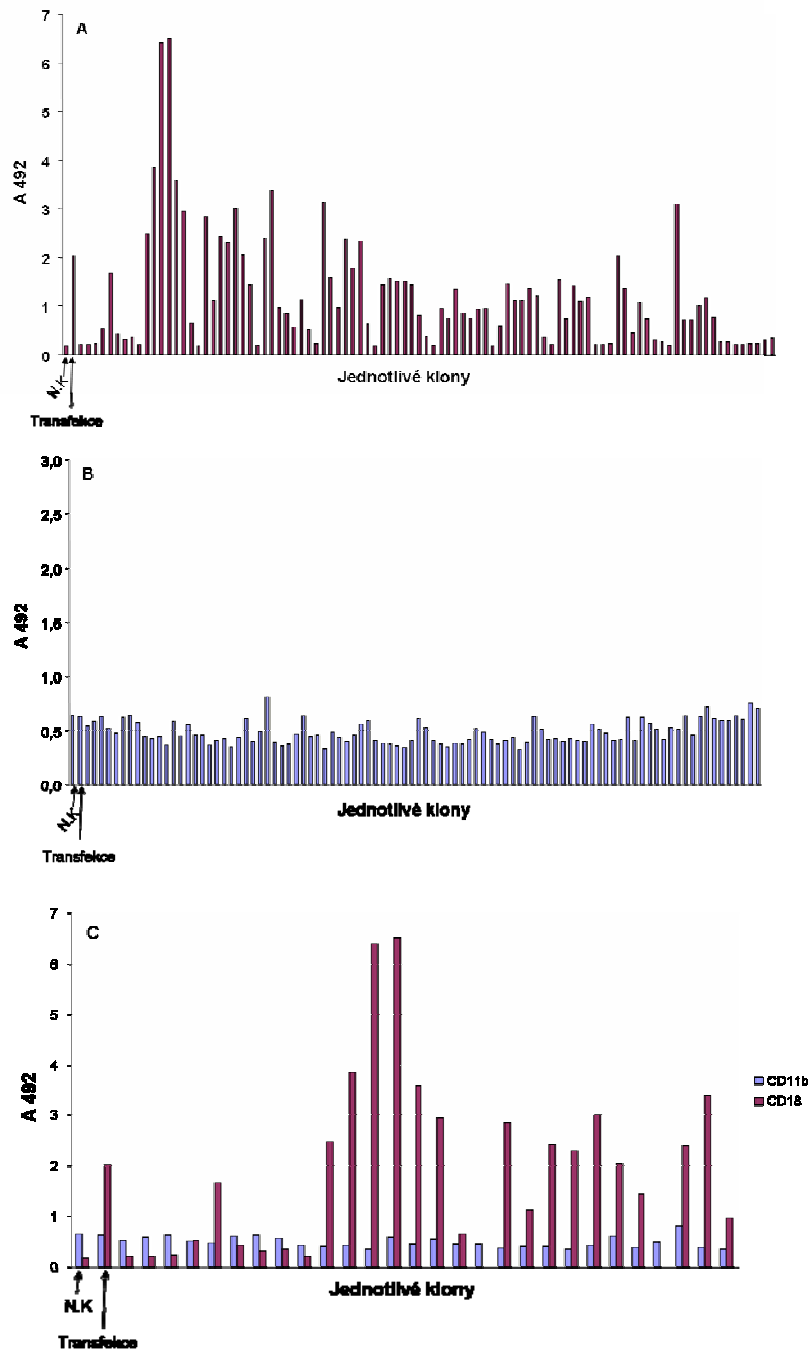
Buňky S2 byly transfekovány plasmidem pMT/BiP/CD11bECD-Hygro, pMT/BiP/CD18ECD-Blast, nebo směsí těchto plasmidů. Po ustanovení stabilní buněčné linie byla produkce proteinů indukována přidáním CuSO_4 do výsledné koncentrace $500 \mu\text{M}$, po 24 hodinách po indukcii bylo odebráno růstové médium, ve kterém bylo metodou ELISA stanoveno množství produkované extracelulární domény.

Pro získání nejlépe produkujících buněk byla buněčná kultura naředěna a kultivována v 96-ti jamkové destičce tak, aby v každé jamce byla pouze jedna buňka. S2 buňky pro svůj růst potřebují přítomnost růstových faktorů, proto bylo do každé jamky umístěno 3×10^5 předem usmrcených S2 buněk v daném selekčním mediu. Poté co se buňky rozrostly, produkce extracelulární domény byla indukována přidávkem Cu^{2+} iontů. Množství

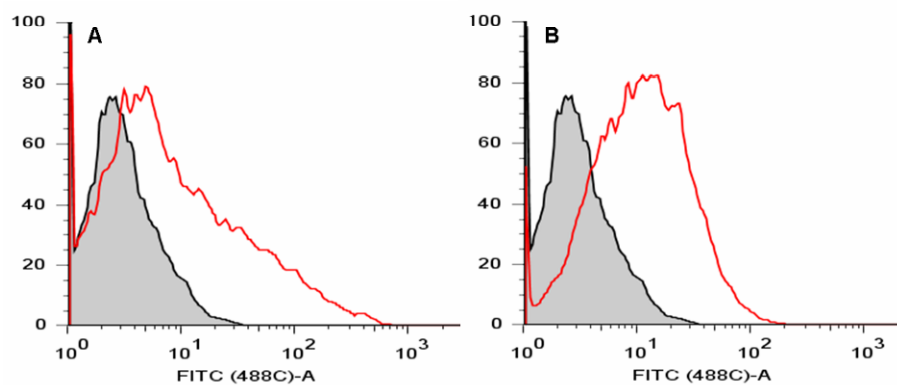
produkovaného integrinu v růstovém mediu bylo analysováno metodou ELISA (**Obr. 40A-C**).

Podobně jako při produkci integrinu CD11b/CD18 na buněčný povrch i v tomto případě byla produkce podjednotky CD18 velmi dobrá, avšak hladina produkce extracelulární domény CD11b byla velmi nízká, nebo žádná, a to nejen pokud byla transfekována samostatně, ale při transfekci spolu s podjednotkou CD18.

Rozhodli jsme se tedy detekovat intracelulární hladinu proteinu CD11b, ale i CD18 průtokovou cytometrií. Buňky S2-CD11b/CD18ECD byly fixovány 3,7 % formaldehydem v PBS 20 minut při 4°C, poté byly buňky promyty a permeabilizovány 0,2 % roztokem Tween 20 v PBS 2 minuty při 4°C. Aby se zabránilo nespecifické vazbě protilátky, byly fixované buňky inkubovány v přítomnosti 7 % FCS v PBS 30 minut při pokojové teplotě. Produkovaná extracelulární doména CD18 a CD11b byla detekována anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48, resp. anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 a následně anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Na **Obr. 41** je vidět, že kromě CD18 byla intracelulárně v malé míře produkována i extracelulární doména podjednotky CD11b. Zdá se tedy, že S2 buňky nejsou schopny transportovat podjednotku CD11b na svůj povrch nebo sekretovat její extracelulární doménu do media a to ani v případě, že je opatřena signálním peptidem specifickým pro tyto buňky.



Obr. 40: Produkce extracelulárních domén integrinu CD11b/CD18. S2 buňky byly transfekovány plasmidy pMT/BiP/CD18ECD-Blast (A), pMT/BiP/CD11bECD-Hygro (B) nebo jejich směsí (C). Po ustanovení stabilní linie byly buňky nařaděny do 96-ti jamkové destičky tak aby každá jamka obsahovala pouze 1 buňku. Na ELISA destičku byla navázána anti-CD11b nebo anti-CD18 monoklonální protilátka, která vázala extracelulární domény podjednotek integrinu CD11b/CD18. Množství navázaného proteinu bylo detekováno anti-6xHis monoklonální protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidasou. V prvním sloupci je vždy negativní kontrola (N.K.), kterou bylo médium použité pro růst netransfekovaných buněk. V druhém sloupci je pak vždy médium, ve kterém rostly buňky před kultivací v 96-ti jamkové destičce (Transfekce), v ostatních sloupcích je pak médium z jednotlivých jamek.



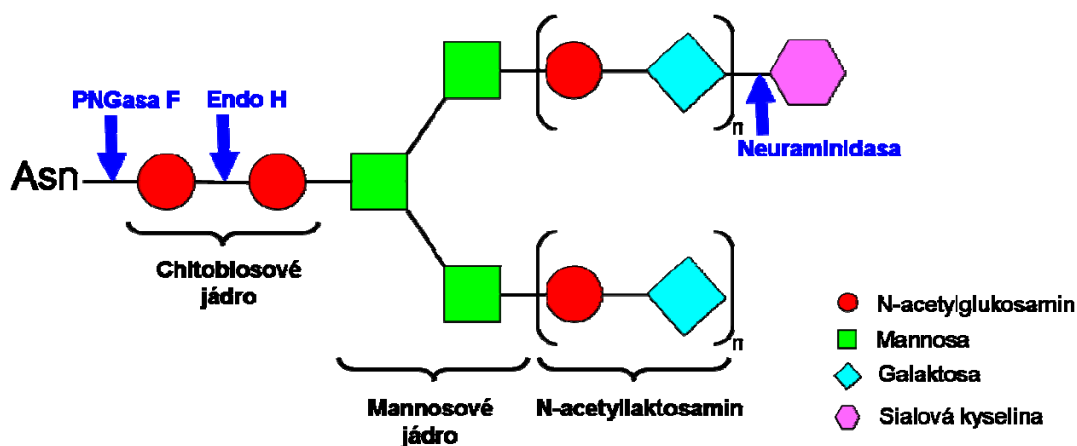
Obr. 41: Intracelulární detekce CD11b/CD18. Buňky S2-CD11b/CD18 byly fixovány, permeabilizovány, poté bylo detekováno intracelulární množství extracelulární domény CD11b (A) a CD18 (B) a analysováno průtokovou cytometrií.

6.3 RTX TOXINY ROZEZNÁVAJÍ N-GLYKOSIDICKY VÁZANÉ OLIGOSACHARIDOVÉ ŘETĚZCE β_2 INTEGRINOVÝCH RECEPTORŮ

6.3.1 GLYKOSYLACE INTEGRINU CD11b/CD18 JE NEZBYTNÁ PRO VAZBU CyaA

Nedávno bylo ukázáno, že vazba a cytotoxická aktivita CyaA jsou závislé na interakci s integrinovým receptorem CD11b/CD18, který je stejně jako ostatní integriny silně glykosylován². Krom toho bylo ukázáno, že CyaA se s nízkou, ale detekovatelnou účinností váže na buňky, které nemají receptor CD11b/CD18. Vyslovili jsme proto hypotézu, že za “promiskuitní“ aktivitou CyaA může stát interakce toxinu s oligosacharidovými strukturami, které jsou podobné na površích různých buněk a glykoproteinů.

Abychom prověřili, zda je glykosylace integrinu CD11b/CD18 důležitá pro vazbu CyaA, testovali jsme vazbu CyaA na buňky deglykosylované působením tří typů selektivních glykosidas, které byly schopné štěpit předpokládané N-vázané oligosacharidové řetězce. Použili jsme následující enzymy: PNGasu F (peptide-N-glycosidase F) - amidasu, která katalysuje štěpení amidové vazby mezi vnitřním N-acetylglukosaminem a asparaginovým zbytkem; EndoH (endoglycosidase H), která štěpí uvnitř chitobiosového jádra a neuraminidasu, která katalysuje hydrolýzu α -(2 \rightarrow 3), α -(2 \rightarrow 6) a α -(2 \rightarrow 8) glykosidické vazby sialové kyseliny glykoproteinů a oligosacharidů (Obr. 42).



Obr. 42: Zjednodušené schematické zobrazení N-glykosidicky vázaného komplexního typu oligosacharidu β_2 integrinů s vyznačením zásahových míst pro glykosidasy. Tento komplexní typ obsahuje chitobiosové jádro (dva N-acetylglukosaminové zbytky, GlcNAc) vázané na asparaginový zbytek v sekvenci N-X-S/T. Z druhé strany je k němu navázáno mannosové jádro (tři mannosové zbytky, Man), na které navazuje N-acetylglukosaminový zbytek (N-acetylglukosamin a galaktosa, Gal). Ten se může několikrát opakovat a buď je na něj navázána sialová kyselina nebo zůstává nemodifikovaný. Modré šipky znázorňují zásahová místa pro specifické glykosidasy – PNGasu F, EndoH a neuraminidasu.

Buňky CHO K1 (Chinese hamster ovary) transfekované lidským integrinem CD11b/CD18 (CHO-CD11b/CD18) jsme použili jako modelové buňky, které jsou schopny

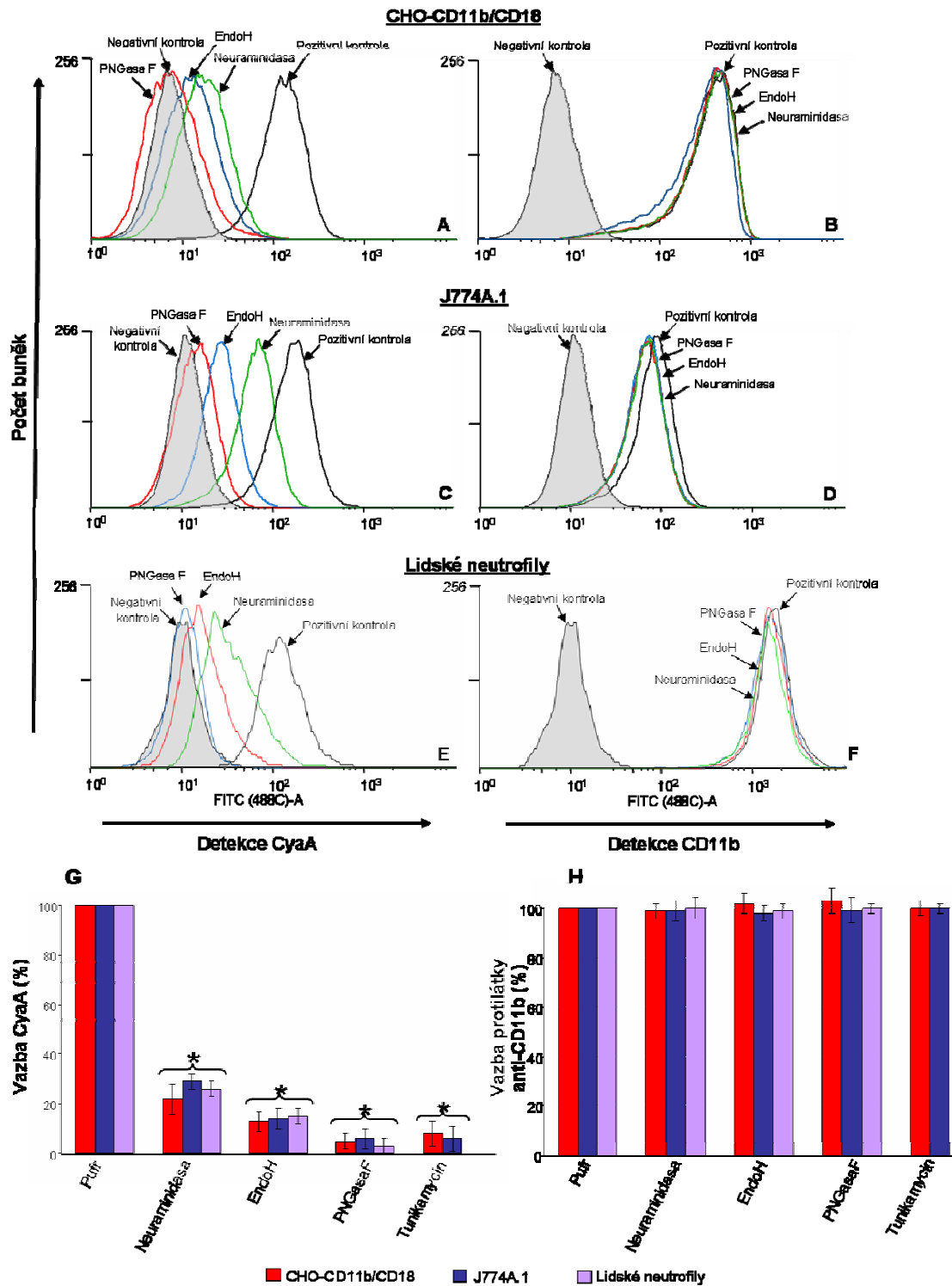
účinně a saturovatelně vázat CyaA na rozdíl od netransfekovaných CHO buněk¹⁷¹. Abychom předešli zkreslení výsledků vazebných pokusů endocytosou komplexu CyaA s integrinem CD11b/CD18, byli CHO-CD11b/CD18 buňky inkubovány při 4°C s inhibitory proteas a rovněž s inhibítorem na klatrinu závislé endocytosy – chlorpromazinem. Bylo totiž ukázáno, že komplex CyaA-CD11b/CD18 je částečně endocytován²⁹⁰.

Buňky byly nejdříve inkubovány s jednotlivými glykosidasami - PNGasou F, EndoH nebo neuraminidasou jednu hodinu při 37°C. Poté byly buňky promyty a byl přidán purifikovaný CyaA/233FLAG do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml po dobu 30 minut při 4°C. Vazba toxinu na buněčný povrch byla sledována pomocí průtokové cytometrie a detekována anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Jak ukazují výsledky uvedené na **Obr. 43A**, byla vazba CyaA/233FLAG nejvyšší na buňkách, které nebyly inkubovány s glykosidasami. Tato vazba však byla znatelně snížena po odstranění zbytků sialové kyseliny působením neuraminidasy ($22 \pm 6 \%$, výsledek je vyjádřen jako procento vazby CyaA na plně glykosylované CHO-CD11b/CD18 buňky), nebo po odstranění téměř celého oligosacharidu kromě prvního N-acetylglukosaminového zbytku působením EndoH ($13 \pm 4 \%$). Odstranění celého oligosacharidového řetězce PNGasou F vedlo k téměř úplné ztrátě vazby CyaA/233FLAG ($5 \pm 3 \%$).

Abychom potvrdili, že snížení vazby CyaA na deglykosylované CHO-CD11b/CD18 buňky nebylo důsledkem snížení množství integrinu CD11b/CD18 na povrchu buněk, inkubovali jsme vždy část buněk, které byly deglykosylovány, s anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 a stanovili jsme množství integrinu CD11b/CD18 na povrchu buněk pomocí průtokové cytometrie. **Obr. 43B** jasně ukazuje, že deglykosylace buněk neovlivnila množství integrinu na buněčném povrchu.

Podobné výsledky jako na buňkách CHO-CD11b/CD18 jsme získali i po deglykosylaci povrchového integrinu CD11b/CD18 buněk J774A.1 (**Obr. 43C**), myší makrofágové linie přirozeně produkující integrin CD11b/CD18 nebo primárních lidských neutrofilů izolovaných z čerstvé krve (**Obr. 43E**). Vazba CyaA byla snížena v případě použití PNGasy F na $6 \pm 4 \%$ pro deglykosylaci buněk J774A.1 a na $3 \pm 3 \%$ pro deglykosylaci lidských neutrofilů. Když byly buňky deglykosylovány působením EndoH, vazba CyaA poklesla na $14 \pm 4 \%$ pro buňky J774A.1, respektive na $15 \pm 3 \%$ v případě lidských neutrofilů a po inkubaci s neuraminidasou na $29 \pm 3 \%$ pro J774A.1 nebo $26 \pm 3 \%$ pro lidské neutrofilů. Stejně tak jako u buněk CHO-CD11b/CD18 i u lidských neutrofilů a buněčné linie J774A.1 jsme detekovali nezměněná množství integrinového receptoru na povrchu buněk pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 a průtokové cytometrie (**Obr. 43D, F**

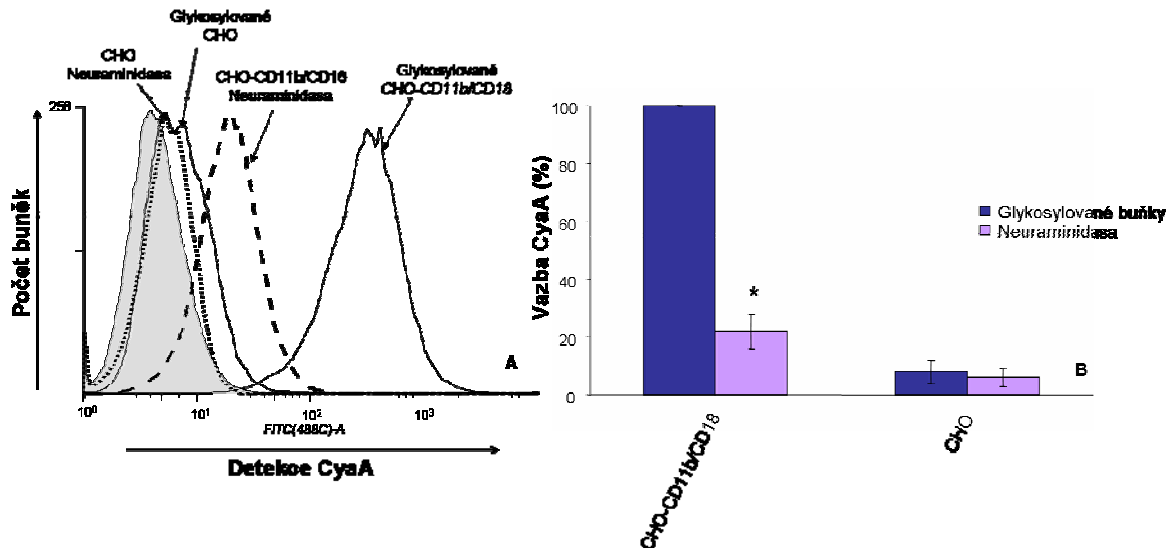
a H). Všechna tato data ukazují, že vazba CyaA na buňky produkující integrinový receptor CD11b/CD18 závisí na stupni jeho glykosylace.



Obr. 43: Vazba CyaA na enzymaticky deglykosylované buňky produkující integrin CD11b/CD18. Buňky CHO-CD11b/CD18 (A a B), J774A.1 (C a D) nebo lidské neutrofilny (E a F) byly inkubovány 30 minut při 4°C v HBSS pufru s inhibitory proteas a chlorpromazinem (5 µg/ml), inhibitorem na klatrinu závislé endocytosy. Poté byly inkubovány s jednotlivými glykosidasami PNGasou F, EndoH, neuraminidasou nebo pouze s HBSS pufrem jednu hodinu při 37°C. Buňky byly inkubovány dalších 30 minut při 4°C s 0,5 µg/ml CyaA/233FLAG nebo pouze s HBSS pufrem (šedá). Vazba toxinu na buněčný povrch byla stanovena pomocí průtokové cytometrie a detekována anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 (A, C, D a G). K detekci povrchového CD11b/CD18 byla použita

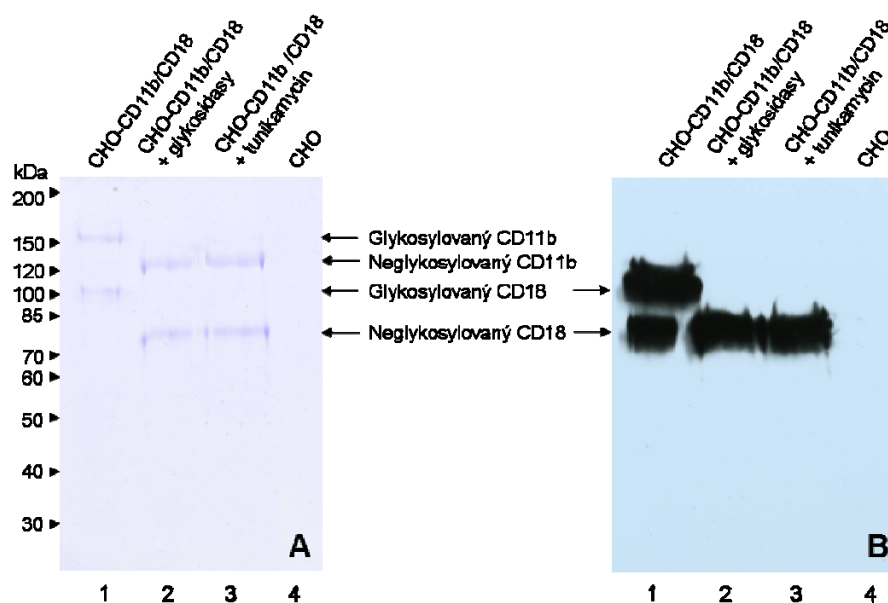
anti-CD11b monoklonální protilátka MEM174 a anti-myši protilátka konjugovaná s AlexaFluor488 (**B, D, F a H**). Ve všech případech jsou jako negativní kontrola použity buňky inkubované pouze s HBSS pufrem. Pozitivní kontrolou jsou buňky, které nebyly vystaveny působení glykosidas. Do grafu byl vynesena počet živých buněk proti logaritmu fluorescence AlexaFluor488. Výsledky ve sloupcovém grafu jsou vyjádřeny pro působení jednotlivých enzymů nebo tunikamycinu jako procento vazby vůči pozitivní kontrole, hodnoty představují průměr ze tří nezávislých pokusů \pm směrodatné odchylky (**G, H**). Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly (Studentův test, hodnota pravděpodobnosti $p < 0,0001$) mezi vazbou CyaA na deglykosylované nebo glykosylované buňky.

Výše uvedené výsledky ukázaly, že již po odstranění zbytku sialové kyseliny dochází ke snížení vazby CyaA na CHO buňky produkující integrin CD11b/CD18. Vzhledem k tomu, že na buněčném povrchu se vyskytuje mnoho oligosacharidových řetězců obsahujících zbytek sialové kyseliny, chtěli jsme tedy prokázat, že CyaA specificky rozpoznává zbytky kyseliny sialové v oligosacharidovém řetězci integrinu CD11b/CD18 a ne jiného glykoproteinu. Kontrolní netransfekované buňky CHO K1 nebo transfekovaná linie CHO-CD11b/CD18 byly inkubovány 1 hodinu při 37°C s neuraminidasou, nebo pouze s pufrem a poté s 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CyaA/233FLAG 30 minut při 4°C. Vazba toxinu na buněčný povrch byla sledována pomocí průtokové cytometrie a detekována anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 a anti-myši protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Z výsledků ukázaných na **Obr. 44** vyplývá, že CyaA rozpoznává zbytky sialové kyseliny v oligosacharidovém řetězci integrinu CD11b/CD18, protože vazba CyaA po odstranění zbytku kyseliny sialové byla významně snížena pouze v případě buněk transfekovaných geny pro CD11b/CD18.



Obr. 44: Vazba CyaA na buňky CHO-CD11b/CD18 nebo CHO K1 po odstranění zbytku kyseliny sialové. Buňky CHO K1 nebo CHO-CD11b/CD18 byly inkubovány 1 hodinu při 37°C s neuraminidasou nebo pouze s pufrem (glykosylované buňky) a poté s 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CyaA/233FLAG 30 minut při 4°C. Vazba toxinu na buněčný povrch byla sledována pomocí průtokové cytometrie a detekována anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 a anti-myši protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488. Do grafu byl vynesena počet živých buněk proti logaritmu detekované fluorescence AlexaFluor488 (**A**). Jako negativní kontrola byly použity buňky inkubované pouze s pufrem (šedá). Výsledky ve sloupcovém grafu jsou vyjádřeny jako procento vazby vůči pozitivní kontrole (glykosylované buňky), hodnoty představují průměr ze tří nezávislých pokusů \pm směrodatné odchylky (**B**). Hvězdičkou je označen statisticky významný rozdíl (Studentův test, hodnota pravděpodobnosti $p < 0,0001$) mezi vazbou CyaA na deglykosylované nebo glykosylované buňky.

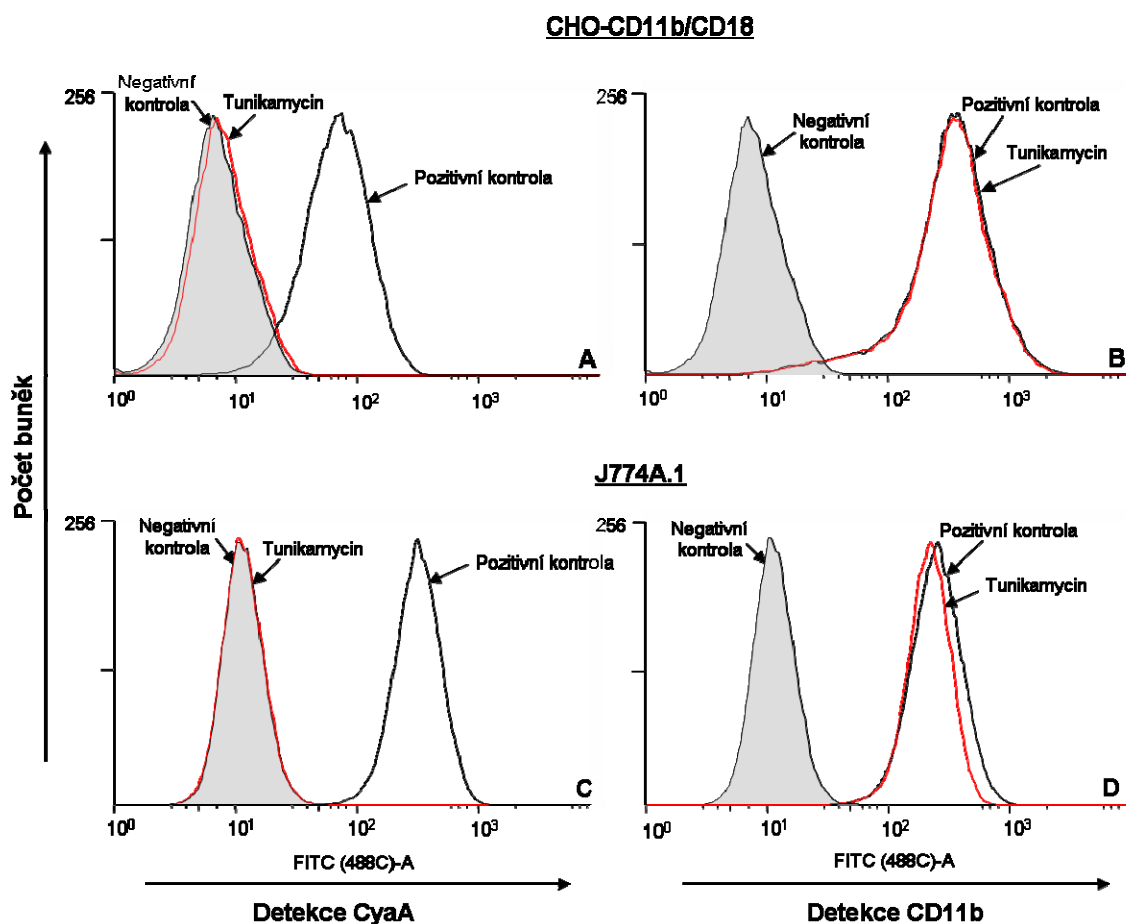
Bylo ovšem důležité ověřit účinnost deglykosylace a stabilitu nekovalentně asociovaného heterodimeru CD11b/CD18, proto jsme izolovali integrin CD11b/CD18 pomocí imunoprecipitace na agarosových kuličkách s navázanou anti-CD11b monoklonální protilátkou MEM174 z lysátů intaktních buněk CHO-CD11b/CD18 nebo těch, které byly inkubovány s glykosidasami. Získaný precipitát byl analysován pomocí SDS-PAGE. Jak ukazuje **Obr. 45A**, působení glykosidas bylo velmi účinné (kvantitativní), protože mobilita zaostřených proteinových proužků odpovídajícím integrinovým podjednotkám byla vyšší u proteinů izolovaných z buněk CHO-CD11b/CD18 inkubovaných s glykosidasami (dráha 2) ve srovnání s proteiny izolovanými z kontrolních glykosylovaných buněk (dráha 1). Tyto výsledky zároveň jasně demonstrují, že heterodimer CD11b/CD18 po deglykosylaci nedisociuje a zůstává stabilní, protože anti-CD11b monoklonální protilátka MEM174 byla schopna s podjednotkou CD11b imunoprecipitovat zároveň i navázanou podjednotku CD18, která byla detekována na Western blotu pomocí anti-CD18 monoklonální protilátky MEM48 (**Obr. 45B**).



Obr. 45: Imunoprecipitace integrinu CD11b/CD18. β_2 integrin byl imunoprecipitován z lysátu CHO-CD11b/CD18 buněk pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 kovalentně navázané na agarosových kuličkách. Po eluci byly vzorky analysovány pomocí SDS-PAGE (7,5%) a obarveny Coomassie blue (A), nebo byl proveden Western blot a vzorky byly detekovány anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 (B). Dráha 1: plně glykosylované buňky; dráha 2: buňky ošetřené glykosidasami; dráha 3: buňky inkubované s tunikamycinem; dráha 4: netransfekované CHO buňky, které byly v pokusu použity jako negativní kontrola.

Abychom potvrdili závislost vazby CyaA na stupni glykosylace receptoru CD11b/CD18, provedli jsme vazebné experimenty na buňkách CHO-CD11b/CD18 nebo J774A.1, u kterých byla tvorba N-glykosidické vazby na asparaginovém zbytku u nově syntetizovaných glykoproteinů inhibována pomocí inkubace s antibiotikem tunikamycinem o

koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ 24 hodin při 37°C. Jak je ukázáno na **Obr. 43G** a **Obr. 46**, inhibice N-glykosylace buněčných proteinů tunikamycinem způsobila téměř úplnou ztrátu vazby CyaA na buňky CHO-CD11b/CD18 ($8 \pm 5\%$) a J774A.1 ($6 \pm 5\%$). Abychom vyloučili ovlivnění produkce integrinu CD11b/CD18 na povrch buněk, byla část buněk opět testována na přítomnost CD11b na buněčném povrchu, nebyly však pozorovány žádné změny v množství detekovaného integrinu.



Obr. 46: Vazba CyaA na buňky produkující CD11b/CD18, které byly vystaveny působení tunikamycinu. Buňky CHO-CD11b/CD18 (A a B) nebo J774A.1 (C a D) byly inkubovány s tunikamycinem o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ 24 hodin při 37°C v růstovém mediu nebo pouze v růstovém mediu. 0,5 $\mu\text{g/ml}$ CyaA/233FLAG nebo pouze pufr byl přidán k buňkám a po 30 minutách inkubace na ledu byla detekována vazba toxinu anti-FLAG monoklonální protilátkou M2 a anti-myší protilátkou konjugovanou s AlexaFluor488 (A a C). Množství integrinu CD11b/CD18 bylo sledováno na buněčném povrchu pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 a anti-myší protilátky konjugované s AlexaFluor488 (B a D). Ve všech případech jsou jako negativní kontrola použity buňky inkubované pouze s pufr. Pozitivní kontrolou jsou buňky, které nebyly vystaveny působení tunikamycinu. Buňky byly analysovány průtokovou cytometrií a do grafu byl vyneseno počet živých buněk proti logaritmu fluorescence AlexaFluor488.

Účinnost deglykosylace pomocí tunikamycinu byla ověřena imunoprecipitací pomocí anti-CD11b monoklonální protilátky MEM174 a následnou detekcí anti-CD18 monoklonální protilátkou MEM48 na Western blotu. **Obr. 45A** ukazuje, že proteinové proužky odpovídající podjednotkám CD11b, respektive CD18, které byly izolovány z buněk inkubovaných s tunikamycinem (dráha 3), vykazují vyšší mobilitu ve srovnání s podjednotkami integrinu

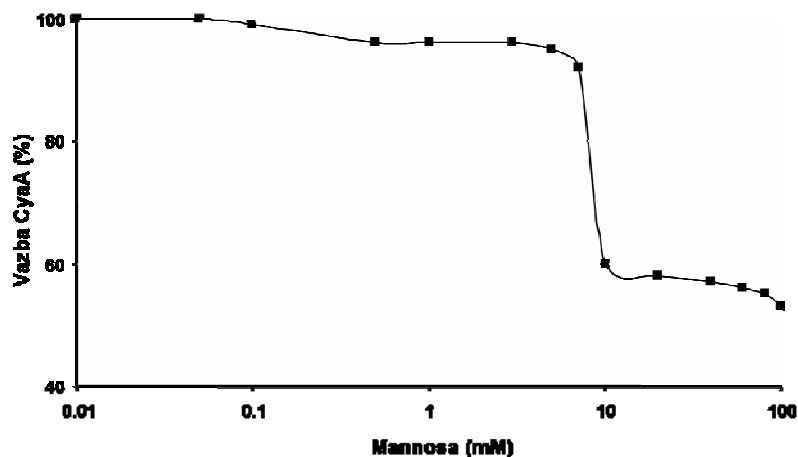
z buněk, které s tunikamycinem inkubovány nebyly (dráha 1). Navíc změna v mobilitě integrinových podjednotek, jejichž glykosylace byla inhibována tunikamycinem, byla stejná jako po deglykosylaci buněčných proteinů směsí glykosidas (**Obr. 45A**)

Tyto výsledky ukazují, že odstranění N-vázaných sacharidových řetězců integrinu CD11b/CD18 působením glykosidas nebo inhibicí jejich tvorby tunikamycinem bylo stejně účinné. Zatímco ale stabilita komplexu CD11b/CD18 nebyla po deglykosylaci ovlivněna, odstranění N-vázaných oligosacharidových řetězců vedlo k téměř úplné ztrátě vazby toxinu na buňky produkující integrin CD11b/CD18. Lze proto uzavřít, že vazba CyaA na receptor CD11b/CD18 zahrnuje, nebo přímo vyžaduje rozpoznání oligosacharidových řetězců receptoru toxinem.

6.3.2 SPECIFICKÉ VOLNÉ SACHARIDY SELEKTIVNĚ INHIBUJÍ VAZBU CyaA NA INTEGRINOVÝ RECEPTOR CD11b/CD18

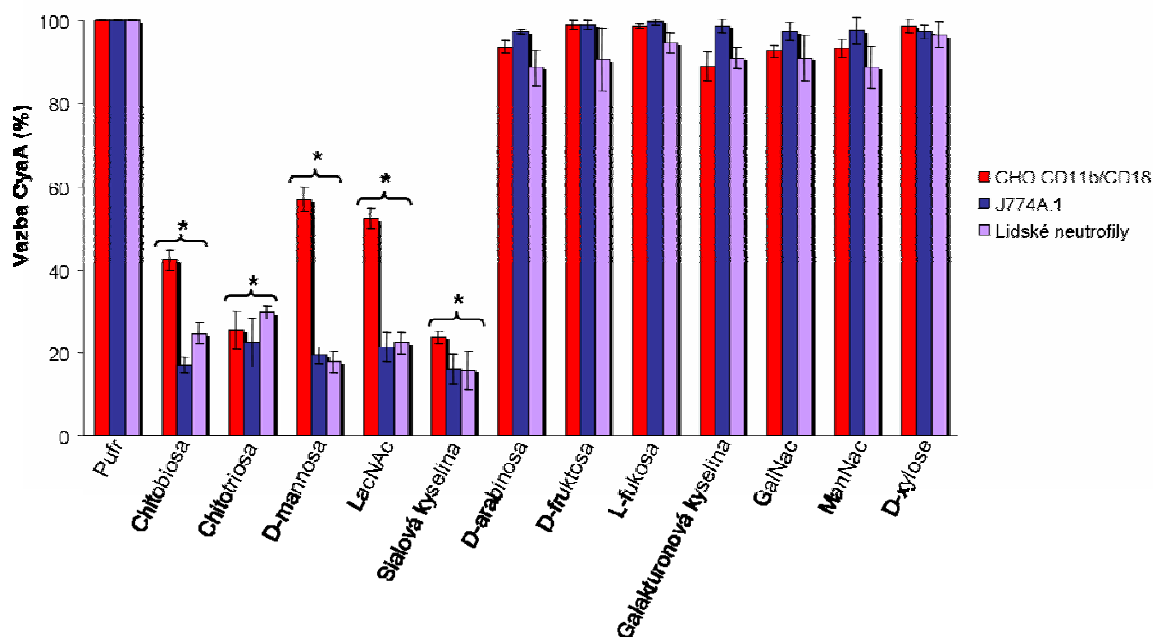
Abychom prověřili, zda CyaA specificky interaguje s cukernými zbytky N-vázaných oligosacharidových řetězců receptoru CD11b/CD18, analysovali jsme vazbu CyaA na buňky produkující CD11b/CD18 v přítomnosti volných sacharidů.

Pro inhibici vazby CyaA na CD11b/CD18 byly použity sacharidy obsažené v očekávaném N-vázaném oligosacharidovém komplexu – N,N'-diacetylchitobiosa, N,N',N'-triacetylchitotriosa, D-mannosa, N-acetylaktosamin a sialová kyselina (**Obr. 42**), ale také sacharidy, které v něm pravděpodobně obsaženy nejsou – D-arabiosa, D-fruktosa, L-fukosa, galakturonová kyselina, N-acetylgalaktosamin, N-acetylmannosamin a D-xylosa. Nejprve byla určena vhodná koncentrace volných sacharidů pro inhibici vazby CyaA. Různé koncentrace D-mannosy (od 10 μ M po 100 mM) byly inkubovány s CyaA/233FLAG (0,5 μ g/ml) 15 minut při 4°C. Po této době byla směs přidána k 1×10^6 CHO-CD11b/CD18 buňkám pro vazbu toxinu po dobu 30 minut při 4°C. Inhibice vazby CyaA k integrinu CD11b/CD18 byla pozorována již v přítomnosti 0,1 mM D-mannosy. V rozmezí koncentrací 7 mM až 10 mM stupeň inhibice prudce narůstal, až dosáhl 40 %. Další zvyšování koncentrace D-mannosy mělo už jen velmi malý efekt na inhibici vazby CyaA. Při nejvyšší testované koncentraci D-mannosy (100 mM) bylo dosaženo už pouze 47% inhibice vazby CyaA (**Obr. 47**). Proto byla ve všech dalších inhibičních pokusech použita 10 mM koncentrace volných sacharidů.



Obr. 47: Koncentrační závislost inhibice vazby CyaA na buňky produkující CD11b/CD18 D-mannosou. Různé koncentrace D-mannosy (10 μ M až 100 mM) byly smíchány s 0,5 μ g/ml CyaA/233FLAG a po 15 minutách inkubace na ledu byla tato směs přidána k suspenzi 1×10^6 CHO-CD11b/CD18 buněk. Buňky byly inkubovány 30 minut při 4°C a vazba CyaA na povrchový CD11b/CD18 byla detekována průtokovou cytometrií pomocí anti-FLAG monoklonální protilátky M2 a anti-myší protilátky konjugované s AlexaFluor488. Výsledky jsou vyjádřeny pro každou koncentraci D-mannosy jako procento vazby CyaA.

Za těchto podmínek rovněž N,N'-diacetylchitobiosa, N,N',N'-triacetylchitotriosa, N-acetylglukosamin a sialová kyselina účinně inhibovaly vazbu CyaA/223FLAG na buňky CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidské neutrofile, s podobnou účinností jako D-mannosa (**Obr. 48**). Na druhé straně přítomnost 10 mM D-arabiny, D-fruktosy, D-xylosy, L-fuktosy, galakturonové kyseliny, N-acetylgalaktosaminu a N-acetylmannosaminu nesnižovala vazbu CyaA na buňky CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidské neutrofile (**Obr. 48**). Tyto výsledky ukazují, že vazbu CyaA na integrin CD11b/CD18 je možno účinně a specificky inhibovat pouze sacharidy, které jsou obsaženy v N-vázaných oligosacharidových řetězcích integrinové molekuly. Inhibice vazby CyaA na buňky CHO-CD11b/CD18, J774A.1 a lidské neutrofile těmito sacharidy tedy ukazuje, že CyaA má schopnost vázat cukerné zbytky, rozeznává a váže se na N-glykosidicky vázaný oligosacharidový řetězec molekuly β_2 integrinu.

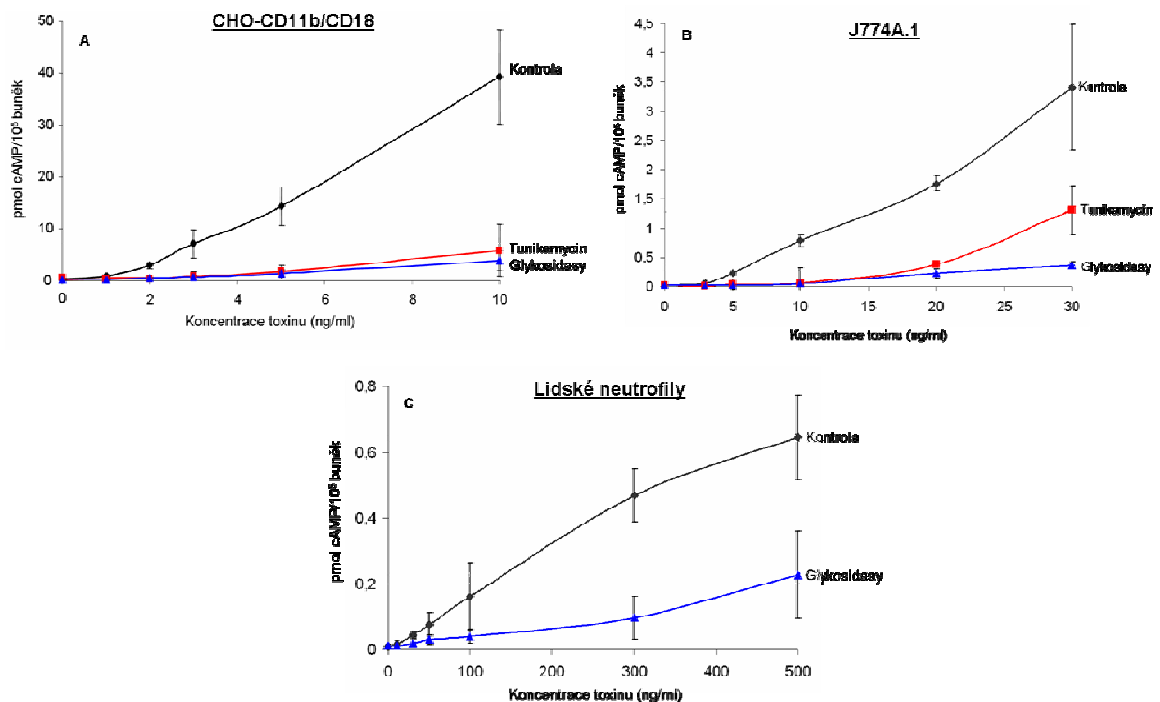


Obr. 48: Inhibice vazby CyaA k buňkám produkujícím integrin CD11b/CD18 volnými sacharidy. N,N'-diacetylchitobiosa, N,N',N'-triacetylchitotriosa, N-acetylglukosamin (LacNAc), sialová kyselina, D-mannosa, D-arabinosa, D-fruktosa, D-xyloza, L-fuktosa, galakturonová kyselina, N-acetylglukosamin (GalNAc), N-acetylmannosamin (ManNAc) o 10mM koncentraci nebo pouze pufr byly inkubovány 15 minut při 4°C s 0,5 µg/ml CyaA/233FLAG. Poté byla tato směs přidána k 1×10^6 suspenzi buněk CHO-CD11b/CD18 (červené), J774A.1 (modré) nebo lidským neutrofilům (fialové) a inkubována dalších 30 minut na ledu. Vazba CyaA byla detekována průtokovou cytometrií, jak bylo popsáno výše. Výsledky jsou vyjádřeny pro každý sacharid jako procento vazby vůči kontrole bez sacharidů, hodnoty představují průměr ze tří nezávislých pokusů \pm směrodatné odchylky. Hvězdičkou jsou označeny statisticky významné rozdíly (Studentův test, hodnota pravděpodobnosti $p < 0,0001$) mezi vazbou CyaA preinkubovaného se sacharidy nebo pouze s pufrům.

6.3.3 GLYKOSYLACE INTEGRINU CD11b/CD18 JE NEZBYTNÁ PRO CYTOTOXICKOU AKTIVITU CyaA NA BUŇKÁCH PRODUKUJÍCÍCH CD11b/CD18

Abychom ověřili fyziologický význam glykosylace CD11b/CD18 pro cytotoxickou aktivitu CyaA, stanovili jsme hladinu akumulace intracelulárního cAMP v deglykosylovaných buňkách po působení CyaA v porovnání s kontrolními glykosylovanými buňkami. Buňky CHO-CD11b/CD18, u kterých byla glykosylace proteinů inhibována tunikamycinem, byly inkubovány s různými koncentracemi CyaA/233FLAG po 30 minut při 37°C a poté u nich byly stanoveny koncentrace akumulovaného intracelulárního cAMP. Jak je vidět z **Obr. 49A**, v deglykosylovaných buňkách byla koncentrace intracelulárního cAMP snížena přibližně o jeden řád v porovnání s buňkami, které nebyly vystaveny působení tunikamycinu. Podobné snížení hladiny intracelulárního cAMP bylo pozorováno i po deglykosylaci buněk CHO-CD11b/CD18 směsí glykosidas (**Obr. 49A**). Srovnatelné výsledky jsme obdrželi i při měření hladiny cAMP v buňkách J774A.1 inkubovaných s tunikamycinem, a dále pak v lidských neutrofilech a J774A.1 buňkách inkubovaných se směsí glykosidas (**Obr. 49B a D**). Všechna tato data ukazují, že cytotoxická aktivita CyaA závisí na stavu glykosylace integrinového

receptoru CD11b/CD18. To je plně ve shodě s pozorováním, že glykosylace integrinového receptoru je nutná pro vazbu CyaA na buňky.

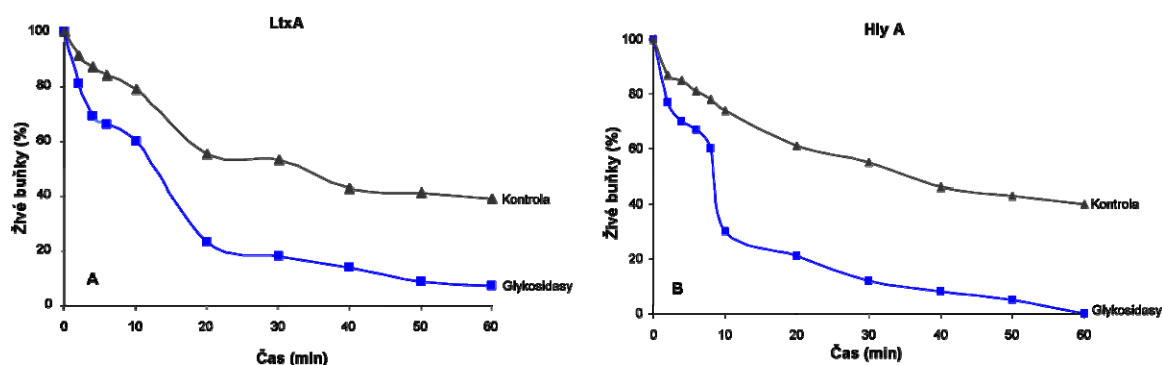


Obr. 49: Cytotoxická aktivita CyaA na deglykosylovaných buňkách produkujících integrin CD11b/CD18. Buňky CHO-CD11b/CD18 (A), J774A.1 (B) nebo lidské neutrofilů (C) byly vystaveny působení glykosidas, buňky CHO-CD11b/CD18 a J774A.1 navíc také působení tunikamycinu. Takto deglykosylované buňky (1×10^5 na zkušavku pro buňky CHO-CD11b/CD18 a J774A.1 nebo 2×10^5 na zkušavku pro lidské neutrofilů) byly inkubovány s různými koncentracemi CyaA/233FLAG po 30 minut při 37°C. Koncentrace intracelulárního cAMP byla stanovena pomocí metody ELISA²⁸⁷. Výsledky představují průměr ze dvou nezávislých pokusů \pm směrodatná odchylka.

6.3.4 ROVNĚŽ GLYKOSYLACE DALŠÍHO β_2 INTEGRINU CD11a/CD18 JE KLÍČOVÁ PRO CYTOTOXICKOU AKTIVITU LEUKOTOXINU (LtxA) A α -HEMOLYSINU (HlyA)

Abychom prověřili, zda je glykosylace β_2 integrinových receptorů důležitá také pro biologickou aktivitu jiných RTX toxinů, použili jsme leukotoxin (LtxA) bakterie *A. actinomycetemcomitans* a α -hemolysin (HlyA) bakterie *E. coli*. Oba toxiny, LtxA i HlyA, se váží k cílovým buňkám pomocí β_2 integrinu CD11a/CD18¹¹⁹. Jak již bylo dříve ukázáno, buňky Jurkat lze použít jako vhodný a citlivý model pro studium cytotoxického účinku jak LtxA tak HlyA^{119,129}. Intaktní buňky Jurkat nebo buňky deglykosylované působením směsi glykosidas PNGase F, EndoH a neuraminidasy byly inkubovány buď s kontrolním bakteriálním lysátem nebo lysátem, který obsahoval LtxA. Viabilita buněk pak byla sledována pomocí Trypanové modři. Tato metoda je založena na skutečnosti, že negativně nabitá Trypanová modř neproniká buněčnými membránami, pokud tyto nejsou poškozeny, např. působením toxinu. Jak ukazují výsledky na **Obr. 50A**, glykosylované buňky Jurkat vykazovaly prokazatelně vyšší citlivost k LtxA než deglykosylované buňky vystavené účinku

glykosidas. Působení LtxA po dobu 60 minut vedlo k usmrcení téměř všech glykosylovaných buněk, zatímco až 40% deglykosylovaných buněk přežilo působení LtxA za stejných podmínek. Velmi podobné výsledky jsme získali i po působení HlyA na buňky Jurkat (**Obr. 50B**). Z těchto výsledků vyplývá, že glykosylace CD11a/CD18 je nezbytná pro účinné cytotoxické působení LtxA a HlyA na buňky. Tyto výsledky také naznačují, že glykosylace β_2 integrinových receptorů hraje důležitou roli také v cytotoxické aktivitě jiných RTX proteinů než CyaA.



Obr. 50: Cytotoxická aktivita LtxA a HlyA na deglykosylovaných buňkách Jurkat. Buňky Jurkat, které na svém povrchu produkují integrin CD11a/CD18, byly inkubovány s glykosidasami nebo pouze s pufrům přes noc při 37°C. **A)** K buňkám byl přidán kontrolní bakteriální lysát nebo lysát obsahující LtxA. **B)** K buňkám bylo přidáno médium, ve kterém byla kultivována bakteriální kultura produkující HlyA nebo bakteriální kultura nesoucí pouze prázdný vektor. Po různé dlouhé inkubaci byla měřena viabilita buněk pomocí Trypanové modři.

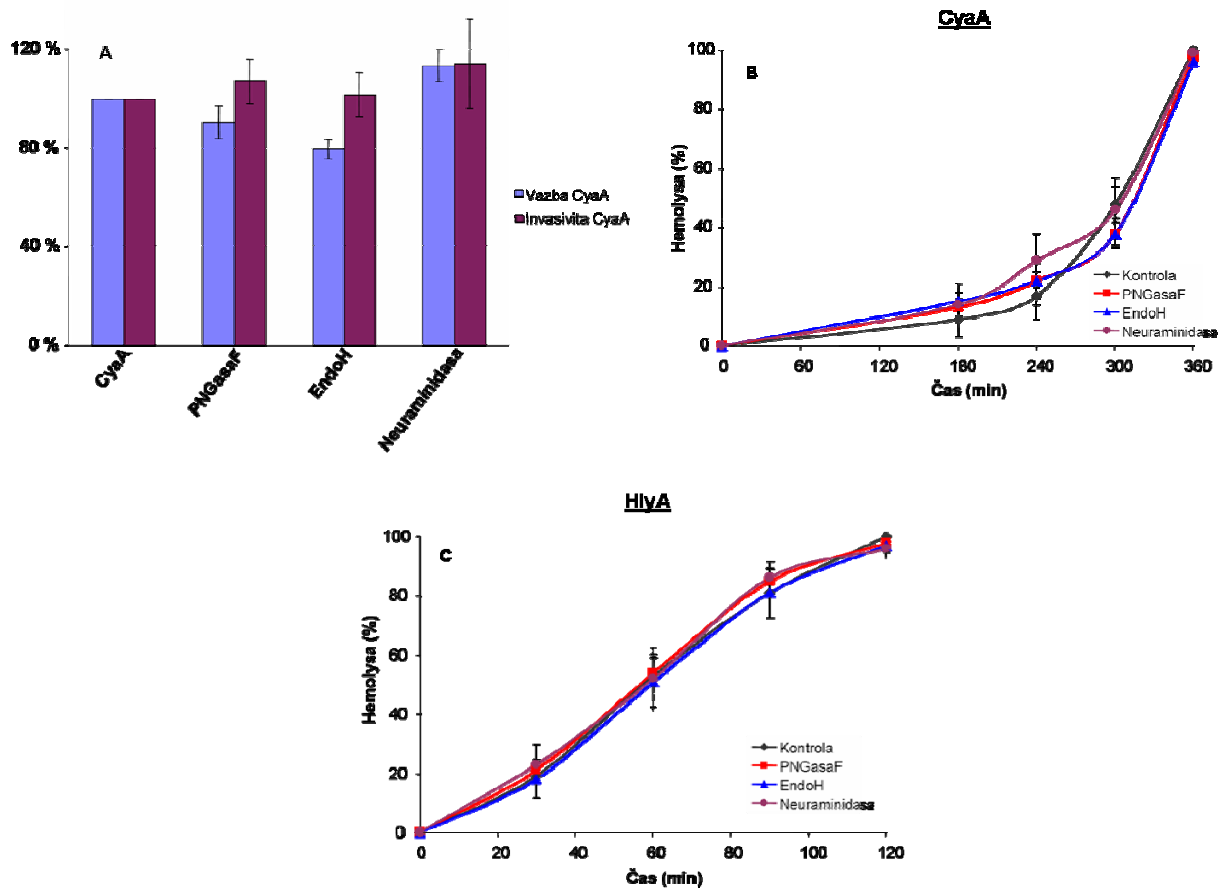
6.3.5 DEGLYKOSYLACE ERYTROCYTŮ NEMÁ VLIV NA VAZEBNOU, INVASIVNÍ A HEMOLYTICKOU AKTIVITU CyaA A HlyA

Výše uvedené výsledky jasně prokázaly, že CyaA rozeznává oligosacharidový řetězec integrinu CD11b/CD18. Chtěli jsme proto ověřit, zda interakce CyaA s buňkami, které neprodukuje CD11b/CD18 je také zprostředkována interakcí se sacharidy erytrocytárních glykoproteinů či glykolipidů.

Na beraních erytrocytech, které byly inkubovány 60 minut při 37°C s glykosidasami PNGasou F, EndoH a neuraminidasou nebo pouze s TNC pufrům, byla testována vazebná, invazivní a hemolytická aktivita CyaA a hemolytická aktivita HlyA. **Vazebná aktivita** byla stanovena jako množství AC aktivity vázané na membránu beraních erytrocytech. **Invasivní aktivita** byla stanovena jako množství AC aktivity translokované do cytosolu erytrocytů a takto chráněné proti rozštěpení extracelulárně přidaným trypsinem, což odpovídá schopnosti toxinu translokovat svou adenylát cykloasovou doménu do cytosolu buněk. **Hemolytická aktivita** byla měřena jako množství uvolněného hemoglobinu po inkubaci CyaA nebo HlyA s erytrocyty a vyjadřuje schopnost těchto toxinů vytvářet v membráně erytrocytů kationt-

selektivní iontové póry a tím způsobovat jejich koloidně-osmotickou lysi. Získané hodnoty byly vyjádřeny jako procento aktivity toxinů na intaktních beraních erythrocytech.

Obr. 51 ukazuje, že deglykosylace erythrocytů nijak neovlivnila vazebnou, invasivní a hemolytickou aktivitu CyaA a HlyA. Tento výsledek naznačuje, že CyaA ani HlyA se na erythrocyty neváží prostřednictvím N-vázaných oligosacharidových řetězců erythrocytárních glykoproteinů.



Obr. 51: Vliv deglykosylace erythrocytů na vazebnou, invasivní a hemolytickou aktivitu CyaA a HlyA. Beraní erythrocyty byly inkubovány s glykosidasami PNGasou F, EndoH a neuraminidasou nebo pouze s TNC pufrem. **A)** K erythrocytům bylo přidáno 0,5 µg/ml CyaA a po 30 minutách v 37°C byla stanovena vazebná a invasivní aktivita CyaA. **B)** K erythrocytům byl přidán CyaA (10 µg/ml) nebo pouze TUC pufř. Po různě dlouhé inkubaci ve 37°C byla stanovena hemolytická aktivita CyaA měřením absorbance uvolněného hemoglobinu. **C)** K buňkám bylo přidáno 10 µl media, ve kterém byla kultivována bakteriální kultura produkující HlyA nebo bakteriální kultura nesoucí pouze prázdný vektor. Po různě dlouhé inkubaci ve 37°C byla stanovena hemolytická aktivita HlyA.

6.4 IMUNOLOGICKÉ VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU MYKOBAKTERIÁLNÍCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

Všechny výsledky prezentované v této kapitole, vyjma přípravy a purifikace volného antigenu TB10.4 a toxoidů CyaA-TB10.4, byly získány ve spolupracující laboratoři Prof. C. Leclerc (Pasteurův ústav, Francie).

6.4.1 KONSTRUKCE REKOMBINANTNÍCH PROTEINŮ A TOXOIDŮ CyaA

Bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, která způsobuje tuberkulózu, je jedním z nejrozšířenějších lidských patogenů. Odhaduje se, že 2 miliardy lidí jsou infikovány a ročně propukne tuberkulóza u 10 milionů lidí a 3 miliony případů končí smrtí. Současná vakcína BCG (*Bacillus Calmete-Guerin*) proti tuberkulóze není dostatečně účinná, a proto zůstává hlavním cílem v boji proti této chorobě vývoj nové, bezpečné a účinné vakcíny pro přeočkování dospělých. Do tohoto výzkumu byla zapojena i naše laboratoř projektem na vývoj fúzního CyaA s vloženým mykobakteriálním epitopem jako bezbuněčné vakcíny proti tuberkulóze ve spolupráci s laboratoři Dr. C. Leclerc a Dr. R. Brosche z Pasteurova institutu v Paříži.

Připravené rekombinantní CyaA toxoidy, které obsahují protein TB10.4 nebo jeho epitopy vložené v katalytické doméně v pozicích 233 a 336 jsou uvedeny v **Tab. 7**. Výsledné plasmidy byly vytvořeny insercí syntetického oligonukleotidu nebo PCR produktu kódujícího TB10.4 epitopy nebo celý antigen do unikátního restrikčního místa BsrG I v plasmidu pT7CACT1-BsrG I²⁹¹. Všechny připravené expresní plasmidy byly systematicky kontrolovány DNA sekvenováním, aby se předešlo nežádoucím mutacím.

Tab. 7: Použité rekombinantní CyaA toxoidy.

CyaA toxoid	Insert TB10.4		Přesahující sekvence epitopu TB10.4 ^a	Pozice OVA coitopu ^b
	Fragment	Pozice		
CyaA-TB10.4:1-96-OVA	1-96	233	EATGG ²³² VRVPRRRRKSL-TB10.4-SLRRRRYVH ²³³ LDRER	108
		336	KEYIG ³³⁵ VRVPRRRRKSL-TB10.4-SLRRRRYVH ³³⁶ QQRGE	108
CyaA-TB10.4:15-30-OVA	15-33	233	EATGG ²³² VR-AGDMAGYAGTLQSLGAEIA-VH ²³³ LDRER	108
		336	KEYIG ³³⁵ VR-AGDMAGYAGTLQSLGAEIA-VH ³³⁶ QQRGE	108
CyaA-TB10.4:20-28-OVA	20-28	233	EATGG ²³² VR-GYAGTLQSL-VH ²³³ LDRER	108
		336	KEYIG ³³⁵ VR-GYAGTLQSL-VH ³³⁶ QQRGE	108
CyaA-TB10.4:18-30-OVA	18-30	233	EATGG ²³² VR-MAGYAGTLQSLGA-VH ²³³ LDRER	108
		336	KEYIG ³³⁵ VR-MAGYAGTLQSLGA-VH ³³⁶ QQRGE	108
CyaA-OVA:257-264				224
CyaA				

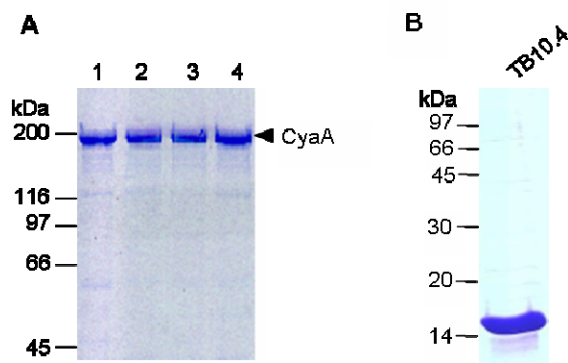
^a Vložené inserty do CyaA se skládají buď z celého polypeptidu TB10.4 (AK 1-96) nebo z jednotlivých epitopů odvozených od proteinu TB10.4, jejichž plná sekvence je podtržená. Přesahující sekvence je označena tučně a horním indexem pak pozice, do které byl insert vložen.

^b OVA epitop obsahuje aminokyselinové zbytky 257-264, které kódují sekvenci SIINFEKL

Pro přípravu CyaA toxoidu, který nesl celý antigen TB10.4, bylo nutné nejprve vložit do místa BsrG I syntetický adaptor, který nesl zásahové místo pro restriční endonukleasu Hind III. Již dříve bylo ukázáno, že elektrostatický náboj vloženého peptidu je kritický pro translokaci AC domény přes plasmatickou membránu a negativní náboj tuto schopnost velmi snižuje¹⁹⁶. Vkládaný antigen TB10.4 nese negativní náboj, a proto syntetický adaptor obsahoval sekvenci, která kódovala osm pozitivních argininových zbytků (VPRRRRKSL/SLRRRRY).

Oligonukleotidy, které kódovaly vložené epitopy, byly navrženy tak, aby (i) obsahovaly restriční místo pro unikátní endonukleasu k rychlé identifikaci vloženého oligonukleotidu, (ii) po inzerci zrušily restriční místo použité pro vložení epitopu a (iii) obsahovaly STOP kodon, který v případě obrácené orientace inzertu neumožnil jeho další přepis a dal tak vzniknout zkrácené formě proteinu. Pro účinné sledování dopravy AC domény s vloženými antigeny pro presentaci na molekulách MHC I byly CyaA konstrukty označeny insercí OVA:257-264 CD8⁺ T buněčným epitopem (*H-2K^b*) v pozici 108 nebo 224 v katalytické doméně CyaA. Všechny vytvořené CyaA fúzní proteiny byly geneticky detoxifikované odstraněním jejich katalytické adenylát cyklusové aktivity, což bylo provedeno vložem dipeptidu mezi aminokyselinové zbytky 188 a 189, který zrušil vazebné místo pro ATP¹⁹⁹. Takto detoxifikované CyaA toxoidy a také kontrolní CyaA byly produkovány v buňkách *E. coli* XL-1 blue a purifikovány z inkluzních tělísek dvoukrokovou chromatografií (**Obr. 52A**).

Jako kontrolní proteiny byly využívány volné antigeny/peptidy Ag85A²⁹², ESAT-6²⁹³, které byly použity již v dřívějších studiích. Další kontrolou byl volný protein TB10.4, který byl produkován v expresním vektoru pET28b. Do restričního místa pro enzym BsrG I v expresním vektoru pET28b-BsrG I byl nejprve vložen syntetický adaptor nesoucí zásahové místo pro Hind III, do kterého byl vložen PCR fragment kódující protein TB10.4 Antigen TB10.4 byl produkován v buňkách *E. coli* BL21 (λ DE3) a purifikován z inkluzních tělísek afinitní chromatografií na Ni-NTA agarose (**Obr. 52B**).



Obr. 52: Elektroforetická analýza výsledných purifikovaných proteinů. Alikvoty proteinů po všech purifikačních krocích byly děleny pomocí SDS-PAGE a gel byl barven Coomassie Blue. **A)** 7,5 % SDS-PAGE purifikovaných rekombinantních toxoidů CyaA. V drahách 1-4 jsou purifikované CyaA: 1. CyaA-TB10.4:1-96-OVA (pozice 336); 2. CyaA-TB10.4:1-96-OVA (pozice 233); 3. CyaA-TB10.4:18-30-OVA (pozice 336); 4. CyaA-TB10.4:18-30-OVA (pozice 233). Bylo naneseno 1-2 μg toxinu. **B)** 15 % SDS-PAGE purifikovaného antigenu TB10.4.

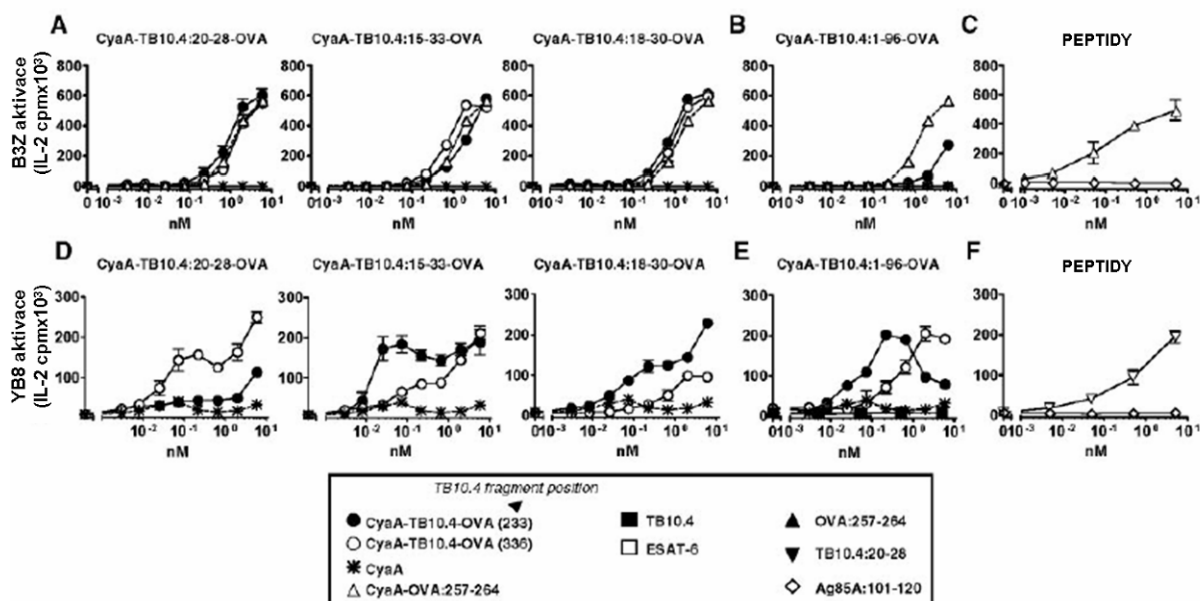
6.4.2 CyaA ÚČINNĚ DOPRAVUJE T-BUNĚČNÝ EPITOP TB10.4:20-28 PRO PREZENTACI NA MOLEKULÁCH MHC I

Již dříve bylo ukázáno, že CyaA bakterie *B. pertussis* je vhodným nereplikativním invazivním vektorem pro dopravu antigenů intracelulárních patogenů. AC doména je schopna pojmout cizorodé antigeny až o délce 200 aminokyselinových zbytků a dopravit je do dráhy pro prezentaci jak na molekulách MHC I, tak MHC II^{151,190-192,200,201}. Námi používaný CD8⁺ T-buněčný epitop TB10.4:20-28 (haplotyp *H-2K^d*) je společný pro proteiny TB10.4 a TB10.3²⁸⁹. CD8⁺ T-buňky z BCG imunizovaných nebo *M. tuberculosis* infikovaných myší produkovaly cytokin IL-2, pokud byly kultivovány spolu s *H-2^d* BM-DC (bone marrow-derived dendritic cell) stimulovanými peptidem TB10.4:20-28, které slouží jako antigen prezentující buňky (APC). To poukazuje na fakt, že epitop TB10.4:20-28 byl přirozeně zpracován a prezentován na molekulách MHC I v BCG a *M. tuberculosis* infikovaných myších²⁸⁹.

Nejprve byl proveden *in vitro* test pro prezentaci OVA epitopu k ověření, zda inserce TB10.4 epitopu do AC domény CyaA neovlivnila dopravu reportérového OVA:257-264 epitopu. Různé rekombinantní CyaA toxoidy byly inkubovány s BM-DC z myší C57BL/6 a buňkami B3Z hybridomové linie specifické pro OVA:257-264 epitop. Doprava epitopu OVA:257-264 byla ve všech případech srovnatelná, ať už CyaA nesl tento epitop v pozici 108 a v pozici 233 nebo 336 epitop TB10.4:20-28, TB10.4:15-33 nebo TB10.4:18-30 nebo pouze OVA epitop v pozici 224 (**Obr. 53A**). Avšak vložení antigenu TB10.4:1-96 do pozice 336 vedlo ke ztrátě stimulace buněk B3Z epitopem OVA (**Obr. 53B**).

Podobný *in vitro* test byl proveden pro studium prezentace CD8⁺ T-buněčného epitopu TB10.4:20-28 (*H-2K^d*). Rekombinantní fúzní toxoidy CyaA byly inkubovány s BM-DC

z BALB/c myši a buňkami YB8 hybridomové linie, která je specifická pro epitop TB10.4:20-28²⁸⁹. Téměř všechny CyaA toxoidy nesoucí různé TB10.4 fragmenty stimulovaly YB8 buněčnou linii se stejnou či vyšší účinností než samotný minimální epitop TB10.4:20-28 (**Obr. 53D-F**). Inserce epitopů v pozici 233 vedla k účinnější antigenní prezentaci než inserce v pozici 336, s výjimkou CyaA-TB10.4:20-28-OVA. CyaA obsahující celý antigen TB10.4 byl schopen dopravovat epitop TB10.4:20-28 se shodnou účinností jako CyaA nesoucí minimální epitop TB10.4:20-28 (**Obr. 53D a E**). Přestože tedy CyaA toxoidy nesoucí celý protein TB10.4 účinně dopravují epitop TB10.4:20-28, nejsou schopny dopravovat epitop OVA:257-264 vložený v pozici 108. To může být způsobeno kompeticí o vazebné místo na molekulách MHC I mezi *H-2^b* CD8⁺ T-buněčným epitopem proteinu TB10.4 a OVA:257-264 epitopem. Dalším možným vysvětlením by mohla být nižší účinnost zpracování oblasti okolo pozice 108 v AC doméně způsobená konformační změnou po vložení celého proteinu TB10.4 do pozice 233 nebo 336. Prezentace minimálního epitopu TB10.4:20-28 je závislá na interakci CyaA s BM-DC, protože samotný rekombinantní protein TB10.4 není schopen buňky YB8 stimulovat (**Obr. 53E**). Specifita antigenní prezentace byla potvrzena *in vitro* testem s kontrolním CyaA (**Obr. 53A, B, D, E**) nebo kontrolním volným peptidem Ag85A:101-120 (**Obr. 53C, F**), žádný z těchto proteinů totiž nebyl schopen aktivace YB8 buněčné hybridomové linie. Na základě získaných výsledků byl pro pokusy *in vivo* vybrán konstrukt CyaA-TB10.4:15-33-OVA (pozice 233), který vykazoval nejvyšší účinnost dopravy CD8⁺ T-buněčného epitopu TB10.4 (**Obr. 53D**). Vzhledem k tomu, že rekombinantní CyaA toxoid obsahující v pozici 233 celý antigen TB10.4 (CyaA-TB10.4:1-96-OVA) by mohl být vhodným kandidátem pro vakcínu proti *M. tuberculosis*, byl také zvolen k testování *in vivo*.



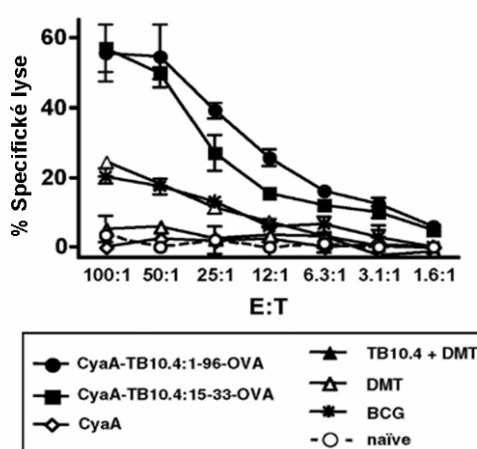
Obr. 53: Prezentace T-buněčného epitopu CyaA na molekulách MHC I. A-C) Buňky BM-DC z myši C57BL/6 byly inkubovány 4 hodiny s různými koncentracemi toxoidů CyaA-TB nebo s kontrolním CyaA a CyaA-OVA:257-264 (pozice 224) (A, B), dále pak s kontrolními peptidy OVA:257-264 a Ag85A:101-120 (C). Poté byly buňky promyty, kultivovány 18 hodin spolu s buněčnou linií B3Z a následně byla testována prezentace OVA epitopu. D-F) Buňky BM-DC z myši BALB/c a CD8⁺ T-buněčná hybridomová linie YB8 specifická pro TB10.4:20-28 byly kultivovány spolu s rekombinantními toxoidy CyaA-TB (D, E), kontrolními purifikovanými proteiny TB10.4 a ESAT-6 (E) nebo kontrolními peptidy TB10.4:20-28 a Ag85A:101-120 (F) a poté byla sledována prezentace TB10.4:20-28 epitopu. Míra aktivace buněčných linií B3Z a YB3 byla stanovena měřením množství IL-2 v supernatantu testem CTLL-2. Výsledky jsou vyjádřeny jako cpm zabudovaného [³H]-tymidinu. Výsledky byly získány ze čtyř až pěti pokusů.

6.4.3 IMUNIZACE CyaA-TB10.4 INDUKUJE SILNOU TB10.4:20-28 SPECIFICKOU CTL ODPOVĚĚ

Myši kmene BALB/c byly imunizovány intravenosně (i.v.) jednou dávkou obsahující 50 µg rekombinantního CyaA-TB10.4:15-33-OVA (pozice 233) nebo CyaA-TB10.4:1-96-OVA (pozice 233) v PBS. Ačkoli byl zvolen imunizační protokol, který byl již úspěšně použit pro indukci CTL odpovědi proti některým CD8⁺ T-buněčným epitopům vloženým do CyaA, např. OVA:257-264²⁹⁴ nebo HPV16-E7²⁹⁵, žádný z použitých CyaA toxoidů po jedné dávce i.v. neindukoval anti-TB10.4:20-28 CTL odpověď. Imunizace myši C57BL/6 podle stejného protokolu těmito toxoidy však vedla k účinné indukci OVA:257-264 specifické odpovědi.

Bylo ukázáno, že pro indukci odpovědi proti slabým CD8⁺ T-buněčným epitopům jsou zapotřebí dvě dávky CyaA vektoru intraperitoneálně (i.p.) v přítomnosti adjuvans alum (hydroxid hlinitý). BALB/c myši tedy byly imunizovány i.p. 50 µg CyaATB10.4:1-96-OVA nebo CyaATB10.4:15-33-OVA v alum, shodnou dávkou obdržely ještě 15. den po první imunizaci. Jako kontroly byly použity myši imunizované BCG v PBS (jedna dávka s.c., 10⁶ CFU/myš), 10 µg proteinu TB10.4 v DMT (**d**imethyl-dioktadecyl-ammonium-bromid (DDA), **m**onofosforyl-lipid A (MPL), **t**rehalosa-dikoryno-mykolát (TDM)) (jedna dávka s.c.), kontrolním CyaA (dvě injekce i.p. v alum) nebo samotným adjuvans DMT (jedna dávka s.c.).

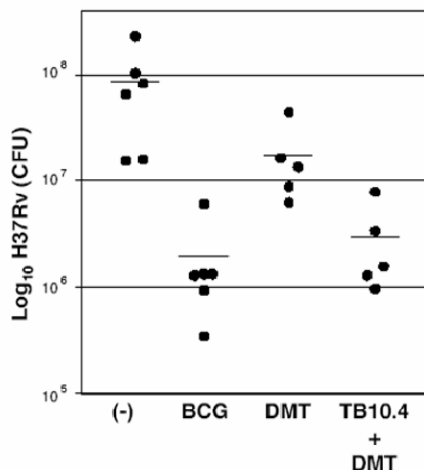
Obr. 54 ukazuje, že rekombinantní CyaA-TB10.4 indukovaly silnou a specifickou CTL odpověď. Oba toxoidy CyaA-TB10.4:1-96-OVA i CyaA-TB10.4:15-33-OVA vykazovaly podobnou účinnost při vyvolání CTL odpovědi. Dokonce i volný antigen TB10.4, pokud byl podáván v DMT adjuvans, indukoval nízkou, ale reprodukovatelnou CTL odpověď, která byla srovnatelná s CTL odpovědí vyvolanou BCG (**Obr. 54**). Z testovaných imunizačních strategií nejlépe indukovala TB10.4 specifickou CTL odpověď ta, která byla založena na rekombinantních CyaA-TB10.4. Pokud byly myši imunizovány kontrolním CyaA nebo pouze adjuvans, nebyla pozorována žádná CTL aktivita, čímž byla potvrzena specifita pozorované CTL odpovědi (**Obr. 54**).



Obr. 54: Srovnání TB10.4:20-28 specifické CTL odpovědi indukované BCG, proteinem TB10.4 v DMT nebo toxoidy CyaA-TB10.4. BALB/c myši byly imunizovány jednou dávkou BCG (s.c., 10^6 CFU), proteinem TB10.4 v DMT a samotným DMT adjuvans nebo dvěma i.p dávkami 50 μ g CyaA-TB10.4:1-96-OVA (pozice 233), CyaA-TB10.4:15-33-OVA (pozice 233) a kontrolním CyaA v alum (v 0. a 15. den). Slezinné buňky z naivních a imunizovaných myši byly 21 dní po imunizaci in vitro stimulovány peptidem TB10.4:20-28 (10 μ g/ml) po dobu 5 dnů. CTL aktivita byla stanovena pomocí ^{51}Cr . Výsledky byly získány ze tří pokusů (tři myši ve skupině)

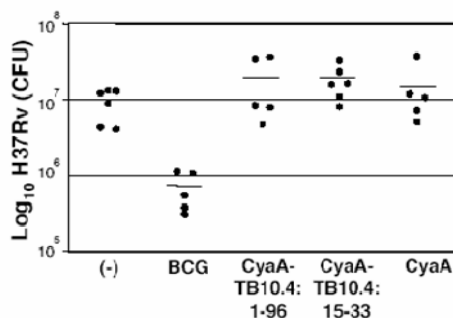
6.4.4 OCHRANNÉ SCHOPNOSTI PODJEDNOTKOVÉ VAKCÍNY PROTI *M. TUBERCULOSIS* ZALOŽENÉ NA REKOMBINANTNÍM PROTEINU TB10.4 NEBO CyaA-TB10.4:1-96-OVA

Vzhledem k silné imunogenicitě proteinu TB10.4 bylo třeba stanovit, zda dokáže vakcinace antigenem TB10.4 poskytnout myším BALB/c dostatečnou ochranu proti následné infekci bakterií *M. tuberculosis*. Na počátku byla myším podána dávka BCG (s.c., 1×10^6 CFU/myš) nebo 15. den protein TB10.4 v DMT (10 μ g/myš). Myši byly infikovány nízkou dávkou *M. tuberculosis* H37Rv v aerosolu 30. den po imunizaci. Plicní skóre infikovaných myši a hodnota CFU byly stanoveny jeden měsíc po infekci (**Obr. 55**). Vakcinace BCG vedla ke snížení hodnoty CFU o jeden řád v porovnání s neimunizovanými myšmi. Imunizace proteinem TB10.4 v DMT poskytla myším jistou ochranu proti infekci *M. tuberculosis* ($p < 0,005$), nicméně přesto nebyla tak účinná jako po vakcinaci BCG ($p < 0,003$). Je zajímavé, že i samotné adjuvans DMT poskytovalo malý stupeň ochrany ($p < 0,018$).



Obr. 55: Ochranné schopnosti proteinu TB10.4 proti infekci *M. tuberculosis*. Myši BALB/c byly imunizovány BCG, proteinem TB10.4 v DMT nebo samotným DMT, jako kontrola byly použity neimunizované myši. Dávka BCG (10^6 CFU, s.c.) byla podána na počátku, zatímco dávka TB10.4 ($10 \mu\text{g}$, s.c.) až 15. den. Myši byly infikovány nízkou dávkou *M. tuberculosis* H37Rv (≈ 100 CFU/myš) v aerosolu 30. den po imunizaci. Plicní skóre infikovaných myši bylo stanoveno měřením CFU měsíc po infekci. Rozdíly v plicním skóre myši neimunizovaných a imunizovaných BCG nebo TB10.4 byly statisticky významné ($p < 0,0032$, respektive $p < 0,0050$). Výsledky jsou vyjádřeny dvěma nezávislými pokusy.

Byla také testována potenciální ochrana myši BALB/c proti infekci *M. tuberculosis* navozená toxoidy CyaA-TB10.4:1-96-OVA a CyaA-TB10.4:15-33-OVA. Negativní kontrolou byly neimunizované myši a pozitivní myši imunizované BCG (s.c.) na počátku pokusu. První a patnáctý den byly myši imunizovány (i.p.) CyaA-TB10.4:1-96-OVA nebo CyaA-TB10.4:15-33-OVA v alum. Infekce nízkou dávkou *M. tuberculosis* H37Rv v aerosolu byla provedena 30 dní po imunizaci. Plicní skóre infikovaných myši bylo stanoveno jeden měsíc po infekci (**Obr. 56**). Překvapivě ani CyaA-TB10.4:15-33-OVA, který je schopen indukovat CD8^+ CTL odpověď, ani CyaA-TB10.4:1-96-OVA, který indukuje jak CD8^+ CTL tak CD4^+ $\text{T}_\text{H}1$ odpověď, nenavodily významnou ochranu proti *M. tuberculosis* v porovnání s negativní kontrolou.



Obr. 56: Ochranné schopnosti toxoidů CyaA-TB10.4:1-96-OVA a CyaA-TB10.4:15-33-OVA proti infekci *M. tuberculosis*. Myši BALB/c byly imunizovány BCG nebo CyaA-TB10.4:1-96-OVA, CyaA-TB10.4:15-33-OVA a kontrolním CyaA v alum. Dávka BCG (10^6 CFU, s.c.) byla podána v 0. den, kdežto dvě dávky CyaA (i.p., $50 \mu\text{g}/\text{myš}$) byly podány v 0. a 15. den. Myši byly infikovány nízkou dávkou *M. tuberculosis* H37Rv (≈ 100 CFU/myš) v aerosolu 30. den po imunizaci. Plicní skóre infikovaných myši bylo stanoveno měřením CFU měsíc po infekci. Výsledky jsou vyjádřeny dvěma nezávislými pokusy.

7 DISKUSE

7.1 PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18

Integrin CD11b/CD18 byl v nedávné době identifikován jako specifický buněčný receptor pro CyaA. Bylo ukázáno, že CyaA se váže k CD11b podjednotce receptoru², ale nebyla určena přesná poloha vazebného místa, což je velmi důležité pro objasnění mechanismu interakce CyaA a pro analýsu mechanismu jeho průniku do buněk. Cílem projektu, jehož součástí je předkládaná práce, byla produkce podjednotek CD11b a CD18 a jejich částí v eukaryotním systému hmyzích buněk a zmapování polohy vazebného místa pro CyaA. Dalším cílem byla produkce podjednotky CD11b v prokaryotním systému *E. coli* pro přípravu protilátky proti této podjednotce.

Pro produkci podjednotky CD11b v prokaryotním systému jsme se rozhodli, protože produkce v buňkách *E. coli* vykazuje většinou větší výtěžky než produkce v eukaryotním systému a je časově méně náročná. Bylo ukázáno, že lze produkovat extracelulární domény integrinu $\alpha_v\beta_3$ současně ze společného plasmidu s prokaryotním signálním peptidem do periplasmatického prostoru *E. coli* jako nerozpustné proteiny²⁹⁶, a dále, že tímto způsobem lze připravit domény podjednotek CD11b a CD18 pro funkční studie²⁹⁷. Nicméně v podmínkách naší laboratoře se nám do periplasmatického prostoru bakterie *E. coli* nepodařilo produkovat ani samostatné podjednotky CD11b nebo CD18.

Pro přípravu protilátky proti CD11b jsme se rozhodli produkovat jen zkrácenou formu podjednotky CD11b - pouze extracelulární doménu bez signálního peptidu fúзованou s N- i C-koncovou histidinovou kotvou. Extracelulární doménu jsme získali jako nerozpustný protein a zvýšit rozpustnost se nám bohužel nepodařilo ani produkci při nižších teplotách a to při 30°C nebo 25°C.

Při izolaci proteinu CD11b jsme ukázali, že extracelulární doména CD11b je asociována s membránou. To je dáno pravděpodobně díky přítomnosti několika hydrofobních zbytků na konci proteinu nebo případně díky polymeraci S-S můstků. Extracelulární doména CD11b obsažená v membránové frakci však vykazovala pouze velmi nízkou afinitu k Ni-NTA agarose při purifikaci afinitní chromatografií. Po rozdělení extracelulární domény podjednotky CD11b na čtyři přibližně stejně velké fragmenty, které byly opatřeny N- i C-koncovou histidinovou kotvou, jsme získali nerozpustné proteiny. Žádný z nich nebyl asociován s membránou a purifikace afinitní

chromatografií byla vysoce účinná. Zdá se tedy, že nízká účinnost purifikace celé extracelulární domény CD11b afinitní chromatografií byla dána asociací s membránou polymerací přes S-S můstky. Nízká účinnost purifikace by mohla být dána interakcí N- i C-koncové histidinové kotvy s proteiny membrány. Dalším možným vysvětlením je, že mohlo dojít k částečné renaturaci podjednotky a N- i C-konce, které nesly histidinovou kotvu, byly díky tomu nedostupné.

Izolace dostatečného množství čistého integrinu CD11b/CD18 pro funkční a strukturní studie z buněk, které tento integrin přirozeně produkují, je spojeno s celou řadou problémů, např. obtížná izolace dostatečného množství buněk produkujících integrin CD11b/CD18 a purifikace funkčního integrinu z těchto buněk. Rozhodli jsme se, že se pokusíme rekombinantní integrin CD11b/CD18 produkovat v eukaryotním expresním systému. Bylo ukázáno, že extracelulární domény integrinů $\alpha_V\beta_6^{298}$, $\alpha_{IIb}\beta_3^{299}$, $\alpha_V\beta_5^{300}$ nebo $\alpha_4\beta_5^{301}$ lze produkovat v savčích nebo hmyzích buňkách jako sekretované proteiny. Ve všech případech tvořily extracelulární domény stabilní heterodimery i bez přítomnosti transmembránové a cytosolické části, zároveň si také zachovaly své vlastnosti ve vazbě ligandů.

Pro produkci integrinu CD11b/CD18 v eukaryotních buňkách jsme vybrali expresní systém založený na S2 buňkách *Drosophila melanogaster*, který spojuje nejlepší vlastnosti jak savčích, tak hmyzích expresních systémů. Je známo, že hmyzí buňky produkují proteiny s eukaryotickou posttranslační modifikací, ale poskytují rozdílnou glykosylaci - N-glykosylace je vysokomannosového typu. Nicméně i přes rozdíly v glykosylaci byly již dříve v hmyzích buňkách produkovány extracelulární domény různých integrinů²⁹⁸⁻³⁰¹ nebo fragmenty podjednotek CD11b a CD11c^{238,302} a nebyly pozorovány žádné změny ve struktuře či afinitě k ligandům.

Ukázali jsme, že v S2 buňkách lze velmi dobře produkovat podjednotku CD18 a to jako transmembránový protein i jako protein, který je sekretován do media. Nicméně podjednotku CD11b se nám nepodařilo úspěšně produkovat ani samostatně ani v komplexu s podjednotkou CD18 a dokonce ani jako sekretovaný protein. K lepší produkci integrinového komplexu CD11b/CD18 nepomohla ani transfekce podjednotky CD11b do S2 buněk, které již produkovaly podjednotku CD18. S2 buňky sice produkovaly malé množství CD11b, ale analýsou průtokovou cytometrií při různém značení podjednotek CD11b a CD18 jsme ukázali, že netvoří heterodimer.

Zdá se tedy, že tvorba funkčního heterodimerního komplexu integrinu CD11b/CD18 je pro S2 buňky toxická a nebo vyžaduje funkci nějakého specifického

chaperonu, který těmto buňkám chybí. Mohlo by to být dáno tím, že tvorba a vystavení integrinového komplexu CD11b/CD18 na buněčném povrchu spouští jisté signalizační dráhy v buňce, které pro ni nejsou přirozené. Následně se pak pasážírováním vyselektují pouze buňky, které eliminovaly tvorbu komplexu CD11b/CD18 a jeho vystavení na buněčném povrchu.

Nejbližším cílem tedy bude produkce integrinu CD11b/CD18 a jeho extracelulární části v buňkách CHO a následně studium interakcí mezi CyaA a CD11b/CD18.

7.2 ANALYSA INTERAKCE RTX TOXINŮ S β_2 INTEGRINY – ROLE GLYKOSYLACE RECEPTORŮ VE VAZBĚ RTX TOXINŮ

V několika různých studiích bylo ukázáno, že glykosylace integrinové molekuly hraje důležitou roli v interakci ligand-integrin. Například deglykosylace integrinu $\alpha_5\beta_1$ směsí různých glykosidas nebo působením tunikamycinu vedla ke ztrátě vazby jeho ligandu fibronektinu³⁰³. Podobně odstranění oligosacharidového řetězce z molekuly integrinu $\alpha_6\beta_1$ vedlo ke snížení vazby lamininu³⁰⁴. Nedávno také bylo ukázáno, že je N-glykosylace integrinu $\alpha_2\beta_1$ nezbytná pro interakci s cytotoxinem subtylasou, kterou exprimuje Stx produkující (Shiga like toxin) enterohaemorrhagická *E. coli*³⁰⁵. Abychom objasnili roli oligosacharidového řetězce β_2 integrinu CD11b/CD18 při interakci s CyaA, testovali jsme efekt deglykosylace CD11b/CD18 produkujících buněk pomocí PNGasy F, EndoH, neuraminidasy popřípadě tunikamycinu na vazbu CyaA. Snížení vazby CyaA jsme pozorovali již po odstranění koncové sialové kyseliny z povrchu glykoproteinů působením neuraminidasy. Po úplném odstranění celého oligosacharidového řetězce působením PNGasy F ztratil integrin CD11b/CD18 schopnost vázat CyaA. Úplná ztráta vazby CyaA byla také pozorována po zablokování tvorby N-glykosylace CD11b/CD18 *de novo* tunikamycinem. Zároveň jsme také prokázali, že glykosylace hraje nezastupitelnou roli v cytotoxických účincích CyaA.

Předchozí pozorování prokázala, že glykosylace integrinových podjednotek je důležitá nejenom pro optimální vazbu ligandů, ale i pro stabilitu integrinů a jejich vystavení na buněčný povrch. Například deglykosylace integrinu $\alpha_5\beta_1$ specifickými glykosidasami vedla k disociaci na jednotlivé podjednotky α a β a zároveň jeho vystavení na povrchu buněk bylo sníženo po inkubaci s tunikamycinem³⁰³. Nicméně naše výsledky jasně prokazují, že vystavení integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu nebylo nijak významně ovlivněno ani deglykosylací specifickými

glykosidasami ani po inhibici tvorby N-glykosylace tunikamycinem. Také imunoprecipitace jasně prokázala, že N-glykosylace podjednotek není nezbytná pro tvorbu stabilního heterodimeru podjednotek CD11b/CD18. Obě podjednotky CD11b i CD18 byly totiž imunoprecipitovány ve stejném molárním poměru z lysátů buněk produkujících CD11b/CD18, ať byly či nebyly tyto inkubovány s glykosidasami nebo tunikamycinem.

Pozorování, že deglykosylace integrinu CD11b/CD18 nevede ani k rozpadu heterodimeru na samostatné podjednotky, ani k ovlivnění vystavení integrinu na buněčném povrchu a snížení vazby monoklonální protilátky specifické proti CD11b, nás vedlo k závěru, že deglykosylace integrinu CD11b/CD18 nevyvolává žádnou podstatnou změnu v konformaci podjednotek CD11b/CD18. Proto je také nepravděpodobné, že ke ztrátě vazby CyaA došlo kvůli ztrátě schopnosti rozpoznat polypeptidový řetězec integrinového receptoru. Nejpravděpodobnější interpretace námi dosažených výsledků je tedy taková, že počáteční interakce CyaA s integrinovým receptorem CD11b/CD18 zahrnuje přímé rozpoznání oligosacharidových řetězců receptoru. Tuto hypotézu silně podporuje zejména pozorování, že vazba CyaA na integrinový receptor je specificky a účinně inhibována přítomností volných sacharidů, které tvoří stavební bloky oligosacharidových řetězců vázaných k integrinu CD11b/CD18. Tyto výsledky tedy ukazují, že CyaA má slabou lektinovou aktivitu. Navíc se zdá, že toxin nejprve interaguje s periferním zbytkem kyseliny sialové na integrinovém povrchu, protože po odstranění koncového negativně nabitého zbytku sialové kyseliny neuraminidasou vazba CyaA k buňkám produkujícím CD11b/CD18 výrazně poklesla (téměř pětkrát). Avšak působení neuraminidasy na netransfekované CHO buňky postrádající CD11b/CD18 mělo zanedbatelný účinek na vazbu CyaA. To naznačuje, že CyaA nejprve specificky rozpoznává terminální zbytek kyseliny sialové integrinu CD11b/CD18. Tento kontakt CyaA s kyselinou sialovou by mohl být závislý na elektrostatických interakcích. Již dříve jsme ukázali, že nejdůležitější oblast CyaA zodpovědná za vazbu na integrin CD11b/CD18 je situována v repetitivní doméně bohaté na glycinové a aspartátové zbytky, konkrétně mezi aminokyselinové zbytky 1166 – 1281¹⁵⁹. Negativně nabitě aspartátové nebo glutamátové zbytky, které v RTX doméně váží dvojmocné ionty vápníku, jsou neutralizovány asi 40 vápenatými ionty navázanými v RTX doméně. Pozitivně nabitě zbytky argininu a lysinu v integrin vazebné oblasti CyaA proto mohou být přístupné pro interakci se zbytkem periferní sialové kyseliny. Nicméně CyaA interaguje také s ostatními sacharidy obsaženými

v oligosacharidovém komplexu na povrchu integrinového receptoru (s chitobiosovým jádrem, mannosovým jádrem a také s N-acetyllaktosaminem) a přítomnost tohoto komplexu je nezbytná pro účinnou vazbu CyaA na integrin CD11b/CD18. Kompletní deglykosylace molekuly CD11b/CD18 totiž vede k naprosté ztrátě vazby CyaA a tato vazba je kromě sialové kyseliny inhibována i dalšími sacharidy z oligosacharidového řetězce CD11b/CD18.

Schopnost CyaA vázat se na oligosacharidové struktury nabízí možné vysvětlení pro již dříve pozorovanou vazbu CyaA na širokou škálu eukaryotních buněk postrádajících receptor CD11b/CD18. Jako nejdůležitější molekuly pro vazbu CyaA na těchto buňkách se jeví gangliosidy, neboť preinkubace toxinu s gangliosidy a následné přidání k cílovým buňkám inhibuje tvorbu intracelulárního cAMP katalysovanou CyaA³. Již dříve bylo ukázáno, že gangliosidy nebo globosidy slouží jako zásahové molekuly pro některé bakteriální toxiny. Například verotoxin-1 a Shiga like toxin bakterie *E. coli* se váže na globotriaosylceramid Gb3^{306,307}. Dalším příkladem jsou cholera toxin bakterie *Vibrio cholerae* a tepelně labilní toxin bakterie *E. coli*, které rozeznávají sacharidový řetězec gangliosidu GM1, zejména pak koncový disacharid – N-acetyllaktosamin³⁰⁸. Gangliosidy jsou kyselé glykolipidy složené z ceramidu, na který je navázán oligosacharidový řetězec obsahující jeden nebo více zbytků kyseliny sialové. CyaA by tudíž mohl rozeznávat oligosacharidovou část gangliosidu zahrnující negativně nabitě zbytky sialové kyseliny podobně jako rozeznává oligosacharidový řetězec integrinu CD11b/CD18. Zatímco vazba CyaA na buňky produkující CD11b/CD18 je vysoce účinná, závislá na dávce a satureovatelná, vazba na buňky bez receptoru vykazuje pouze nízkou účinnost a afinitu a je nesatureovatelná². To naznačuje, že po prvotní interakci s oligosacharidovým řetězcem jsou polypeptidové podjednotky integrinu CD11b/CD18 nezbytné pro vysokou afinitu vazby toxinu k cílovým buňkám.

Nicméně, námi provedené pokusy na beraních erythrocytech pro tuto teorii o mechanismech vazby CyaA na buňky bez receptoru CD11b/CD18 neposkytly dostatečné argumenty. Červené krvinky byly inkubovány s jednotlivými glykosidasami a poté s CyaA. Na takto opracovaných erythrocytech byla měřena vazebná, invazivní a hemolytická aktivita CyaA v porovnání s erythrocyty, které zůstaly intaktní. Nezjistili jsme žádný vliv deglykosylace erythrocytů na vazbu CyaA. To ale může být způsobeno například značnými rozdíly v glykosylaci mezi živočišnými druhy, ale i mezi jedinci stejného druhu²²⁹. Zvláště červené krvinky se mohou lišit v obsahu a druhu sialové kyseliny na povrchu buněk. Námi použitá neuraminidasa hydrolyzuje α -(2→3), α

(2→6) a α (2→8) glykosidické vazby mezi zbytkem sialové kyseliny a galaktosy. Rozdílná vazba sialové kyseliny, popřípadě vazba na jiný sacharidový zbytek než galaktosu rovněž mohla být příčinnou toho, že nedošlo k účinnému odštěpení zbytku kyseliny sialové. V takovém případě by nemohl být pozorován žádný efekt odstranění sialové kyseliny na vazebnou, invazivní a hemolytickou aktivitu CyaA. Nicméně, naše pozorování jsou v souladu s již dříve získanými výsledky, kdy odstranění glykoproteinů z buněčného povrchu erytrocytů pomocí štěpení trypsinem nemělo žádný vliv na vazebnou, invazivní či hemolytickou aktivitu CyaA¹⁸¹.

Nedávno bylo ukázáno, že se další tři toxiny z RTX rodiny, LtxA *A. actinomycetemcomitans*, HlyA *E. coli* a LktA *P. haemolytica*, specificky váží k receptoru CD11a/CD18 na povrchu cílových buněk^{119,309}. Proto jsme ověřovali význam glykosylace integrinu CD11a/CD18 pro cytotoxickou aktivitu LtxA a HlyA. Ukázali jsme, že po deglykosylaci buněk Jurkat, které na svém povrchu vystavují receptor CD11a/CD18, významně poklesne citlivost těchto buněk k cytotoxickému působení těchto toxinů. Přestože se tedy CyaA není schopen vázat na CD11a/CD18 a ani LtxA a HlyA nerozeznávají integrin CD11b/CD18, hrají zřejmě oligosacharidové řetězce obou β_2 integrinů rozhodující úlohu při prvním kontaktu těchto tří RTX toxinů s příslušným integrinovým receptorem. Po této první interakci pak přebírají hlavní roli polypeptidové řetězce CD11a nebo CD11b podjednotek, které jsou zodpovědné za specifickou a vysoce účinnou vazbu LtxA, HlyA a CyaA k cílovým buňkám.

Zjištění, že glykosylace integrinu CD11b/CD18 je kritická pro vazbu adenylát cyklosového toxinu *B. pertussis* na buňky produkující tento receptor, stejně jako je glykosylace nutná pro vazbu dalších RTX toxinů na CD11a/CD18, přináší důležitý nový pohled na mechanismus interakce RTX proteinů s β_2 integriny.

7.3 IMUNOLOGICKÉ VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU MYKOBAKTERIÁLNÍCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

Nedávno bylo ukázáno, že detoxifikovaný CyaA nesoucí různé epitopy virů nebo nádorových buněk může sloužit jako invazivní nereplikativní nosič pro dopravu těchto epitopů do cytosolu antigen prezentujících buněk¹⁷¹. To umožňuje prezentaci těchto epitopů prostřednictvím molekul MHC I a následnou indukci cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytů^{6,7}. V molekule CyaA byla identifikována permisivní místa, do kterých je možné vložit i celý antigen^{191,192,287}. Zároveň byl v nedávné době identifikován specifický buněčný receptor pro CyaA, integrin CD11b/CD18, který se

nachází na povrchu antigen prezentujících buněk². Kromě toho bylo ukázáno, že po vazbě na receptor je komplex CyaA-CD11b/CD18 zčásti endocytován²⁹⁰. To naznačuje, že CyaA by mohl být využit také jako nosič pro dopravu imunodominantních epitopů do endosomu a pro prezentaci epitopů prostřednictvím molekul MHC II a tím indukcí CD4⁺ T-lymfocytů²⁰⁰. Tyto výsledky poskytují široké možnosti použití CyaA jako univerzálního nereplikativního nosiče pro dopravu antigenů intracelulárních patogenů nebo nádorů k prezentaci na dendritických buňkách za účelem indukce buněčných imunitních odpovědí T-lymfocytů.

Použití rekombinantních CyaA proti klasické vakcinaci nabízí několik výhod. Klasické vakcíny jsou získávány z celobuněčných extraktů patogenů, jenž nejsou zcela definovány. Podle některých studií jsou dokonce označovány za rizikový faktor, který může být jednou z příčin současného masivního nárůstu alergických onemocnění. Z těchto důvodů dnes ve světě převládá snaha vyvíjet bezpečnější rekombinantní, bezbuněčné a podjednotkové vakcíny, což jsou chemická individua s přesně definovaným a kontrolovatelným složením. Druhá stránka použití rekombinantního CyaA jako nosiče pro dopravu cizorodých antigenů je možná ještě zajímavější. Jak bylo již popsáno výše, klasické vakcíny jsou zaměřeny především na vyvolání protilátkové imunitní odpovědi a jsou účinné proti bakteriím a virům (obecně nazývaným antigeny) nacházejícím se v extracelulárním prostředí organismu. Jedná se o imunitu zajišťovanou B-lymfocyty, jež produkují protilátky do extracelulárního prostředí, kde interagují s epitopy příslušných antigenů, které mohou být následnými reakcemi odstraněny. V případě rekombinantního CyaA je však výrazně posilována buněčná imunitní odpověď, zajišťovaná cytotoxickými CD8⁺ a pomocnými CD4⁺ T-lymfocyty³¹⁰, což je odpověď důležitá pro rozeznávání a následné zničení buněk napadených bakteriemi a viry, nebo nádorových buněk. Třetí stránkou použití CyaA pro vakcinaci je stránka ekonomická. Je nasnadě, že namísto několika klasických vakcín by bylo výhodnější podání jedné širokospektrální vakcíny. Naším úkolem bylo tedy ověřit, zda lze k účinné imunizaci proti *M. tuberculosis* použít detoxifikovaný, rekombinantní CyaA s vloženým TB10.4 antigenem.

V této práci jsme porovnávali protektivní vlastnosti antigenu TB10.4 podaného v DMT adjuvans (směs DDA, MPL a TDM) s toxoidem CyaA-TB10.4, který se váže na integrin CD11b/CD18. K testování, zda je CyaA vhodným nosičem pro vakcínu proti infekci *M. tuberculosis*, jsme zkonstruovali několik různých detoxifikovaných fúzních proteinů CyaA, které obsahovaly celý protein TB10.4 nebo pouze jeho části zahrnující

CD8⁺ T-buněčný epitop TB10.4:20-28. Tyto proteiny a peptidy byly geneticky vloženy do dvou permisivních míst v AC doméně (posice 233 a 336). Šest z osmi zkonstruovaných CyaA toxoidů bylo schopno *in vitro* dopravit epitop TB10.4:20-28 pro prezentaci na molekulách MHC I s vyšší nebo srovnatelnou účinností jako minimální epitop TB10.4:20-28. Všechny toxoidy s vloženým epitopem v posici 233, s výjimkou CyaA-TB10.4:20-28-OVA, dopravovaly antigen a prezentovaly jej s vyšší účinností než v pozici 336. Je zajímavé, že CyaA fúzovaný s celým proteinem TB10.4 dopravuje CD8⁺ T-buněčný epitop TB10.4:20-28 stejně účinně jako CyaA obsahující pouze minimální epitop TB10.4:20-28 nebo tento epitop s přirozenou přesahující sekvencí. Avšak purifikovaný protein TB10.4 není schopen prezentace na molekulách MHC I. Schopnost CyaA dopravovat epitop TB10.4:20-28 do dráhy pro prezentaci na MHC I molekulách *in vitro*, byla potvrzena i pokusy *in vivo*. Imunizace myši toxoidem CyaA nesoucím celý protein TB10.4 nebo pouze jeho fragment TB10.4:15-33 vedla k navození účinné TB10.4 specifické CTL odpovědi. Přesto však byly zapotřebí dvě dávky rekombinantního CyaA v přítomnosti alum.

Kromě CD8⁺ T-buněčné odpovědi jsme také srovnávali CD4⁺ T-buněčnou odpověď vyvolanou podáním proteinu TB10.4 v DMT adjuvans nebo toxoidem CyaA-TB10.4:1-96-OVA v alum. Pokud jsme použili peptid TB10.4:74-88, který obsahuje H-2^d CD4⁺ T-buněčný epitop, byly oba proteiny schopny stimulovat specifickou T_H1 CD4⁺ T-buněčnou odpověď. Nicméně TB10.4:74-88 specifických T-buněk bylo po podání proteinu TB10.4 v DMT značně více než po imunizaci toxoidem CyaA-TB10.4:1-96-OVA v alum, přesto však bylo toto množství čtyřikrát nižší než po BCG imunizaci. Nehledě na to, že imunizace proteinem TB10.4 v DMT vyvolává vysoce polyklonální T-buněčnou odpověď, ale CD4⁺ T-buněčná odpověď po podání toxoidu CyaA-TB10.4:1-96-OVA je specifická pouze pro epitop TB10.4:74-88. Zajímavé také je, že specifita T-buněčné odpovědi vyvolané imunizací proteinem TB10.4 v DMT je srovnatelná se specifitou T-buněčné odpovědi po BCG vakcinaci. Je také nutné poznamenat, že tato silná polyklonální CD4⁺ T-buněčná odpověď byla navozena již po podání jediné dávky proteinu TB10.4 v DMT.

Dále byly testovány protektivní vlastnosti proti infekci *M. tuberculosis* proteinu TB10.4 podanému v DMT a toxoidu CyaA v alum, který obsahoval buď celý antigen TB10.4 nebo pouze jeho CD8⁺ T-buněčný epitop. Avšak pouze imunizace proteinem TB10.4 poskytovala jistou ochranu. Tato data tudíž potvrdila již dříve pozorovanou skutečnost, že imunizace myši proteinem TB10.4 v adjuvans složeném z DDA a MPL

poskytuje významnou ochranu proti infekci *M. tuberculosis*³¹¹. To tedy předurčuje antigen TB10.4 jako vhodného kandidáta pro podjednotkovou vakcínu proti *M. tuberculosis*. Dosud bylo identifikováno pouze několik málo antigenů, které poskytují protektivní imunitu proti *M. tuberculosis*^{214,312}. BCG vakcinace neposkytuje dospělým jedincům dostatečnou ochranu proti plicní formě onemocnění, ačkoli v dětství poskytuje odpovídající imunitu proti rozšířeným formám tuberkulózy. Protein TB10.4 je produkován i BCG, proto by přeočkování tímto antigenem mohlo zvýšit poskytovanou ochranu.

Imunitní odpověď proti *M. tuberculosis* je velmi komplexní a zahrnuje společné působení CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů, ale i buněk vrozené imunity jako jsou např. NK buňky. CD4⁺ T-buňky jsou primárně důležité v obraně proti *M. tuberculosis*³¹³⁻³¹⁷ a zejména se pak uplatňuje jejich produkce IFN- γ ³¹⁸. Jisté spory však existují kolem role CD8⁺ T-lymfocytů. Některé studie považují CD8⁺ T-buňky při obraně proti *M. tuberculosis* za důležité, ale jiné mají zato, že nejsou zapotřebí³¹⁹. Ochrana proti infekci *M. tuberculosis* však nebyla pozorována po imunizaci CyaA-TB10.4:15-33-OVA, který je schopen indukovat CD8⁺ CTL odpověď. Ještě více překvapivé bylo zjištění, že ani imunizace toxoidem CyaA-TB10.4:1-96-OVA, který vyvolává jak CD8⁺, tak T_H1 CD4⁺ T-buněčnou odpověď, neposkytuje ochranu proti tuberkulóze. Tento fakt by mohl být vysvětlen malým množstvím TB10.4 specifických T_H1 buněk indukovaných těmito imunogeny. V našem modelu jsme také pozorovali souvislost mezi poskytovanou ochranou a počtem TB10.4 specifických T-buněk a jejich schopností produkovat různé hladiny IFN- γ .

Naše výsledky také upozorňují na důležitost spuštění adekvátní odpovědi imunitního systému, který zabezpečí plně protektivní imunitní odpověď proti *M. tuberculosis*. Podjednotková vakcína potřebuje účinné adjuvans a nosič, které vyvolají příslušnou imunitní odpověď. Málokdy jsou totiž vysoce purifikované antigeny také vysoce imunogenní. Další důležité omezení těchto vakcín je založeno na tom, že rozpustný antigen je jen zřídka dopravěn pro prezentaci na molekulách MHC I, a proto také nejsou aktivovány CD8⁺ T-buňky. Adjuvans, které jsou v současné době schválena pro použití na lidech (alum a MF59), indukují T_H2 polarizovanou imunitní odpověď a nepodporují protektivní odpověď proti *M. tuberculosis*^{210,320,321}. Lepší porozumění aktivace imunitního systému v odpovědi na invasi patogenů vedlo k objevení nových adjuvans.

Prokázali jsme, že CyaA může *in vivo* indukovat obě T_H1 i CTL odpověď a to jak v nepřítomnosti adjuvans tak dokonce i při podání s T_H2 adjuvans jako je alum. Po vyloučení možnosti, že za imunogenicitu CyaA jsou zodpovědné dendritické buňky nepřímo aktivované CD4⁺ T-buňkami, se ukázalo, že CTL odpověď je indukována i po podání CyaA myším, které postrádají MHC II (MHC II^{-/-}). Kromě dopravy antigenů do dendritických buněk může tedy CyaA také indukovat přirozený obranný systém a podporovat tak vyvolání adaptivní imunitní odpovědi. Nicméně ani tyto imunomodulační signály v myších modelech v kombinaci s proteiny jako TB10.4, ESAT-6 nebo Ag85A nejsou dostačující k vyvolání protektivní odpovědi proti *M. tuberculosis*. Nicméně navzdory těmto omezením zůstává CyaA, díky své schopnosti dopravovat antigeny do dendritických buněk a aktivovat jak CD4⁺ tak CD8⁺ T-buněčnou odpověď, slibným kandidátem pro vývoj vakcíny proti tuberkulóze.

8 ZÁVĚRY

PRODUKCE INTEGRINU CD11b/CD18

EXPRESSE A PURIFIKACE PODJEDNOTKY CD11b PRO PŘÍPRAVU PROTILÁTEK VHODNÝCH K DETEKCI METODOU WESTERN BLOT

- Byly produkovány a purifikovány čtyři části podjednotky CD11b pro přípravu protilátky, které byly použity pro imunizaci myši a přípravu specifických protilátek.

EXPRESSE INTEGRINU CD11b/CD18 V S2 BUŇKÁCH - HMYZÍM EXPRESNÍM SYSTÉMU

- Bylo ukázáno, že přestože byla detekována nízká hladina intracelulární exprese podjednotky CD11b, tak S2 buňky nejsou schopny účinně transportovat tuto podjednotku na svůj povrch nebo sekretovat její extracelulární doménu do média. A to ani v případě, že je opatřena signálním peptidem specifickým pro tyto buňky. Dále bylo prokázáno, že použití plasmidů pro konstitutivní nebo indukibilní expresi proteinů nemá vliv na hladinu exprese podjednotky CD18.

ANALÝSA INTERAKCE RTX TOXINŮ S β_2 INTEGRINY – ROLE GLYKOSYLACE RECEPTORŮ VE VAZBĚ RTX TOXINŮ

- Vazba CyaA/233FLAG na buňky CHO-CD11b/CD18, J774A.1 nebo lidské neutrofilů vyžaduje glykosylaci integrinového receptoru CD11b/CD18. A zároveň bylo ukázáno, že snížení vazby CyaA po odstranění sacharidových řetězců není způsobeno nižším množstvím integrinu CD11b/CD18 na buněčném povrchu nebo jeho rozpadem na jednotlivé podjednotky CD11b a CD18.
- Vazbu CyaA na buňky produkující integrin CD11b/CD18 je možno inhibovat volnými sacharidy - chitobiosou, chitotriosou, D-mannosou, N-acetyllaktosaminem a sialovou kyselinou – sacharidy, které jsou obsaženy v N-glykosidicky vázaném oligosaccharidovém řetězci. To ukazuje na lektinovou aktivitu CyaA.
- Intoxikace buněk cAMP způsobená CyaA závisí na stavu glykosylace integrinového receptoru CD11b/CD18, která určuje vazbu CyaA.
- Glykosylace β_2 integrinových receptorů hraje klíčovou roli i ve vazbě a cytotoxické aktivitě dalších RTX toxinů.

IMUNOLOGICKÉ VYUŽITÍ CyaA JAKO NOSIČE PRO DOPRAVU MYKOBAKTERIÁLNÍCH EPITOPŮ DO ANTIGEN PREZENTUJÍCÍCH BUNĚK

- CyaA toxoid, který v pozici 336 nesl antigen TB10.4:1-96, nebyl schopen prezentovat epitop OVA:257-264 (pozice 108) na molekulách MHC I.
- Rekombinantní toxoidy CyaA-TB10.4 byly schopny prezentovat epitop TB10.4:20-28 na molekulách MHC I se stejnou nebo vyšší účinností než samotný minimální epitop TB10.4:20-28.
- Všechny toxoidy s vloženým epitopem v pozici 233, s výjimkou CyaA-TB10.4:20-28-OVA, dopravovaly antigen a prezentovaly jej s vyšší účinností než pozici 336
- Rekombinantní toxoidy CyaA-TB10.4 indukovaly silnou a specifickou cytotoxickou T-buněčnou odpověď proti peptidu TB10.4:20-28.
- Toxoid CyaA-TB10.4:1-96-OVA indukoval silnou proliferativní odpověď slezinných buněk.
- Imunizace toxoidy CyaA-TB10.4:1-96-OVA a CyaA-TB10.4:15-33-OVA nenavodila ochranu proti infekci *M. tuberculosis*.

9 LITERATURA

1. Mock, M. & Ullmann, A. Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol* **1**, 187-92 (1993).
2. Guermontprez, P. et al. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* **193**, 1035-44 (2001).
3. Gordon, V. M. et al. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J Biol Chem* **264**, 14792-6 (1989).
4. Moullem, M., Farfel, Z. & Hanski, E. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: intoxication of host cells by bacterial invasion. *Infect Immun* **58**, 3759-64 (1990).
5. Confer, D. L. & Eaton, J. W. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* **217**, 948-50 (1982).
6. Saron, M. F. et al. Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3314-9 (1997).
7. Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. & Leclerc, C. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol* **162**, 4157-62 (1999).
8. Weiss, A. A., Hewlett, E. L., Myers, G. A. & Falkow, S. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis* **150**, 219-22 (1984).
9. Betsou, F., Sebo, P. & Guiso, N. CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* **61**, 3583-9 (1993).
10. Salyers, A. A. & Whitt, D. D. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 30-48 (2002).
11. Bednář, M., Fraňková, V., Schundler, J., Souček, A. & Vávra, J. *Lékařská mikrobiologie* (Marvil, Praha, 1996).
12. Parkhill, J. et al. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet* **35**, 32-40 (2003).
13. Cullinane, L. C., Alley, M. R., Marshall, R. B. & Manktelow, B. W. *Bordetella parapertussis* from lambs. *N Z Vet J* **35**, 175 (1987).
14. Porter, J. F., Connor, K. & Donachie, W. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology* **140** (Pt 2), 255-61 (1994).
15. Weiss, A. A. & Hewlett, E. L. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol* **40**, 661-86 (1986).
16. Glazka, A. *World Health Stat.* **45**, 238 (1992).
17. Anderson, E. L. Prevention of pertussis. *Semin Respir Infect* **4**, 284-92 (1989).
18. Loch, C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int Microbiol* **2**, 137-44 (1999).
19. Kerr, J. R. & Matthews, R. C. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**, 77-88 (2000).
20. Heining, U. Pertussis: an old disease that is still with us. *Curr Opin Infect Dis* **14**, 329-35 (2001).
21. Smith, A. M., Guzman, C. A. & Walker, M. J. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 309-33 (2001).
22. Crowcroft, N. S., Stein, C., Duclos, P. & Birmingham, M. How best to estimate the global burden of pertussis? *Lancet Infect Dis* **3**, 413-8 (2003).
23. Fine, P. E. & Clarkson, J. A. Reflections on the efficacy of pertussis vaccines. *Rev Infect Dis* **9**, 866-83 (1987).
24. Edwards, K. M. Acellular pertussis vaccines--a solution to the pertussis problem? *J Infect Dis* **168**, 15-20 (1993).
25. Sato, Y., Kimura, M. & Fukumi, H. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **1**, 122-6 (1984).
26. Cherry, J. D. Comparative efficacy of acellular pertussis vaccines: an analysis of recent trials. *Pediatr Infect Dis J* **16**, S90-6 (1997).
27. Decker, M. D. & Edwards, K. M. Acellular pertussis vaccines. *Pediatr Clin North Am* **47**, 309-35 (2000).
28. Loch, C., Antoine, R. & Jacob-Dubuisson, F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol* **4**, 82-9 (2001).
29. Antoine, R., Raze, D. & Loch, C. Genomics of *Bordetella pertussis* toxins. *Int J Med Microbiol* **290**, 301-5 (2000).

30. Urisu, A., Cowell, J. L. & Manclark, C. R. Involvement of filamentous hemagglutinin in the adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cell cultures. *Dev Biol Stand* **61**, 205-14 (1985).
31. Locht, C., Bertin, P., Menozzi, F. D. & Renauld, G. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesion produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol Microbiol* **9**, 653-60 (1993).
32. Hannah, J. H., Menozzi, F. D., Renauld, G., Locht, C. & Brennan, M. J. Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infect Immun* **62**, 5010-9 (1994).
33. Prasad, S. M., Yin, Y., Rodzinski, E., Tuomanen, E. I. & Masure, H. R. Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **61**, 2780-5 (1993).
34. Relman, D. et al. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61**, 1375-82 (1990).
35. Leininger, E. et al. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 345-9 (1991).
36. Goldman, W. E., Klapper, D. G. & Baseman, J. B. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells. *Infect Immun* **36**, 782-94 (1982).
37. Flak, T. A. & Goldman, W. E. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol* **1**, 51-60 (1999).
38. Cowell, J. L., Hewlett, E. L. & Manclark, C. R. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **25**, 896-901 (1979).
39. Livey, I. & Wardlaw, A. C. Production and properties of *Bordetella pertussis* heat-labile toxin. *J Med Microbiol* **17**, 91-103 (1984).
40. Walker, K. E. & Weiss, A. A. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun* **62**, 3817-28 (1994).
41. Pullinger, G. D., Adams, T. E., Mullan, P. B., Garrod, T. I. & Lax, A. J. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. *Infect Immun* **64**, 4163-71 (1996).
42. Horiguchi, Y. et al. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11623-6 (1997).
43. Masuda, M., Minami, M., Shime, H., Matsuzawa, T. & Horiguchi, Y. In vivo modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun* **70**, 998-1001 (2002).
44. Horiguchi, Y., Senda, T., Sugimoto, N., Katahira, J. & Matsuda, M. *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J Cell Sci* **108 (Pt 10)**, 3243-51 (1995).
45. Tamura, M. et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**, 5516-22 (1982).
46. Stein, P. E. et al. The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**, 45-57 (1994).
47. Weiss, A. A., Johnson, F. D. & Burns, D. L. Molecular characterization of an operon required for pertussis toxin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2970-4 (1993).
48. Pittman, M. The concept of pertussis as a toxin-mediated disease. *Pediatr Infect Dis* **3**, 467-86 (1984).
49. Katada, T. & Ui, M. Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3129-33 (1982).
50. Cotter, P. A. & Jones, A. M. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol* **11**, 367-73 (2003).
51. Stibitz, S. & Yang, M. S. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the vir locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **173**, 4288-96 (1991).
52. Akerley, B. J. & Miller, J. F. Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol* **4**, 141-6 (1996).
53. Uhl, M. A. & Miller, J. F. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1163-7 (1994).
54. Uhl, M. A. & Miller, J. F. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *Embo J* **15**, 1028-36 (1996).
55. Uhl, M. A. & Miller, J. F. Central role of the BvgS receiver as a phosphorylated intermediate in a complex two-component phosphorelay. *J Biol Chem* **271**, 33176-80 (1996).
56. Preston, A., Parkhill, J. & Maskell, D. J. The bordetellae: lessons from genomics. *Nat Rev Microbiol* **2**, 379-90 (2004).
57. Welch, R. A. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Curr Top Microbiol Immunol* **257**, 85-111 (2001).

58. Lory, S. Determinants of extracellular protein secretion in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **174**, 3423-8 (1992).
59. Felmlee, T., Pellett, S., Lee, E. Y. & Welch, R. A. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* **163**, 88-93 (1985).
60. Kraig, E., Dailey, T. & Kolodrubetz, D. Nucleotide sequence of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: homology to the alpha-hemolysin/leukotoxin gene family. *Infect Immun* **58**, 920-9 (1990).
61. Coote, J. G. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **8**, 137-61 (1992).
62. Wang, R. C. et al. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J Mol Biol* **217**, 441-54 (1991).
63. Thomas, W. D., Jr., Wagner, S. P. & Welch, R. A. A heterologous membrane protein domain fused to the C-terminal ATP-binding domain of HlyB can export *Escherichia coli* hemolysin. *J Bacteriol* **174**, 6771-9 (1992).
64. Welch, R. A. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **5**, 521-8 (1991).
65. Gadeberg, O. V. & Orskov, I. In vitro cytotoxic effect of alpha-hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect Immun* **45**, 255-60 (1984).
66. Bhakdi, S. et al. Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *J Exp Med* **169**, 737-54 (1989).
67. Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. & Schmidt, G. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *J Clin Invest* **85**, 1746-53 (1990).
68. Suttorp, N., Floer, B., Schnittler, H., Seeger, W. & Bhakdi, S. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* **58**, 3796-801 (1990).
69. Shewen, P. E. & Wilkie, B. N. Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect Immun* **35**, 91-4 (1982).
70. Taichman, N. S. et al. Cytopathic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on monkey blood leukocytes. *J Periodontal Res* **19**, 133-45 (1984).
71. Taichman, N. S. et al. Comparative studies on the biology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in primates. *Oral Microbiol Immunol* **2**, 97-104 (1987).
72. Strathdee, C. A. & Lo, R. Y. Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. *J Bacteriol* **171**, 916-28 (1989).
73. Fullner, K. J. & Mekalanos, J. J. In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *Embo J* **19**, 5315-23 (2000).
74. Ludwig, A. et al. Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**, 5422-30 (1996).
75. Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R. & Korostoff, J. The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol* **7**, 356-61 (1999).
76. Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67-113 (1992).
77. Holland, I. B. & Blight, M. A. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**, 381-99 (1999).
78. Saurin, W., Hofnung, M. & Dassa, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol* **48**, 22-41 (1999).
79. Gentschev, I. & Goebel, W. Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **232**, 40-8 (1992).
80. Dinh, T., Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **176**, 3825-31 (1994).
81. Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J. M. & Holland, I. B. The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **205**, 127-33 (1986).
82. Koronakis, V., Koronakis, E. & Hughes, C. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. *Embo J* **8**, 595-605 (1989).
83. Holland, I. B., Schmitt, L. & Young, J. Type 1 protein secretion in bacteria, the ABC-transporter dependent pathway (review). *Mol Membr Biol* **22**, 29-39 (2005).
84. Koronakis, V., Andersen, C. & Hughes, C. Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 403-7 (2001).
85. Hewlett, E. L. et al. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem* **266**, 17503-8 (1991).

86. Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R. & Goebel, W. The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca²⁺-dependent binding to erythrocytes. *Mol Gen Genet* **214**, 553-61 (1988).
87. Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. & Ladant, D. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* **270**, 26370-6 (1995).
88. Rhodes, C. R. et al. Structural consequences of divalent metal binding by the adenylyl cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Arch Biochem Biophys* **395**, 169-76 (2001).
89. Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K. M. & McKay, D. B. 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**, 3357-64 (1993).
90. Gangola, P. & Rosen, B. P. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 12570-4 (1987).
91. Ostolaza, H., Soloaga, A. & Goni, F. M. The binding of divalent cations to *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *Eur J Biochem* **228**, 39-44 (1995).
92. Ostolaza, H., Bakas, L. & Goni, F. M. Balance of electrostatic and hydrophobic interactions in the lysis of model membranes by *E. coli* alpha-haemolysin. *J Membr Biol* **158**, 137-45 (1997).
93. Bakas, L., Ostolaza, H., Vaz, W. L. & Goni, F. M. Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophys J* **71**, 1869-76 (1996).
94. Iwase, M., Lally, E. T., Berthold, P., Korchak, H. M. & Taichman, N. S. Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* **58**, 1782-8 (1990).
95. Moayeri, M. & Welch, R. A. Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* **65**, 2233-9 (1997).
96. Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. & Holland, I. B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* **52**, 63-9 (1986).
97. Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I. B. & Bhakdi, S. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **905**, 109-17 (1987).
98. Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. & Goebel, W. Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* **57**, 887-95 (1989).
99. Maier, E., Reinhard, N., Benz, R. & Frey, J. Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun* **64**, 4415-23 (1996).
100. Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. & Sebo, P. 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**, 27231-9 (1994).
101. Szabo, G., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* **269**, 22496-9 (1994).
102. Lear, J. D., Furlur, U. G., Lally, E. T. & Tanaka, J. C. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin forms large conductance, voltage-gated ion channels when incorporated into planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1238**, 34-41 (1995).
103. Menestrina, G., Pederzoli, C., Dalla Serra, M., Bregante, M. & Gambale, F. Permeability increase induced by *Escherichia coli* hemolysin A in human macrophages is due to the formation of ionic pores: a patch clamp characterization. *J Membr Biol* **149**, 113-21 (1996).
104. Ludwig, A., Vogel, M. & Goebel, W. Mutations affecting activity and transport of haemolysin in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **206**, 238-45 (1987).
105. Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. & Danchin, A. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *Embo J* **7**, 3997-4004 (1988).
106. Cruz, W. T., Young, R., Chang, Y. F. & Struck, D. K. Deletion analysis resolves cell-binding and lytic domains of the *Pasteurella leukotoxin*. *Mol Microbiol* **4**, 1933-9 (1990).
107. Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. & Sebo, P. 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**, 37644-50 (1999).
108. Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. & Koronakis, V. Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J Bacteriol* **183**, 5364-70 (2001).
109. Schindel, C. et al. Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. A study using cysteine scanning mutagenesis. *Eur J Biochem* **268**, 800-8 (2001).

110. Eberspacher, B., Hugo, F. & Bhakdi, S. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* **57**, 983-8 (1989).
111. Stanley, P. L. et al. Loss of activity in the secreted form of *Escherichia coli* haemolysin caused by an rfaP lesion in core lipopolysaccharide assembly. *Mol Microbiol* **10**, 781-7 (1993).
112. Cavalieri, S. J. & Snyder, I. S. Effect of *Escherichia coli* alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro. *Infect Immun* **37**, 966-74 (1982).
113. Simpson, D. L., Berthold, P. & Taichman, N. S. Killing of human myelomonocytic leukemia and lymphocytic cell lines by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infect Immun* **56**, 1162-6 (1988).
114. Taichman, N. S. et al. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *J Immunol* **147**, 3587-94 (1991).
115. Bauer, M. E. & Welch, R. A. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **64**, 167-75 (1996).
116. Gray, M., Szabo, G., Otero, A. S., Gray, L. & Hewlett, E. Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem* **273**, 18260-7 (1998).
117. Ludwig, A., Benz, R. & Goebel, W. Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *Mol Gen Genet* **241**, 89-96 (1993).
118. Iwaki, M., Ullmann, A. & Sebo, P. Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* **17**, 1015-24 (1995).
119. Lally, E. T. et al. RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *J Biol Chem* **272**, 30463-9 (1997).
120. Ambagala, T. C., Ambagala, A. P. & Srikumaran, S. The leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* binds to beta(2) integrins on bovine leukocytes. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 161-7 (1999).
121. Li, J., Clinkenbeard, K. D. & Richey, J. W. Bovine CD18 identified as a species specific receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Vet Microbiol* **67**, 91-7 (1999).
122. Valeva, A. et al. Binding of *Escherichia coli* hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent. *J Biol Chem* **280**, 36657-63 (2005).
123. Cortajarena, A. L., Goni, F. M. & Ostolaza, H. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* **276**, 12513-9 (2001).
124. Jorgensen, S. E., Mulcahy, P. F., Wu, G. K. & Louis, C. F. Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by *Escherichia coli* hemolysin. *Toxicon* **21**, 717-27 (1983).
125. Sun, Y., Clinkenbeard, K. D., Cudd, L. A., Clarke, C. R. & Clinkenbeard, P. A. Correlation of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin binding with susceptibility to intoxication of lymphoid cells from various species. *Infect Immun* **67**, 6264-9 (1999).
126. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Lipp, P. Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-8 (1998).
127. Berridge, M. J., Lipp, P. & Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21 (2000).
128. TranVan Nhieu, G., Clair, C., Grompone, G. & Sansonetti, P. Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol Cell* **96**, 93-101 (2004).
129. Fong, K. P. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell Microbiol* **8**, 1753-67 (2006).
130. Hsuan, S. L. et al. *Pasteurella haemolytica* leukotoxin and endotoxin induced cytokine gene expression in bovine alveolar macrophages requires NF-kappaB activation and calcium elevation. *Microb Pathog* **26**, 263-73 (1999).
131. Uhlen, P. et al. Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature* **405**, 694-7 (2000).
132. Cudd, L., Clarke, C. & Clinkenbeard, K. *Mannheimia haemolytica* leukotoxin-induced increase in leukotriene B4 production by bovine neutrophils is mediated by a sustained and excessive increase in intracellular calcium concentration. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 85-90 (2003).
133. Goodwin, M. S. & Weiss, A. A. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun* **58**, 3445-7 (1990).
134. Khelef, N., Sakamoto, H. & Guiso, N. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* **12**, 227-35 (1992).
135. Weiss, A. A. & Goodwin, M. S. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect Immun* **57**, 3757-64 (1989).
136. Gross, M. K., Au, D. C., Smith, A. L. & Storm, D. R. Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4898-902 (1992).

137. Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A. & Rappuoli, R. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *Embo J* **10**, 3971-5 (1991).
138. Glaser, P. et al. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2**, 19-30 (1988).
139. Laoide, B. M. & Ullmann, A. Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* cya operon. *Embo J* **9**, 999-1005 (1990).
140. Barry, E. M. et al. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, cyaC, for activation. *J Bacteriol* **173**, 720-6 (1991).
141. Koronakis, V., Eswaran, J. & Hughes, C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**, 467-89 (2004).
142. Sebo, P. & Ladant, D. 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 (1993).
143. Masin, J. et al. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* **44**, 12759-66 (2005).
144. Hewlett, E. L., Urban, M. A., Manclark, C. R. & Wolff, J. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 1926-30 (1976).
145. Zaretzky, F. R., Gray, M. C. & Hewlett, E. L. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol* **45**, 1589-98 (2002).
146. Hanski, E. & Farfel, Z. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem* **260**, 5526-32 (1985).
147. Kessin, R. H. & Franke, J. Secreted adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: calmodulin requirements and partial purification of two forms. *J Bacteriol* **166**, 290-6 (1986).
148. Gray, M. C., Donato, G. M., Jones, F. R., Kim, T. & Hewlett, E. L. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol* **53**, 1709-19 (2004).
149. Gordon, V. M., Leppla, S. H. & Hewlett, E. L. 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**, 1066-9 (1988).
150. Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. & Ullmann, A. Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun* **58**, 3242-7 (1990).
151. Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Sebo, P. & Leclerc, C. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* **173**, 6089-97 (2004).
152. Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P. & Ladant, D. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem* **267**, 13598-602 (1992).
153. Ehrmann, I. E., Gray, M. C., Gordon, V. M., Gray, L. S. & Hewlett, E. L. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett* **278**, 79-83 (1991).
154. Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Hewlett, E. L. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* **266**, 433-5 (1994).
155. Hackett, M. et al. Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 20250-3 (1995).
156. Hewlett, E. L., Donato, G. M. & Gray, M. C. Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol* **59**, 447-59 (2006).
157. Basler, M., Masin, J., Osicka, R. & Sebo, P. Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun* **74**, 2207-14 (2006).
158. Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Hackett, M. & Sebo, P. Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J Biol Chem* **276**, 348-54 (2001).
159. El-Azami-El-Idrissi, M. et al. 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**, 38514-21 (2003).
160. Rogel, A. & Hanski, E. 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**, 22599-605 (1992).
161. Knapp, O. et al. Channel formation in model membranes by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: effect of calcium. *Biochemistry* **42**, 8077-84 (2003).

162. Otero, A. S., Yi, X. B., Gray, M. C., Szabo, G. & Hewlett, E. L. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* **270**, 9695-7 (1995).
163. Basler, M. et al. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem* **282**, 12419-29 (2007).
164. Guo, Q. et al. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *Embo J* **24**, 3190-201 (2005).
165. Rogel, A. et al. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J* **8**, 2755-60 (1989).
166. Sebo, P., Glaser, P., Sakamoto, H. & Ullmann, A. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene* **104**, 19-24 (1991).
167. Westrop, G. D., Hormozi, E. K., Da Costa, N. A., Parton, R. & Coote, J. G. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: proCyaA and CyaC proteins synthesised separately in *Escherichia coli* produce active toxin in vitro. *Gene* **180**, 91-9 (1996).
168. Havlicek, V. et al. Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom* **36**, 384-91 (2001).
169. Harvill, E. T., Cotter, P. A., Yuk, M. H. & Miller, J. F. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect Immun* **67**, 1493-500 (1999).
170. Hanski, E. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem Sci* **14**, 459-63 (1989).
171. Guermonprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. & Leclerc, C. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol* **162**, 1910-6 (1999).
172. Bassinet, L., Fitting, C., Housset, B., Cavallion, J. M. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. *Infect Immun* **72**, 5530-3 (2004).
173. Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. & Guiso, N. Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo. *Infect Immun* **66**, 1718-25 (1998).
174. Weingart, C. L., Mobberley-Schuman, P. S., Hewlett, E. L., Gray, M. C. & Weiss, A. A. Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun* **68**, 7152-5 (2000).
175. Weingart, C. L. & Weiss, A. A. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun* **68**, 1735-9 (2000).
176. Friedman, R. L., Fiederlein, R. L., Glasser, L. & Galgiani, J. N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun* **55**, 135-40 (1987).
177. Khelef, N., Zychlinsky, A. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* **61**, 4064-71 (1993).
178. Khelef, N. & Guiso, N. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett* **134**, 27-32 (1995).
179. Bachelet, M., Richard, M. J., Francois, D. & Polla, B. S. Mitochondrial alterations precede *Bordetella pertussis*-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**, 125-31 (2002).
180. Vojtova, J., Kamanova, J. & Sebo, P. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol* **9**, 69-75 (2006).
181. Masin, J., Konopasek, I., Svobodova, J. & Sebo, P. Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim Biophys Acta* **1660**, 144-54 (2004).
182. Gray, M. C. et al. Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol* **183**, 5904-10 (2001).
183. Basar, T. et al. The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *J Biol Chem* **274**, 10777-83 (1999).
184. Abbas, A., Lichtman, A. & Pober, J. *Cellular and molecular immunology* (W.B. Saunders company, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 1994).
185. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchic, M. *Immunobiology: The immune-system in health and disease* (Garland Science Publishing, New York, USA, 2001).
186. Hořejší, V. & Bartůňková, J. *Základy imunologie* (Nakladatelství TRITON, Praha, 2002).
187. Norbury, C. C. & Sigal, L. J. Cross priming or direct priming: is that really the question? *Curr Opin Immunol* **15**, 82-8 (2003).

188. Houde, M. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, 402-6 (2003).
189. Guermonprez, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397-402 (2003).
190. Ladant, D., Glaser, P. & Ullmann, A. Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem* **267**, 2244-50 (1992).
191. Osicka, R. et al. 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**, 247-56 (2000).
192. Gmira, S., Karimova, G. & Ladant, D. Characterization of recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Res Microbiol* **152**, 889-900 (2001).
193. Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D. & Leclerc, C. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase delivers chemically coupled CD8+ T-cell epitopes to dendritic cells and elicits CTL in vivo. *Vaccine* **23**, 604-14 (2004).
194. Sebo, P. et al. Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8+ cytotoxic T cells. *Infect Immun* **63**, 3851-7 (1995).
195. Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A. & Leclerc, C. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J Immunol* **156**, 4697-706 (1996).
196. Karimova, G. et al. 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**, 12532-7 (1998).
197. Dadaglio, G. et al. Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes. *Int Immunol* **15**, 1423-30 (2003).
198. Sebo, P. et al. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying multiple copies of a viral CD8(+) T-cell epitope. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**, 167-73 (1999).
199. Fayolle, C. et al. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol* **75**, 7330-8 (2001).
200. Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C. & Sebo, P. 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**, 1002-5 (2002).
201. Dadaglio, G. et al. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **68**, 3867-72 (2000).
202. Mackova, J. et al. 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 (2006).
203. Brodin, P. et al. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun* **74**, 88-98 (2006).
204. Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* **16**, 463-96 (2003).
205. Salyers, A. & Whitt, D. *Bacterial pathogenesis a molecular approach* (ASM PRESS, Washington D.C., 2002).
206. Young, D. B. & Robertson, B. D. TB vaccines: global solutions for global problems. *Science* **284**, 1479-80 (1999).
207. Renshaw, P. S. et al. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem* **277**, 21598-603 (2002).
208. Stewart, G. R., Robertson, B. D. & Young, D. B. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* **1**, 97-105 (2003).
209. Státní zdravotní ústav.
210. Andersen, P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* **22**, 160-8 (2001).
211. Andersen, P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* **62**, 2536-44 (1994).
212. Abigail A. Salyers, D. D. W. in *second* 291-310 (ASM PRESS, Washington, D.C., Illinois, 2002).
213. Domenech, P., Barry, C. E., 3rd & Cole, S. T. *Mycobacterium tuberculosis* in the post-genomic age. *Curr Opin Microbiol* **4**, 28-34 (2001).

214. Doherty, T. M. Real world TB vaccines: clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine* **23**, 2109-14 (2005).
215. Andersen, P. & Doherty, T. M. TB subunit vaccines--putting the pieces together. *Microbes Infect* **7**, 911-21 (2005).
216. Zhu, X. et al. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* **158**, 5921-6 (1997).
217. Skjot, R. L. et al. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family. *Infect Immun* **70**, 5446-53 (2002).
218. Skjot, R. L. et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun* **68**, 214-20 (2000).
219. Trajkovic, V., Natarajan, K. & Sharma, P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins. *Microbes Infect* **6**, 513-9 (2004).
220. Brodin, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Cole, S. T. & Brosch, R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol* **12**, 500-8 (2004).
221. Kato-Maeda, M. et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* **11**, 547-54 (2001).
222. Sasseti, C. M., Boyd, D. H. & Rubin, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* **48**, 77-84 (2003).
223. Lodish, H. et al. *Molecular cell biology* (W. H. Freeman and Company, New York, 2001).
224. Humphries, M. J. et al. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci* **28**, 313-20 (2003).
225. Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87 (2002).
226. Harris, E. S., McIntyre, T. M., Prescott, S. M. & Zimmerman, G. A. The leukocyte integrins. *J Biol Chem* **275**, 23409-12 (2000).
227. Ross, G. D. & Vetvicka, V. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol* **92**, 181-4 (1993).
228. Ross, G. D. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. *Immunol Res* **25**, 219-27 (2002).
229. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
230. Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahmberg, C. G. & Kobata, A. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. *Biochemistry* **30**, 1561-71 (1991).
231. Sastre, L., Kishimoto, T. K., Gee, C., Roberts, T. & Springer, T. A. The mouse leukocyte adhesion proteins Mac-1 and LFA-1: studies on mRNA translation and protein glycosylation with emphasis on Mac-1. *J Immunol* **137**, 1060-5 (1986).
232. Yalamanchili, P., Lu, C., Oxvig, C. & Springer, T. A. Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *J Biol Chem* **275**, 21877-82 (2000).
233. Agramonte-Hevia, J., Gonzalez-Arenas, A., Barrera, D. & Velasco-Velazquez, M. Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34**, 255-66 (2002).
234. Li, Z. The alphaMbeta2 integrin and its role in neutrophil function. *Cell Res* **9**, 171-8 (1999).
235. Hazeki, K., Tamoto, K., Ui, M. & Mori, Y. Dual pertussis toxin-sensitive pathway of zymosan-induced activation in guinea pig macrophages. An anti-CR3 antibody-inhibitable stimulation of phagocytosis and -resistant stimulation of O₂- production and arachidonate release. *FEBS Lett* **342**, 29-32 (1994).
236. Yakubenko, V. P., Lishko, V. K., Lam, S. C. & Ugarova, T. P. A molecular basis for integrin alphaMbeta 2 ligand binding promiscuity. *J Biol Chem* **277**, 48635-42 (2002).
237. Lishko, V. K., Yakubenko, V. P. & Ugarova, T. P. The interplay between integrins alphaMbeta2 and alpha5beta1 during cell migration to fibronectin. *Exp Cell Res* **283**, 116-26 (2003).
238. Xia, Y. & Ross, G. D. Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional beta-glucan-binding lectin site of CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **162**, 7285-93 (1999).
239. Vetvicka, V., Thornton, B. P. & Ross, G. D. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest* **98**, 50-61 (1996).
240. Xia, Y. et al. Function of the lectin domain of Mac-1/complement receptor type 3 (CD11b/CD18) in regulating neutrophil adhesion. *J Immunol* **169**, 6417-26 (2002).
241. Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, J., Xia, Y. & Vetvickova, J. Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* **42**, 61-74 (1999).

242. Ross, G. D. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* **20**, 197-222 (2000).
243. Mould, A. P. et al. Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *J Biol Chem* **278**, 17028-35 (2003).
244. Bansal, V. S. et al. Small molecule antagonists of complement receptor type 3 block adhesion and adhesion-dependent oxidative burst in human polymorphonuclear leukocytes. *J Pharmacol Exp Ther* **304**, 1016-24 (2003).
245. Dana, N., Fathallah, D. M. & Arnaout, M. A. Expression of a soluble and functional form of the human beta 2 integrin CD11b/CD18. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 3106-10 (1991).
246. Li, R. et al. Activation of integrin alphaIIb beta3 by modulation of transmembrane helix associations. *Science* **300**, 795-8 (2003).
247. Corbi, A. L., Kishimoto, T. K., Miller, L. J. & Springer, T. A. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. *J Biol Chem* **263**, 12403-11 (1988).
248. Huang, C. & Springer, T. A. Folding of the beta-propeller domain of the integrin alphaL subunit is independent of the I domain and dependent on the beta2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3162-7 (1997).
249. Rieu, P., Sugimori, T., Griffith, D. L. & Arnaout, M. A. Solvent-accessible residues on the metal ion-dependent adhesion site face of integrin CR3 mediate its binding to the neutrophil inhibitory factor. *J Biol Chem* **271**, 15858-61 (1996).
250. Qu, A. & Leahy, D. J. Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10277-81 (1995).
251. Xiong, J. P., Li, R., Essafi, M., Stehle, T. & Arnaout, M. A. An isoleucine-based allosteric switch controls affinity and shape shifting in integrin CD11b A-domain. *J Biol Chem* **275**, 38762-7 (2000).
252. Goodman, T. G. & Bajt, M. L. Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem* **271**, 23729-36 (1996).
253. Li, R., Rieu, P., Griffith, D. L., Scott, D. & Arnaout, M. A. Two functional states of the CD11b A-domain: correlations with key features of two Mn²⁺-complexed crystal structures. *J Cell Biol* **143**, 1523-34 (1998).
254. Shimaoka, M. et al. Stabilizing the integrin alpha M inserted domain in alternative conformations with a range of engineered disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16737-41 (2002).
255. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. & Smith, J. W. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-8 (2000).
256. Zhang, L. & Plow, E. F. Identification and reconstruction of the binding site within alphaMbeta2 for a specific and high affinity ligand, NIF. *J Biol Chem* **272**, 17558-64 (1997).
257. Xiong, Y. M., Haas, T. A. & Zhang, L. Identification of functional segments within the beta2I-domain of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem* **277**, 46639-44 (2002).
258. Lee, J. O., Rieu, P., Arnaout, M. A. & Liddington, R. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* **80**, 631-8 (1995).
259. Kishimoto, T. K., O'Connor, K., Lee, A., Roberts, T. M. & Springer, T. A. Cloning of the beta subunit of the leukocyte adhesion proteins: homology to an extracellular matrix receptor defines a novel supergene family. *Cell* **48**, 681-90 (1987).
260. Berton, G. & Lowell, C. A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cell Signal* **11**, 621-35 (1999).
261. Takami, M., Herrera, R. & Petruzzelli, L. Mac-1-dependent tyrosine phosphorylation during neutrophil adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1045-56 (2001).
262. Cram, E. J. & Schwarzbauer, J. E. The talin wags the dog: new insights into integrin activation. *Trends Cell Biol* **14**, 55-7 (2004).
263. Qin, J., Vinogradova, O. & Plow, E. F. Integrin bidirectional signaling: a molecular view. *PLoS Biol* **2**, e169 (2004).
264. Ehlers, M. R. CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* **2**, 289-94 (2000).
265. Lub, M., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J. & Figdor, C. G. Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1. *Mol Biol Cell* **8**, 341-51 (1997).
266. Yan, S. R. & Berton, G. Antibody-induced engagement of beta2 integrins in human neutrophils causes a rapid redistribution of cytoskeletal proteins, Src-family tyrosine kinases, and p72syk that precedes de novo actin polymerization. *J Leukoc Biol* **64**, 401-8 (1998).

267. Petty, H. R. & Todd, R. F., 3rd. Integrins as promiscuous signal transduction devices. *Immunol Today* **17**, 209-12 (1996).
268. Pfeiffer, A. et al. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* **31**, 3153-64 (2001).
269. Takami, M., Terry, V. & Petruzzelli, L. Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1. *J Immunol* **168**, 4559-66 (2002).
270. Dib, K. BETA 2 integrin signaling in leukocytes. *Front Biosci* **5**, D438-51 (2000).
271. Serrander, L. et al. Particles binding beta(2)-integrins mediate intracellular production of oxidative metabolites in human neutrophils independently of phagocytosis. *Biochim Biophys Acta* **1452**, 133-44 (1999).
272. Yan, S. R., Fumagalli, L., Dusi, S. & Berton, G. Tumor necrosis factor triggers redistribution to a Triton X-100-insoluble, cytoskeletal fraction of beta 2 integrins, NADPH oxidase components, tyrosine phosphorylated proteins, and the protein tyrosine kinase p58fgr in human neutrophils adherent to fibrinogen. *J Leukoc Biol* **58**, 595-606 (1995).
273. Liu, S., Calderwood, D. A. & Ginsberg, M. H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* **113 (Pt 20)**, 3563-71 (2000).
274. Axelsson, L. et al. Clustering of beta(2)-integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to PtdIns 3-kinase. *Exp Cell Res* **256**, 257-63 (2000).
275. Ojaniemi, M., Martin, S. S., Dolfi, F., Olefsky, J. M. & Vuori, K. The proto-oncogene product p120(cbl) links c-Src and phosphatidylinositol 3'-kinase to the integrin signaling pathway. *J Biol Chem* **272**, 3780-7 (1997).
276. Hellberg, C., Molony, L., Zheng, L. & Andersson, T. Ca²⁺ signalling mechanisms of the beta 2 integrin on neutrophils: involvement of phospholipase C gamma 2 and Ins(1,4,5)P₃. *Biochem J* **317 (Pt 2)**, 403-9 (1996).
277. DeMali, K. A., Wennerberg, K. & Burridge, K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 572-82 (2003).
278. Zheng, L., Sjolander, A., Eckerdal, J. & Andersson, T. Antibody-induced engagement of beta 2 integrins on adherent human neutrophils triggers activation of p21ras through tyrosine phosphorylation of the protooncogene product Vav. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8431-6 (1996).
279. Cooper, D. N. & Barondes, S. H. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* **110**, 1681-91 (1990).
280. Kojima, K. et al. Characterization of carbohydrate-binding protein p33/41: relation with annexin IV, molecular basis of the doublet forms (p33 and p41), and modulation of the carbohydrate binding activity by phospholipids. *J Biol Chem* **271**, 7679-85 (1996).
281. Drickamer, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem* **263**, 9557-60 (1988).
282. Bergman, M., Del Prete, G., van Kooyk, Y. & Appelmek, B. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat Rev Microbiol* **4**, 151-9 (2006).
283. Reading, P. C., Tate, M. D., Pickett, D. L. & Brooks, A. G. Glycosylation as a target for recognition of influenza viruses by the innate immune system. *Adv Exp Med Biol* **598**, 279-92 (2007).
284. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
285. Ladant, D., Brezin, C., Alonso, J. M., Crenon, I. & Guiso, N. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Purification, characterization, and radioimmunoassay. *J Biol Chem* **261**, 16264-9 (1986).
286. White, A. A. Separation and purification of cyclic nucleotides by alumina column chromatography. *Methods Enzymol* **38**, 41-6 (1974).
287. Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5752-6 (1998).
288. Karttunen, J., Sanderson, S. & Shastri, N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6020-4 (1992).
289. Majlessi, L., Rojas, M. J., Brodin, P. & Leclerc, C. CD8⁺-T-cell responses of *Mycobacterium*-infected mice to a newly identified major histocompatibility complex class I-restricted epitope shared by proteins of the ESAT-6 family. *Infect Immun* **71**, 7173-7 (2003).
290. Khelef, N., Gounon, P. & Guiso, N. Internalization of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage cytotoxicity. *Cell Microbiol* **3**, 721-30 (2001).
291. Gordon, S. V. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* **32**, 643-55 (1999).

292. Majlessi, L. et al. An increase in antimycobacterial Th1-cell responses by prime-boost protocols of immunization does not enhance protection against tuberculosis. *Infect Immun* **74**, 2128-37 (2006).
293. Wilkinson, K. A. et al. Efficient Ex vivo stimulation of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells by genetically detoxified Bordetella pertussis adenylate cyclase antigen toxoids. *Infect Immun* **73**, 2991-8 (2005).
294. Guernonprez, P. et al. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha -CD11bhigh dendritic cells. *Eur J Immunol* **32**, 3071-81 (2002).
295. Preville, X., Ladant, D., Timmerman, B. & Leclerc, C. Eradication of established tumors by vaccination with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res* **65**, 641-9 (2005).
296. Schroeckh, V., Hortschansky, P., Fricke, S., Luckenbach, G. A. & Riesenberg, D. Expression of soluble, recombinant alphavbeta3 integrin fragments in *Escherichia coli*. *Microbiol Res* **155**, 165-77 (2000).
297. Fairbanks, M. B. et al. Purification and structural characterization of the CD11b/CD18 integrin alpha subunit I domain reveals a folded conformation in solution. *FEBS Lett* **369**, 197-201 (1995).
298. Weinacker, A. et al. Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *J Biol Chem* **269**, 6940-8 (1994).
299. McKay, B. S., Annis, D. S., Honda, S., Christie, D. & Kunicki, T. J. Molecular requirements for assembly and function of a minimized human integrin alphaIIb beta3. *J Biol Chem* **271**, 30544-7 (1996).
300. Mathias, P., Galleno, M. & Nemerow, G. R. Interactions of soluble recombinant integrin alphav beta5 with human adenoviruses. *J Virol* **72**, 8669-75 (1998).
301. Clark, K., Newham, P., Burrows, L., Askari, J. A. & Humphries, M. J. Production of recombinant soluble human integrin alpha4beta1. *FEBS Lett* **471**, 182-6 (2000).
302. Noti, J. D. Sp3 mediates transcriptional activation of the leukocyte integrin genes CD11C and CD11B and cooperates with c-Jun to activate CD11C. *J Biol Chem* **272**, 24038-45 (1997).
303. Zheng, M., Fang, H. & Hakomori, S. Functional role of N-glycosylation in alpha 5 beta 1 integrin receptor. De-N-glycosylation induces dissociation or altered association of alpha 5 and beta 1 subunits and concomitant loss of fibronectin binding activity. *J Biol Chem* **269**, 12325-31 (1994).
304. Chammas, R., Veiga, S. S., Line, S., Potocnjak, P. & Brentani, R. R. Asn-linked oligosaccharide-dependent interaction between laminin and gp120/140. An alpha 6/beta 1 integrin. *J Biol Chem* **266**, 3349-55 (1991).
305. Yahiro, K. et al. Identification and characterization of receptors for vacuolating activity of subtilase cytotoxin. *Mol Microbiol* **62**, 480-90 (2006).
306. Nyholm, P. G., Brunton, J. L. & Lingwood, C. A. Modelling of the interaction of verotoxin-1 (VT1) with its glycolipid receptor, globotriaosylceramide (Gb3). *Int J Biol Macromol* **17**, 199-204 (1995).
307. St Hilaire, P. M., Boyd, M. K. & Toone, E. J. Interaction of the Shiga-like toxin type 1 B-subunit with its carbohydrate receptor. *Biochemistry* **33**, 14452-63 (1994).
308. Karlsson, K. A. et al. Unexpected carbohydrate cross-binding by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Recognition of human and rabbit target cell glycoconjugates in comparison with cholera toxin. *Bioorg Med Chem* **4**, 1919-28 (1996).
309. Jeyaseelan, S. et al. Lymphocyte function-associated antigen 1 is a receptor for *Pasteurella haemolytica* leukotoxin in bovine leukocytes. *Infect Immun* **68**, 72-9 (2000).
310. Walker, C. M., Moody, D. J., Stites, D. P. & Levy, J. A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* **234**, 1563-6 (1986).
311. Dietrich, J. et al. Exchanging ESAT6 with TB10.4 in an Ag85B fusion molecule-based tuberculosis subunit vaccine: efficient protection and ESAT6-based sensitive monitoring of vaccine efficacy. *J Immunol* **174**, 6332-9 (2005).
312. Wang, J. & Xing, Z. Tuberculosis vaccines: the past, present and future. *Expert Rev Vaccines* **1**, 341-54 (2002).
313. Muller, I., Cobbold, S. P., Waldmann, H. & Kaufmann, S. H. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun* **55**, 2037-41 (1987).
314. Selwyn, P. A. et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **320**, 545-50 (1989).
315. Tascon, R. E., Stavropoulos, E., Lukacs, K. V. & Colston, M. J. Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon. *Infect Immun* **66**, 830-4 (1998).
316. Caruso, A. M. et al. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J Immunol* **162**, 5407-16 (1999).

317. Scanga, C. A. et al. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med* **192**, 347-58 (2000).
318. Ottenhoff, T. H., Kumararatne, D. & Casanova, J. L. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* **19**, 491-4 (1998).
319. Mogue, T., Goodrich, M. E., Ryan, L., LaCourse, R. & North, R. J. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med* **193**, 271-80 (2001).
320. Lindblad, E. B., Elhay, M. J., Silva, R., Appelberg, R. & Andersen, P. Adjuvant modulation of immune responses to tuberculosis subunit vaccines. *Infect Immun* **65**, 623-9 (1997).
321. Agger, E. M. & Andersen, P. Tuberculosis subunit vaccine development: on the role of interferon-gamma. *Vaccine* **19**, 2298-302 (2001).

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	adenylát cyklasová aktivita vzorku [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ extraktu]
A_{HR}	radioaktivita (2,8- ^3H)cAMP v 50 μl reakční směsi [DPM]
A_{HV}	radioaktivita (2,8- ^3H)cAMP ve vzorku [DPM]
A_{PB}	radioaktivita ^{32}P v slepém pokusu [DPM]
A_{PV}	radioaktivita ^{32}P ve vzorku [DPM]
ABC	membránový transportér (z angl. A TP B inding C assette)
AC	adenylát cyklasa, adenylát cyklasový, -á, -é
ACP	acyl přenašející protein (z angl. A cy-l- C arrier P rotein)
ADP	adenosindifosfát
Amp	ampicilin
aP	bezbuňková vakcína proti černému kašli (z angl. a cellular P ertussis)
APC	antigen prezentující buňka (z angl. A ntigen- P resentig C ell)
APS	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
BCG	bacillus Calmette-Guérin
<i>Bp</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
bp	páry basí (z angl. base pairs)
BSA	hovězí sérový albumin
<i>bvg</i>	<i>Bordetella virulence gene</i>
CaM	kalmodulin
cAMP	adenosin-3',5'-(cyklický) monofosfát
CD	klastr diference
CFP-10	C ulture F iltrate P rotein-10
CHO	buněčná linie izolovaná z vaječníků křečka zlatého (z angl. C hinese H amster O vary cell line)
CPM	počet impulzů za minutu (z angl. C ounts P er M inute)
CR 3	komplementový receptor typu 3
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CTLL-2	linie cytotoxických T-lymfocytů
CyaA	adenylát cyklasový toxin (=ACT)
<i>cyaA</i>	gen kódující adenylát cyklasový toxin
<i>cyaB</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
<i>cyaC</i>	gen kódující acyltransferasu umožňující posttranslační modifikaci adenylát cyklasového toxinu mastnou kyselinou
CyaC	acyltransferasa zjišťující posttranslační modifikaci ACT
<i>cyaD</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
<i>cyaE</i>	gen kódující jeden z proteinů zajišťujících sekreci adenylát cyklasového toxinu
λ -DNA	DNA bakteriofága lambda
d	ředění močovinového extraktu
DDA	D imethyl- D ioctadecyl- A monium bromid
DEAE	diethylaminoethyl
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DMT	směs adjuvans DDA , MPL a TDM
DNT	letální toxin bakterie <i>B. pertussis</i>
dNTP	deoxyribonuklesidtrifosfát
DPM	počet rozpadů za miutu (z ang. decays per minute)
dsDNA	dvouvláknová forma DNA
DT	D iphtheria T oxin
DTP	trivalentní vakcína proti Diphterii, Tetanu, Pertussi
DTT	dithiothreitol
E5	geneticky provedená detoxifikace adenylátcyklasového toxinu
E7	onkoprotein lidského papiloma viru 16
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplasmatické retikulum
ESAT-6	E arly S ecreted A ntigenic T arget-6
EU	Evropská unie

FAK	fokální adhesní kinasa
Fc γ	Fc část IgG
Fc γ IIIb	receptor typu 3B pro Fc část IgG
FHA	vláknitý hemaglutinin
Fim	fimbrie
FLAG	epitop kódovaný sekvencí DYKDDDDK
Gal	galaktosa
GalNac	N-acetylgalaktosa
GDP	guanidindifosfát
GlcNac	N-acetylglukosa
gp120	glykoprotein obálky viru HIV
GPI	glykofosfatidilinositol
GTP	guanidintrifosfát
HlyA	α -hemolysin bakterie <i>E. coli</i>
ICAM	molekula intercelulární adheze
IL	interleukin
IPTG	isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid
kDa	kiloDalton
LacNac	N-acetyllaktosamin
LB	Luria-Bertani
LCMV	virus lymfatické choriové meningitidy (z angl. L ymphocytic C horio M eningitis V irus)
LktA	leukotoxin bakterie <i>P. haemolytica</i>
LPS	lipopolysacharid
LtxA	leukotoxin bakterie <i>A. actinomycetemcomitans</i>
M ⁺⁺	malé bivalentní kationty
Man	mannosa
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MFI	průměr hodnot intesity fluorescence (z angl. M ean F luorescence I ntensity)
MFP	M embrane F usion P rotein
MHC	hlavní histokompatibilitní komplex (z angl. M ajor H istocompatibility C omplex)
MIDAS	M etal I on- D ependent A dhesion S ite
MPa	megaPascal
MPL	M ono P hosphoryl- L ipide A
n	látkové množství ATP v 50 μ l reakční směsi [μ mol]
NEB	New England BioLabs
NK	přírozně zabíjející (z angl. N atural K iller)
OD	optická densita
OVA	ovalbumin
α - ³² P	radioaktivní fosfor s 32 nukleony v ATP, ADP, cAMP
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. P olymerase- C hain R eaction)
PI	fosfoinositol
PI3K	fosfoinositol-3-kinasa
PKC	proteinkinasa C
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
<i>p_{lac}</i>	laktosový promotor
<i>p_{trc}</i>	hybridní laktosový a tryptofanový promotor
PMN	polymorfonukleární lymfocyty
PRN	pertaktin
pS	pikoSiemens
PTX	pertussový toxin bakterie <i>B. pertussis</i>
r	rekombinantní
RPM	počet otáček za minutu (z angl. R epeats p er M inute)
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	pokožová teplota
RTX	označení skupiny toxinů (z angl. R epeats in T o X in)
RtxB	ATP-vázající protein vnitřní membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxB</i>	gen kódující ATP-vázající protein vnitřní membrány
RtxD	membránový periplasmatický protein, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxC</i>	gen kódující membránový periplasmatický protein

RtxE	kanálový protein vnější membrány, součást sekrečního systému typu I
<i>rtxE</i>	gen kódující kanálový protein vnější membrány
SAP	alkalická fosfatasa (z angl. S hrimp A lkaline P hosphatase)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforesa v SDS-polyakrylamidovém gelu
t	reakční čas [min]
TBC	tuberkulóza
TCF	tracheální kolonizační faktor bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TCR	T-buněčný receptor
TCT	tracheální cytotoxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TDM	T rehalosa- D ikoryno- M ykolát
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
U	jednotka (z angl. unit)
uPAR	U rokinase-type P lasminogen A ctivato R
UV záření	ultrafialové záření
V3	variabilní region
V _{ME}	objem přidaného ředěného extraktu [ml]
WHO	Světová zdravotnická organizace (z angl. W orld H ealth O rganization)
w.t. CyaA	označení pro původní CyaA (z angl. W ild T ype)
X	libovolná aminokyselina