

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra Genetiky a Mikrobiologie



**Ovlivnění buněčné signalizace v eukaryotních
buňkách pomocí adenylátcyklázového toxinu
bakterie *Bordetella pertussis*.**

Veronika Špuláková

Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Práce byla vypracována samostatně, jen s použitím citované literatury
a pod vedením vedoucího diplomové práce.

Veronika Špuláková

Veronika Špuláková

Poděkování

Za odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracování této práce děkuji doc. Ivo Konopáskovi.

Děkuji ing. Petru Šebovi za možnost práce v jeho laboratoři při přípravě mutantních toxinů.

Dále děkuji Radovanu Fišerovi za rady při měření na spektrofluorometru a při práci v laboratoři a Jiřímu Mašínovi a Marku Baslerovi za přípravu buněk a mutantních toxinů.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu a trpělivost během mého studia na vysoké škole.

Diplomová práce vznikla za finanční podpory grantu

GA AV České republiky č. IAA5020406 (2004-2008)

„Mechanismus membránové interakce a cytotoxické aktivity adenylátcyklázového toxinu“.

Modification of cell-signalling in eukaryotic cells using the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*.

The aim of my diploma thesis was to study the transport of calcium ions into the host cells after their interaction with adenylate cyclase toxin (ACT) of *Bordetella pertussis*. During the interaction of ACT with mouse macrophages bearing integrin on their surface, intracellular concentration of calcium ions $[Ca^{2+}]_i$ was significantly increased. Variations of intracellular concentration of Ca^{2+} were measured by spectrofluorometer using Fura-2 fluorescence probe, which interacts with calcium ions inside the cells. The mechanism of calcium influx was studied as well as the effect of the presence of integrin receptor on the target cells.

Using the calcium channels inhibitors, I found that calcium ions enter the cells from extracellular environment via of ACT toxin itself and such toxin-mediated calcium influx can be inhibited by lanthanum ions (La^{3+}). Furthermore, calcium ions obviously enter the cells due to the AC domain translocation. On the other hand, the ACT toxins mutants lacking the AC domain are also able to induce an increase of $[Ca^{2+}]_i$ level in case when they exert an increased hemolytic activity due to an increased frequency of toxin pore formation. During the experiments with CHO cells (with integrin receptor on their surface) I concluded, that the different calcium influx kinetics induced by the toxin (in comparison with J774A.1 cells) resulted from an increased integrin density on their surface.

Bordetella pertussis, adenylate cyclase toxin, calcium signalling, calcium channels, inhibitors, integrin receptor, spectrofluorometry, Fura-2/AM

Bordetella pertussis, adenylátcyklázový toxin, vápníková signalizace, vápníkové kanály, inhibitory, integrinový receptor, spektrofluorometrie, Fura-2/AM

Obsah:

1.	Seznam zkratk	8
2.	Úvod	9
3.	Literární přehled	11
3.1	Bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	11
3.1.1	Virulenční faktory bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	12
3.2	Adenylátcyklázový toxin (ACT)	13
3.2.1	Struktura ACT	13
3.2.2	Posttranslační modifikace ACT	15
3.2.3	Působení ACT na cílovou buňku	15
3.2.4	Využití ACT pro dopravu cizorodých antigenů do antigen-prezentujících buněk	17
3.3	Vápníková signalizace	18
3.4	Vápníkové kanály v eukaryotní buňce	20
3.4.1	Receptorem ovládaný kanál: (ROC)	21
3.4.2	Kanál ovládaný intracelulární zásobou vápníku: (SOC)	22
3.4.3	Napětím ovládaný kanál: (VOC)	23
3.4.4	Inositol trifosfátový receptorový kanál: (IP ₃ kanál)	24
3.4.5	Ryanoidní receptorový kanál: (RyR)	25
3.4.6	Sfingolipidový Ca ²⁺ kanál endoplazmatického retikula: (SCaMPER)	25
3.5	Toxiny ovlivňující vápníkovou signalizaci	26
3.5.1	α -hemolyzín <i>Escherichia coli</i>	26
3.5.2	Listeriolysin O bakterie <i>Listeria monocytogenes</i>	26
3.5.3	Anthrax edema toxin bakterie <i>Bacillus anthracis</i>	27
3.5.4	Aerolysin bakterie <i>Aeromonas hydrophila</i>	28
4.	Materiál a metody	29
4.1	Chemikálie a přístrojové vybavení	29
4.1.1	Seznam použitého materiálu a chemikálií	29
4.1.2	Přístrojové vybavení	30
4.1.3	Použité plazmidy	30
4.1.4	Bakteriální kmeny	30
4.1.5	Použité roztoky	31
4.1.6	Kultivační media	34
4.2	Příprava ACT – produkce rekombinantního ACT v <i>E.coli</i> (kmen XL1 blue) a jeho izolace	36
4.2.1	Izolace plazmidové DNA (miniprep)	36
4.2.2	Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk	37
4.2.3	Produkce toxinu	37
4.2.4	Extrakce inkluzních tělísek	38
4.2.5	Purifikace toxinu chromatografií na DEAE-Sepharose	38
4.2.6	Purifikace toxinu chromatografií na Phenyl-Sepharose	39
4.2.7	Stanovení množství proteinu metodou Bradfordové	40
4.2.8	Elektroforéza v 7,5% polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	41
4.3	Makrofágy J744A.1 a CHO buňky	41
4.3.1	Kultivace	41
4.3.2	Příprava vzorků	42
4.3.3	Měření vstupu vápníku do buněk	43

5.	Výsledky.....	48
5.1	Interakce ACT s buňkami myších makrofágů J774A.1	48
5.1.1	Inhibitory buněčných vápníkových kanálů	49
5.1.2	Vstup vápníku do buněk J774A.1 indukovaný ACT s mutacemi v AC doméně	59
5.1.3	Vstup vápníku do buněk J774A.1 indukovaný ACT s mutacemi v hemolytické doméně	62
5.2	Interakce ACT s buňkami CHO	63
5.2.1	Role receptoru CD11b/CD18	63
5.2.2	Nespecifický inhibitor LaCl ₃	65
5.3	Porovnání odpovědi J774A.1 a CHO buněk na přidavek wt-ACT a mutantních toxinů.	66
6.	Diskuze.....	69
7.	Souhrn	74
8.	Seznam citované literatury:	76

1. Seznam zkratek

ACT	adenylátcyklázový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
ACT/det	detoxifikovaný ACT (neschopný tvořit cAMP)
ACT- Δ AC	adenylátcyklázový toxin bez AC domény
ACT- Δ AC/E509+516K	ACT bez AC domény, s mutací v pozici 509 a 516
ACT- Δ AC/E581K	ACT bez AC domény, s mutací v pozici 581
ACT-108 OVA/det	ACT neschopný tvořit cAMP, s vloženým peptidem v pozici 108
ACT-336 OVA/det	ACT neschopný tvořit cAMP, s vloženým peptidem v pozici 336
2-APB	2-aminoethyl difenyl borinát
ATP	adenozintrifosfát
$[Ca^{2+}]_i$	intracelulární koncentrace vápenatých iontů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CHO	ovariální buňky křečka
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
FHA	filamentózní hemaglutinin
Fura-2/AM	intracelulární indikátor Ca^{2+}
HlyA	hemolyzín bakterie <i>Escherichia coli</i>
IP3	inositol-1,4,5- trifosfát
IP ₃ R	inositol trifosfátový receptor
IPTG	isopropyl-D-thiogalaktopyranosid
J774A.1	myší makrofágy
LLO	listeriolyzin bakterie <i>Listeria monocytogenes</i>
PLC	fosfolipáza C
ROC	receptorem ovládaný kanál
RyR	ryanoidní receptor
SCaMPER	Sfingolipid dependentní vápníkový kanál ER
SOC	kanál ovládaný intracelulární zásobou vápníku
VOC	napětím ovládaný kanál
wt-ACT	„wild type“ nemutovaný kmen ACT

2. Úvod

Předmětem mé diplomové práce je transport vápenatých iontů do hostitelské buňky po jejich interakci s adenylátcyklázovým toxinem (ACT) bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje respirační onemocnění černý kašel.

Ve vyspělých zemích byl černý kašel odstraněn pomocí masivního očkování populace, ale onemocnění se začíná vracet i do těchto zemí. K očkování se používají nedefinované celobuněčné vakcíny, které mohou být také jednou z možných příčin prudkého nárustu alergií u dětí. Jedním z hlavních cílů výzkumu ACT je proto vývoj nových a definovaných, tedy rekombinantních a bezpečnějších, bezbuněčných vakcín proti černému kašli. Dalším důvodem k výzkumu ACT je jeho schopnost pronikat přes plazmatickou membránu celé řady eukaryotních buněk. Bylo zjištěno, že ACT je tak možno využít k dopravě cizorodých antigenů do cytoplazmy antigen-prezentujících buněk. To umožňuje vystavení těchto epitopů prostřednictvím hlavního histokompatibilního komplexu I. nebo II. třídy na buněčném povrchu a indukci imunitní odpovědi proti příslušné virové infekci.

Adenylát cyklázový toxin je jeden z hlavních toxinů produkovaných bakterií *Bordetella pertussis*. ACT je syntetizován jako inaktivní prekurzor, který je aktivován acylací, konkrétně navázáním palmitolejové kyseliny na Lys 983. ACT je protein tvořený 1706 aminokyselinovými zbytky. Skládá se z N-koncové katalytické domény zahrnující 400 aminokyselinových zbytků a C-koncové části s hemolytickou aktivitou. ACT je schopen interagovat s mnoha typy buněk a dopravovat svoji adenylátcyklázovou doménu do buňky (intoxikace). Tato doména po aktivaci cytoplazmatickým kalmodulinem katalyzuje nekontrolovatelnou přeměnu ATP na cAMP uvnitř buňky. Vysoká hladina intracelulárního cAMP má za následek poruchu buněčné signalizace a inhibici funkcí buněk imunitního systému hostitele. Kromě intoxikace vykazuje ACT také hemolytickou aktivitu. C-koncová část může totiž vytvářet v napadené buňce membránové kanály selektivní pro kationty.

Nedávno byl objeven receptor pro ACT, kterým je integrín CD11b/ CD18 ($\alpha_M\beta_2$), exprimovaný v neutrofilech, makrofázích a dendritických buňkách. Vazba ACT na buňky exprimující tento receptor je mnohem efektivnější než na buňkách, které CD11b/CD18 neexprimují. Proto jsem ve svých pokusech používala buňky linie J774A.1 (myší makrofágy) a CHO, které tento receptor exprimují.

Cílem mých pokusů bylo zjistit, jakým způsobem dochází ke vstupu vápníku do cílových myeloidních buněk a jaké kanály se přitom účastní. K tomuto účelu jsem používala inhibitory k zablokování vápníkových kanálů. Dále jsem se zabývala měřením vstupu vápníku na buňkách, které neexprimují integrinový receptor a tím, jak tento vstup ovlivní produkce rekombinantního receptoru v těchto buňkách. Ke studiu mechanismu vstupu vápníku jsem používala i mutanty ACT, které měly pozměněny některé své aktivity a sledovala jsem jejich vliv na vstup vápníku.

Mechanismus, jakým toxin působí na cílové buňky, není přesně prozkoumaný, a proto jakýkoliv výsledek, který přispěje k objasnění funkce ACT, může přispět k zlepšení terapeutického využití tohoto toxinu.

3. Literární přehled

3.1 Bakterie *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je aerobní gramnegativní bakterie, která způsobuje infekční respirační onemocnění černý kašel (pertuse). Její buňky mají krátký ovoidní tvar, jsou nepohyblivé a tvoří spory. Poprvé byla bakterie spatřena pod mikroskopem v roce 1900 ve sputu pacienta trpícího černým kašlem. Pro laboratorní záchyt bakterie se využívají obohacené půdy, např. Bordetova-Gengouova půda: agar s defibrinovanou beraní krví, bramborovou infuzí a glycerolem. Na této půdě byla bakterie také poprvé zachycena v roce 1906, kdy Bordet a Gengou izolovali tuto bakterii z řasinkovitého epitelu horních cest dýchacích (MAŠÍN 2005).

Onemocnění je přenášeno kapénkovou infekcí. Inkubační doba je šest až devět dnů. V prvním stadiu onemocnění dochází ke kolonizaci epitelu horních dýchacích cest. Zpočátku onemocnění připomíná obyčejné nachlazení s nevýrazným kašlem. V dalším stadiu dochází k pomnožení bakterie s následnou produkcí toxinů, a to má za následek odumírání řasinkového epitelu. V tomto stadiu se onemocnění dobře léčí antibiotiky chloramfenikolem a ampicilinem. V další fázi dochází k typickým záchvatům kašle, nadměrné produkci hlenu, zvracení a křečím. V poslední fázi nemoci příznaky mizí. V této fázi se v plicích již nevyskytují živé bakterie. Nejohroženější skupinou jsou předškolní děti, kojenci a batolata (MATTOO a CHERRY 2005).

Ve vyspělých zemích byla tato nemoc odstraněna pomocí masivního očkování, ale v zemích třetího světa každý rok onemocní až 50 miliónů lidí, a z toho 300 000 ročně zemře.

Celobuněčná vakcína proti černému kašli byla vyvinuta v roce 1940 a byla připravována chemickou nebo tepelnou inaktivací bakterie *Bordetella pertussis*. V současné době se u nás očkuje celobuněčnou vakcínou v kombinaci s difterickým a tetanovým toxoidem. Navzdory očkování se černý kašel začíná vracet i do vyspělých zemí. Příčinou je patrně slábnutí specifické ochranné imunity dospělých jedinců, ke kterému dochází s prodlužujícím se odstupem po očkování. Následkem toho dochází k přenosu infekce z asymptomatických, ale nakažených jedinců na neimunizované malé děti (GLAZKA 1992). Bylo zjištěno, že celobuněčná vakcína proti pertusi má na lidský organizmus řadu vedlejších účinků, jako je nevolnost, teplota nebo zvracení. ACT jako hlavní

virulenční faktor bakterie *Bordetella pertussis* by mohl být vhodným kandidátem pro novou bezbuněčnou vakcínu proti pertusi (WEISS *et al.* 1984).

3.1.1 Virulenční faktory bakterie *Bordetella pertussis*

Virulenční faktory umožňují bakterii vstupovat do organismu, bránit se imunitním reakcím hostitele a pomnožovat se v napadeném hostiteli. Virulenční faktory bakterií lze rozdělit do dvou základních skupin: adheziny a toxiny.

Hlavní adhezivní molekulou bakterie *Bordetella pertussis* je filamentózní hemagglutinin (FHA). FHA je syntetizován jako prekurzor o relativní molekulové hmotnosti 367 kDa, který je dále upraven na 220 kDa. FHA je asociován s vnější bakteriální membránou nebo je také sekretován do extracelulárního prostředí (MATTOO a CHERRY 2005).

Dalším faktorem patřící mezi adheziny jsou fimbrie. Fimbrie jsou krátká vlákna na povrchu bakterie, které spolu s FHA pomáhají při adhezi bakterie k buňkám respiračního epitelu (MATTOO a CHERRY 2005).

Toxiny bakterie jsou známy čtyři: dermonekrotický, tracheální, pertusový a adenylát cyklázový toxin.

Dermonekrotický toxin je protein o relativní molekulové hmotnosti 160 kDa. Toxin se skládá ze dvou hlavních částí: z N-terminální části (skládá se z 54 aminokyselinových zbytků) a z C-terminální části (300 aminokyselinových zbytků). Toxin patří mezi tzv. A-B toxiny- to znamená, že jedna část toxinu je vazebná (N-konec) a druhá část je enzymatická (C-konec). C-terminální část aktivuje malý GTP-vazebný protein Rho, který indukuje morfologické změny buňky, stimuluje DNA replikaci a narušuje diferenciaci a proliferaci cílových buněk (MATTOO a CHERRY 2005).

Tracheální cytotoxin je peptidoglykan, který stimuluje uvolňování cytokinů- zejména interleukinů 1 (IL-1). IL-1 poté indukuje tvorbu syntázy oxidu dusného. To vede k nadprodukcí oxidu dusného pohárkovými buňkami sliznice, což následně způsobuje poškozování sousedících řasinkovitých epitelálních buněk (MAŠÍN 2005, MATTOO a CHERRY 2005).

Pertusový toxin patří ke klíčovým virulentním faktorům bakterie. Jedná se o protein o velikosti 117 kDa, patřící k A-B toxinům. Skládá se ze šesti podjednotek, označovaných jako S1 až S5. S1 podjednotka je enzymatická a pět podjednotek (S2, S3, 2x S4 a S5) vazebných. Enzymatická podjednotka katalyzuje v cytozolu hostitelské

buňky přenos ADP-ribozylu 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 adenylátcyklázu. Tím buňka ztrácí kontrolu nad hladinou adenosin - 3', 5'-cyklického monofosfátu (MATTOO a CHERRY 2005).

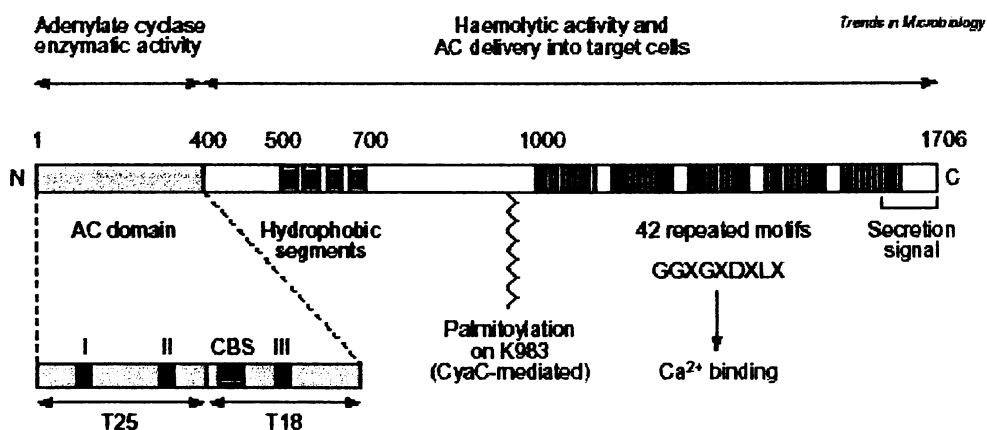
Adenylátcyklázový toxin je podrobně popsán v následující kapitole.

3.2 Adenylátcyklázový toxin (ACT)

Adenylátcyklázový toxin je klíčový virulenci faktor bakterie *Bordetella pertussis*. Bakterie mutantní v genu pro adenylátcyklázový toxin je totiž zcela avirulentní (GROSS *et al.* 1992).

3.2.1 Struktura ACT

ACT je protein tvořený 1706 aminokyselinovými zbytky o relativní molekulové hmotnosti 177 kDa. Je syntetizován jako inaktivní prekurzor a postranlačně palmitoylován proteinem CyaC na Lys 983. Skládá se z adenylátcyklázové (AC doména) části zahrnující 400 aminokyselinových zbytků a C-koncové části s hemolytickou aktivitou obsahující 1306 aminokyselinových zbytků (LADANT a ULLMANN 1999; viz obr. 1).



Obr.1: Strukturní organizace CyaA (LADANT a ULLMANN 1999)

AC doména se skládá ze dvou subdomén T25 a T18. Doména T25 (1-224) obsahuje ATP-vazebné místo v oblasti aminokyselinových zbytků 54-70. Doména T18

(225-399) obsahuje vazebné místo pro kalmodulin v okolí tryptofanového zbytku 242 (GLASER *et al.* 1989).

C-koncová doména (RTX hemolyzín) zabezpečuje interakci ACT s membránou cílových buněk. Hlavní funkcí hemolyzínové části toxinu je patrně zabezpečit translokaci AC domény přes membránu napadených buněk.

Hemolyzínová část ACT se skládá z několika částí:

- oblast hydrofóbních segmentů (500-700) . Hydrofóbní oblast má schopnost v biologických membránách tvořit kanály selektivní pro kationty. To má za následek transport iontů přes membránu a osmotickou lyzi napadených buněk (OSIČKOVÁ *et al.* 1999).
- acylační doména (701-1005), kde dochází k posttranslační modifikaci ϵ -aminoskupiny lyzínu v poloze 983 kyselinou palmitovou za účasti proteinu CyaC (posttranslační modifikace je podrobněji popsána v následující kapitole)
- oblast 45 nonapeptidových repetitivních sekvencí (1006-1638) bohatých na glycin a aspartát, obsahující hlavní místo toxinu, kde se váže vápník. Tyto repetitivní sekvence jsou společné pro všechny RTX toxiny, tedy skupinu, kam patří i ACT. Podle afinity k vápenatým iontům mohou být vazebná místa rozdělena do dvou tříd: tři až pět míst s extrémě vysokou afinitou ($K_d \sim 0,3 \mu\text{M}$), která vážou vápenaté ionty prakticky ireverzibilně. Ostatní vazebná místa vážou vápník s nízkou afinitou ($K_d \sim 10 \mu\text{M}$). Vazba vápníku do vysoko- i nízkoafinních míst vyvolává výrazné konformační změny v molekule ACT, které jsou nutnou podmínkou pro schopnost toxinu dopravovat katalytickou AC-doménu přes biologické membrány buněk (MAŠÍN 2005). Byly vyzkoušeny i ostatní dvojmocné ionty (např. Mg, Sr, a Ba), zda nemají podobný efekt jako vápník. Pouze stroncium (při koncentraci 3 mM) způsobuje velmi malý vzestup CyaA aktivity, ale v porovnání s vápníkem s mnohem menší účinností (KNAPP *et al.* 2003).
- oblast sekrečního signálu, tvořeného převážně sekvencí záporně nabitých aminokyselin (ŠEBO a LADANT 1993).

3.2.2 Posttranslační modifikace ACT

Jak už bylo uvedeno v předcházející kapitole, ACT je syntetizován jako inaktivní prekurzor (protoxin). Aktivním se stává kovalentním navázáním zbytku kyseliny palmitové na ϵ -aminoskupině lyzinu v pozici 983. Acylaci zprostředkovává protein CyaC o molekulové hmotnost 20 kDa, který katalyzuje přenos zbytku kyseliny palmitové z acyl-ACP (acyl carrier protein) na protoxin. CyaC je exprimován spolu s protoxinem ACT v bakterii *Bordetella pertussis* (BASAR *et al.* 2001).

Srovnáním rekombinantního ACT (rACT), získaného z *Escherichia coli* a ACT získaného z *Bordetella pertussis* (bpACT) vyšlo najevo, že kapacita tvorby iontových kanálů a hemolytická aktivita je u rACT řádově nižší než u bpACT, přestože charakteristiky kanálů tvořených oběma proteiny byly identické (BENZ *et al.* 1994). Zatímco ACT z *Bordetella pertussis* má na lyzinu 983 navázán zbytek kyseliny palmitové, rekombinantní ACT má navázán zbytek kyseliny palmitové nebo palmitoolejové (BASAR *et al.* 1999). U obou toxinů byla nalezena acylace i na lyzinu v pozici 860, která je zřejmě důležitá pro zachování aktivit toxinu (HAVLÍČEK *et al.* 2001).

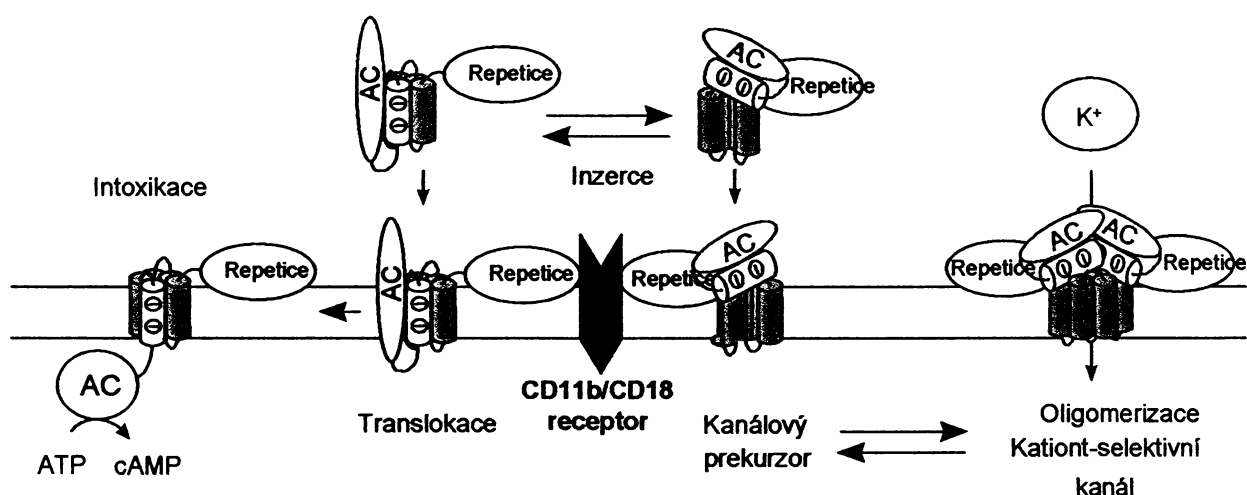
3.2.3 Působení ACT na cílovou buňku

Adenylátcyklázový toxin má schopnost pronikat přes membránu nejrůznějších buněk. Dlouho se proto předpokládalo, že ACT k vazbě na membránu nepotřebuje žádný specifický receptor. Nedávno byl na myeloidních buňkách objeven receptor – integrín (CD11b/CD18), ke kterému se váže toxin svou repetitivní doménou (GUERMONPREZ *et al.* 2001, EL-AZAMI-EL-IDRISSI *et al.* 2003). Vazba ACT na buňky exprimující tento receptor je mnohem efektivnější než vazba na buňky, které receptor neexprimují.

Po interakci ACT s membránou buněk je toxin schopen dopravovat svou AC doménu do cytoplazmy napadených buněk. AC doména po navázání kalmodulinu v cytoplazmě katalyzuje přeměnu ATP na cAMP. Koncentrace cAMP v buňce může dosáhnout až 2 mM. Jelikož je cAMP klíčovou molekulou buněčné signalizace, dochází ke ztrátě schopnosti efektorových buněk imunitního systému fagocytovat mikroorganismy a vykonávat další fyziologické funkce nezbytné k likvidaci patogena (HANSKI 1989).

Pro jednotlivé kroky interakce ACT s membránou buněk, které neobsahují integrinový receptor, musí být splněny tyto podmínky:

- Pro **inzerci toxinu** do membrány –musí být obsazena vysokoafinní místa vápenatými ionty
- Pro **translokaci AC domény přes membránu** –přítomnost zbytku mastné kyseliny na lyzinu v pozici 983 (BASAR *et al.* 2001), teplota vyšší než 20°C (ROGEL a HANSKI 1992), přítomnost membránového potenciálu a nutnost obsazení vysokoafinních i nízkoafinních vazebních míst vápenatými ionty (ROSE *et al.* 1995).
- Pro **tvorbu kationt selektivních kanálů** –musí být přítomna hydrofóbní oblast ACT (AC doména ani repetitivní oblasti se nepodílejí na tvorbě kanálů). Kanály tvořené v membráně jsou selektivní pro kationty. Transport iontů a vody těmito kanály může způsobit osmotickou lyzi napadených buněk, která se projevuje jako hemolytická aktivita vůči erytrocytům (BELLALOU *et al.* 1990).
- Pro **hemolytickou aktivitu na erythrocytech**–nutnost acylace lyzinu 983 zbytkem kyseliny palmitové a přítomnost iontů Ca^{2+} (GRAY *et al.* 1998).

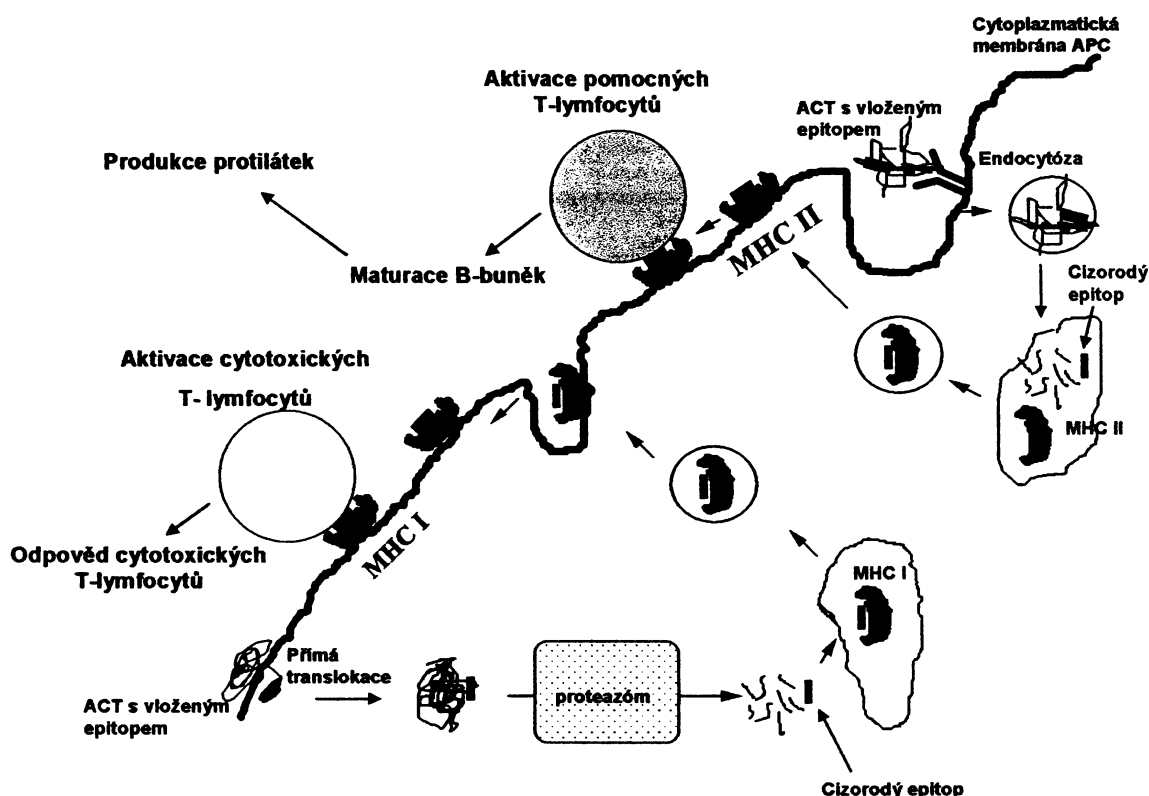


Obr.2: Model interakce ACT s membránou (OSIČKOVÁ *et al.* 1999). Toxin se může vázat do membrány nezávisle na receptoru nebo pomocí receptoru. Pro tvorbu kanálu musí ACT oligomerizovat, k translokaci AC domény zřejmě stačí toxin ve formě monomeru.

Původně se předpokládalo, že AC doména se do cytoplazmy napadených buněk dostává tak, že prochází membránovým kanálem tvořeným hemolyzínovou částí. Po zjištění efektivního průměru kanálu (0,6-0,8 nm), byla tato hypotéza zavržena (BENZ *et al.* 1994). Průměr kanálu je příliš malý, aby jím prošel i zcela rozvinutý polypeptidový řetězec. Dalším zjištěním bylo, že translokace AC domény je lineárně závislá na koncentraci toxinu, zatímco tvorba membránových kanálů má sigmoidní průběh (OTERO *et al.* 1995). Tyto výsledky naznačují, že se jedná o dva rozdílné mechanismy. Byl proto navržen nový model interakce ACT s membránou (OSIČKOVÁ *et al.* 1999, obr. 2). Tento model předpokládá existenci dvou konformací na membráně: translokační a kanálovou konformaci. Translokační konformace (pravděpodobně ve formě monomeru) po inzerci ACT do membrány translokuje AC doménu do cytoplazmy napadených buněk, kanálová konformace ve formě oligomerů vytváří v membráně kanály.

3.2.4 Využití ACT pro dopravu cizorodých antigenů do antigenprezentujících buněk

Vzhledem ke schopnosti ACT přímo translokovat svoji AC doménu přes plazmatickou membránu buněk, používá se detoxifikovaný ACT jako nosič antigenů pro navození specifické CD8⁺ buněčné odpovědi cytotoxických T-lymfocytů proti epitopům vloženým do ACT. Epitopy se vkládají do ACT mezi zbytky 188 a 189, čímž se zruší schopnost ACT tvořit cAMP v buňce, ale nezruší se schopnost přímé translokace přes plazmatickou membránu buněk. Po translokaci ACT s vloženým epitopem dochází k jejich degradaci v proteazomu (ŠIMŠOVÁ 2004). Epitop je transportován pomocí peptidové pumpy (TAP) do endoplazmatického retikula, kde se váže k MHC glykoproteinu I.třídy. MHC molekula s epitopem je prezentována na buněčném povrchu, kde dochází k aktivaci cytotoxických T-lymfocytů (obr. 3).



Obr. 3: Dva různé mechanismy prezentace cizorodých epitopů nesených ACT na povrchu antigen-prezentujících buněk (přejato z MAŠÍN 2005)

K prezentaci MHC II.třídy dochází prostřednictvím receptorem zprostředkované endocytózy ACT s vloženým epitopem v antigen-prezentujících buňkách. Po prezentaci MHC s epitopem na povrchu buněk dochází k aktivaci pomocných T-buněk, které indukují pomnožení a diferenciaci B-buněk. Po diferenciaci vznikají z B-buněk paměťové buňky a plazmatické buňky, které sekretují protilátky (obr. 3, HOŘEJŠÍ 2001).

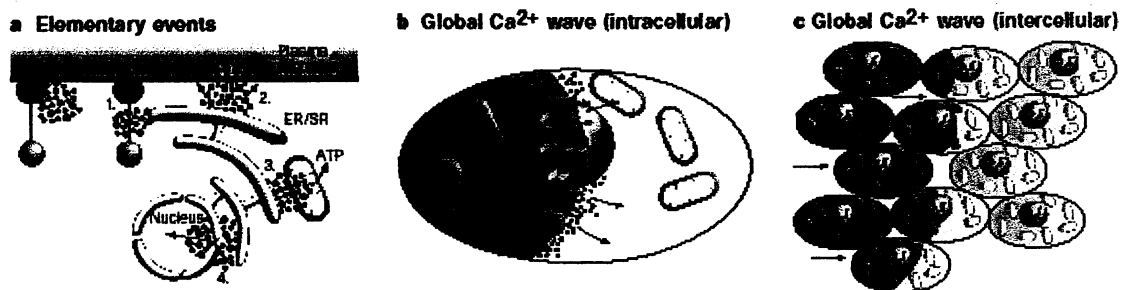
3.3 Vápníková signalizace

Vápník funguje v buňkách jako univerzální intracelulární posel, který hraje klíčovou roli v buněčné signalizaci. Změny koncentrace volného cytozolického vápníku mají v buňkách velký význam pro změny v genové expresi, buněčnou proliferaci, změny v cytoskeletu nebo pro spuštění programované buněčné smrti (DUKE *et al.* 1994). Je známa řada bakteriálních patogenů a jejich toxinů, které mohou po interakci s

cílovou buňkou vyvolat změnu koncentrace volného vápníku v cytoplazmě (NHIEU *et al.* 2004).

Extracelulární koncentrace vápenatých iontů je přibližně 1-2 mmol/l. Naproti tomu je hladina intracelulárního vápníku udržována na nízké úrovni 20-100 nmol/l. Nízká cytoplazmatická koncentrace volného vápníku je udržována zejména aktivními transportními mechanizmy, které vápenaté ionty odčerpávají z cytoplazmy. Pro vytvoření signálu je nezbytné zvýšení koncentrace vápníku. Dlouhodobé zvýšení koncentrace vápníku ale může být pro buňky letální (BERRIDGE *et al.* 1998). Aby se při signalizaci předešlo dlouhodobě zvýšené hladině Ca^{2+} v cytozolu, buňky používají pro navození vápníkové odpovědi opakující se signály známé jako vápníkové oscilace.

Vápníková signalizace může být dvojího typu: elementární a globální (BERRIDGE *et al.* 1998). Elementární typ signalizace vytváří lokální změny v intracelulární koncentraci vápníku, které vedou například k exportu buněčného materiálu, otevření K^+ kanálů, změně v metabolismu mitochondrií, vstupu vápníku do jádra a dalším aktivitám (obr. 4a). Koordinací aktivity elementárních signálů vzniká komplexnější globální vlna, která se šíří celou buňkou (obr. 4b).



Obr.4: a-schéma elementárního signálu, který je výsledkem vstupu extracelulárního vápníku přes plazmatickou membránu nebo uvolnění vápníku z intracelulárních zásob v buňce. Vápník pomáhá aktivovat procesy zahrnující např. export buněčného materiálu (1), otevírání draslíkových kanálů (2) nebo se účastní metabolismu mitochondrie (3) a může také vstupovat do jádra (4). b- schéma globální vlny na intracelulární úrovni. c- schéma globální vlny na intercelulární úrovni. (BERRIDGE *et al.* 1998)

Příkladem obou typů signálů může být situace v hladkém svalu, kde elementární signál (lokální vzrůst vápníku) vznikající blízko plazmatické membrány aktivuje draslíkové kanály, což má za následek relaxaci svalu. Koordinací aktivity elementárních signálů v buňce vzniká globální vlna vápníku, což má za následek svalovou kontrakci. To je příklad toho, jak prostorové uspořádání umožňuje vápníku aktivovat i opačné procesy v jedné buňce.

Jestliže jsou buňky propojeny, intracelulární vlna se může šířit do sousedních buněk a vyvolat tak buněčné odpovědi na úrovni tkáně (BERRIDGE *et al.* 1998, obr. 4c).

3.4 Vápníkové kanály v eukaryotní buňce

Koncentrace vápenatých iontů v buňkách je citlivě regulována. Zvýšení intracelulární koncentrace je dána vstupem vápníku z extracelulárního prostředí nebo uvolněním vápníku z intracelulárních zásob uložených v endoplazmatickém retikulu (ER) nebo sarkoplazmatickém retikulu (SR). Ostatní buněčné orgány, zejména mitochondrie, mohou také sloužit jako vnitrobuněčná zásobárna vápenatých iontů (RIZZUTO 2000).

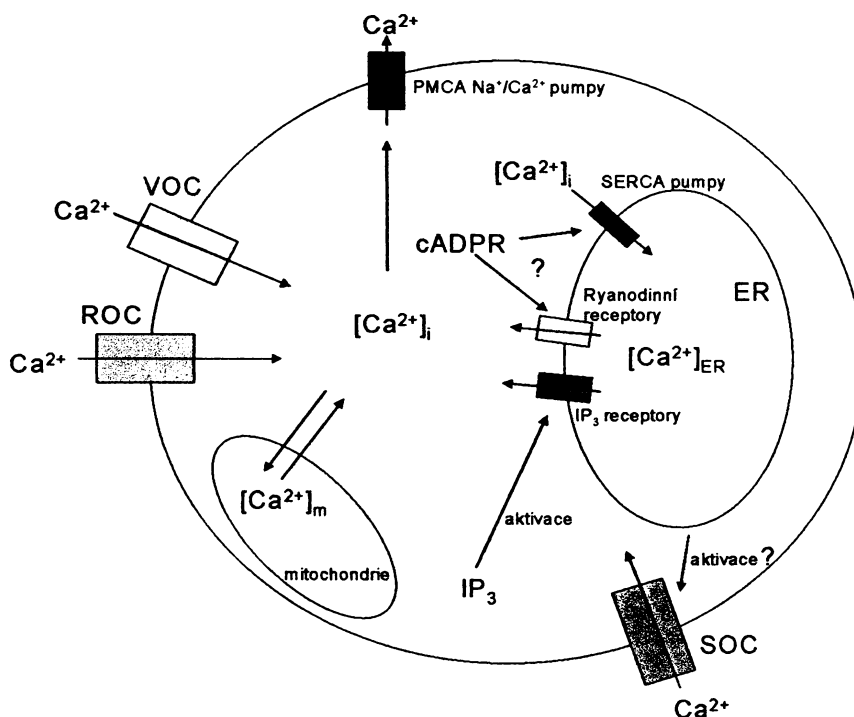
Vápník z vnějšího prostředí může vstupovat do buňky přes napětově ovládané kanály (VOC), receptorem ovládané kanály (ROC) nebo pomocí kanálu ovládaného intracelulární zásobou vápníku (SOC), který se otevírá po vyčerpání intracelulárních zásob v ER (obr. 5).

Vápník uskladněný v ER je uvolňován pomocí kanálů, které jsou spojeny s receptory. Po navázání ligandu na receptor změní receptor svou konformaci, a tak otevře kanál pro průchod iontů přes membránu. Mezi tyto receptory patří inositol trifosfátový (IP_3R) a ryanoidní receptor (obr. 5). IP_3R je aktivován navázáním inositol trifosfátu, který je produkován po aktivaci fosfolipázy C (PLC). PLC je aktivována po navázání hormonu nebo růstového faktoru na specifický receptor na povrchu buňky.

Vápník, který se uvolňuje z ER, je zčásti vychytáván mitochondriemi, které vracejí vápník zpátky do ER. Tímto způsobem může mitochondrie snížit koncentraci uvolněného vápníku při jeho delším výtoku z ER. Mitochondrie tak chrání buňku před poškozením vlivem vysoké koncentrace vápníku v buňce. Je-li mitochondrie

„přetížená“ vysokou koncentrací vápníku, vede to k jejímu abnormálnímu metabolismu, který může skončit až apoptózou buňky (BERRIDGE *et al.* 1998).

Podrobný popis jednotlivých vápníkových kanálů je uveden v následujících kapitolách.



Obr. 5: Základní mechanismy buněčné vápníkové signalizace (přejato z MAŠÍN 2005). Ke změně cytoplazmatické koncentrace vápníku dochází:

- 1) vstupem vápníku do cytoplazmy z extracelulárního prostředí přes kanály, lokalizované v cytoplazmatické membráně-VOC,ROC,SOC
- 2) vstupem vápníku do cytoplazmy kanály v membráně endoplazmatického/ sarkoplazmatického retikula-IP₃ a ryanoidní receptory.

Vysvětlivky: SERCA pumpy jsou ATPázy čerpající vápník z cytozolu buňky do endoplazmatického/ sarkoplazmatického retikula, PMCA jsou ATPázy pumpující vápník z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. IP₃ – inositol trisfosfát, cADPR - cyklická adenosin difosforibóza, ER-endoplazmatické retikulum.

3.4.1 Receptorem ovládaný kanál: (ROC)

Tento kanál tvoří spolu s receptorem komplex, který prostupuje cytoplazmatickou membránou. Obsahuje extracelulární část, kam se může vázat ligand. Po navázání ligandu na receptor podstupuje tento receptor konformační změnu, která má za následek otevření kanálu (DOLPHIN 2001). Existuje několik typů ROC, které jsou aktivovány různými ligandy mezi které patří např. ATP, serotonin, glutamát nebo acetylcholin (BOOTMAN a LIPP 2001).

Mezi receptorem-ovládané kanály patří například kanály spouštěné cyklickými nukleotidy. Ty jsou kotveny v membráně pomocí šesti transmembránových domén. N-

koncová část proteinu obsahuje vazebné místo pro kalmodulin a v C-koncové části proteinu se nachází vazebné místo pro cAMP nebo cGMP (KRAMER 2001).

Další skupinou receptorem-ovládaných kanálů jsou iontové kanály, které jsou schopné kromě vápenatých iontů vést i ionty K^+ a Na^+ . Mezi tento typ kanálů patří například P2X receptory. P2X receptory jsou iontové kanály v cytoplazmatické membráně regulované extracelulárním ATP (DOLPHIN 2001), které mohou přenášet ionty Ca^{2+} , K^+ a Na^+ . Tyto receptory jsou kotveny v membráně pomocí dvou transmembránových domén, oddělených dlouhou extracelulární smyčkou. C a N-koncová část receptoru se nachází na cytoplazmatické straně membrány.

3.4.2 Kanál ovládaný intracelulární zásobou vápníku: (SOC)

Intracelulární zásoby vápníku jsou uloženy hlavně v endoplazmatickém retikulu (resp. sarkoplazmatickém retikulu) a v mitochondrii. Zásoby vápníku v ER jsou omezené, a proto při snížení těchto zásob na určitou hranici se aktivuje SOC kanál (Sore-Operated Channel) na plazmatické membráně, kterým vstupuje vápník z extracelulárního prostředí do buňky (BOOTMAN a LIPP 2001).

Zatím se přesně neví, jak dochází k aktivaci SOC kanálů po vyprázdnění intracelulárních zásob. Bylo navrženo několik modelů:

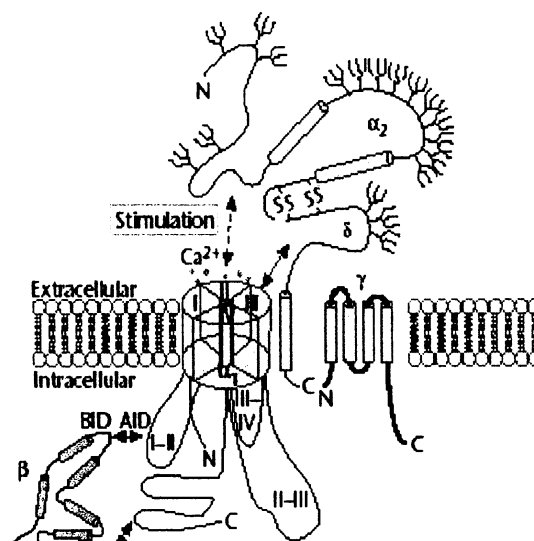
- prvním modelem je produkce difúzibilního posla, který je po vyprázdnění intracelulárních zásob uvolňován do cytoplazmy, kde aktivuje SOC kanály. Mezi difúzibilní posly patří např. Ca^{2+} faktor (nízkomolekulární faktor uvolňovaný z ER), protein kináza C, kalmodulin, atd. (PAREKH a PUTNEY 2005)
- dalším modelem je aktivace SOC kanálů přímou interakcí s IP_3 kanály, které se nalézají v membráně ER. Předlohou tohoto modelu bylo zjištění, že v buňce kosterního svalu je Ca^{2+} kanál fyzicky spojen s ryanoidním kanálem, který se nalézá v sarkoplazmatickém retikulu (PAREKH a PUTNEY 2005)
- posledním modelem je fúze váčků (nacházejících se v cytoplazmě) obsahující SOC kanály s cytoplasmatickou membránou při depleci vnitrobuněčných zásob vápenatých iontů (PAREKH a PUTNEY 2005).

3.4.3 Napětím ovládaný kanál: (VOC)

Tento kanál je nejlépe prostudovaným vápníkovým kanálem a hraje důležitou roli při vstupu vápníku do buňky například po její interakci s hemolysinem *Escherichia coli*. Přestože se o kanálu ví hodně, úloha jednotlivých proteinů není moc prostudována.

Nalézají se hlavně na plazmatické membráně vzrušivých buněk (např. svalová a nervová buňka). Kanál se skládá z pěti proteinů: α_1 , α_2 , β , γ a δ (obr. 6):

- podjednotka α_1 : Sekvence α_1 podjednotky z kosterního svalu obsahuje 1873 aminokyselin, hydrofobní část obsahuje 24 transmembránových segmentů uspořádaných do čtyř repetitivních domén (DOLPHIN 2001). Průchod kanálem může být blokován těžkými kovy (např. Co^{2+} a Cd^{2+}), které se silně vážají místo vápníku na vazebná místa kanálu.



Obr.6 Schéma napětím ovládaného kanálu (DOLPHIN 2001)

- podjednotka β : váže se na oblasti bohaté na prolín α_1 podjednotky a zřejmě slouží k přichycení α_1 podjednotky k ostatním proteinům.
- podjednotky α_2 a δ : podjednotky jsou produktem stejného genu a vznikají posttranslačním proteolytickým štěpením. α_2 podjednotka je připojena disulfidickými můstky k transmembránové δ podjednotce.
- podjednotka γ : tento protein má relativní molekulovou hmotnost okolo 25 kDa a má čtyři transmembránové domény.

Existuje několik typů napětím-ovládaných kanálů: T,L,N,P/Q a R typy. Nejrozšířenější typy jsou T a L. (DOLPHIN 2001). Kanály typu T je aktivován malou depolarizací membrány a po odeznění depolarizace dochází k jejich rychlé inaktivaci. Tyto kanály se nazývají T-typy podle anglického slova „transient“. Jsou méně vodivé pro vápenaté ionty než typ L. L-typ napětově-řízených kanálů je naopak aktivovaný vysokou depolarizací a zůstává otevřený delší dobu (L-od „long-lasting“). L-typ kanálu vykazuje vyšší vodivost pro vápenaté ionty (DOLPHIN 2001).

3.4.4 Inositol trifosfátový receptorový kanál: (IP₃ kanál)

Kanál se skládá ze čtyř proteinových podjednotek, každá je složena přibližně z 2700 aminokyselin. Jeho celková molekulová hmotnost je asi 1200 kDa a nalézá se na membráně ER nebo SR.

Ligandy, které se váží na specifické receptory na povrchu plazmatické membrány buňky (např. hormony, růstové faktory), vyvolávají tvorbu intracelulárního posla: inositol-1,4,5-trifosfátu (IP₃). Produkce inositol trifosfátu je řízena enzymem fosfolipázou C, která štěpí fosfatidylinositol difosfát na inositol trifosfát a diacylglycerol. Ačkoliv je inositol trifosfát odvozen od lipidu, je rozpustný ve vodě a difunduje do buněk, kde se váže na inositol trifosfátový receptorový kanál na endoplazmatickém nebo sarkoplazmatickém retikulu (BOOTMAN a LIPP 2001). Vazba IP₃ na N-terminální část mění konformaci receptoru, což má za následek otevření kanálu. To umožní vápníku uvolnit se z ER nebo SR do cytozolu buňky. Na jeden receptor se mohou vázat maximálně čtyři IP₃ (na každou podjednotku jeden). N-terminální část obsahuje místa, kam se váže ATP (DOLPHIN 2001).

Ačkoliv receptor požaduje IP₃ k otevření kanálu, aktivace receptoru je zároveň regulována koncentrací vápníku v cytozolu. Po menším vzestupu vápníku v cytozolu (0,5-1 μmol/l) se kanál otevře, zatímco vysoká koncentrace vápníku (>1 μmol/l) inhibuje jeho otevření (BOOTMAN a LIPP 2001).

3.4.5 Ryanoidní receptorový kanál: (RyR)

Receptor je strukturně a funkčně velmi podobný inositol trifosfátovému kanálu, ačkoliv má přibližně dvakrát větší molekulovou hmotnost. Každý monomer má přes 5000 aminokyselin a molekulová hmotnost tetrameru je asi $2 \cdot 10^6$ Da.

Dalším společným znakem RyR a IP_3 kanálu je citlivost k cytozolické koncentraci vápníku. RyR je aktivován při koncentraci 1-10 $\mu\text{mol/l}$ vápníku v cytozolu a inhibován je při koncentraci vápníku vyšší než 10 $\mu\text{mol/l}$. Na rozdíl od IP_3 kanálu je tento receptor přítomen ve větším množství ve vzrušivých buňkách jako jsou např. svalové buňky a neurony.

Ryanoidní receptory dostaly název podle jejich vysoké afinity k rostlinnému alkaloidu, ryanodinu. Ryanodín blokuje kanál a nechává ho v otevřeném stavu, což má za následek vyprázdnění intracelulárních zásob vápníku. Vysoká koncentrace ryanodinu ($\sim 100 \mu\text{mol/l}$) nevratně inhibuje otevření kanálu (BOOTMAN a LIPP 2001).

3.4.6 Sfingolipidový Ca^{2+} kanál endoplazmatického retikula: (SCaMPER)

SCaMPER je Ca^{2+} výtokový kanál reagující na lipid sfingosylfosfocholin, jehož koncentrace uvnitř buňky se zvýší po stimulaci s růstovým hormonem (BOOTMAN a LIPP 2001). SCaMPER nevykazuje žádnou strukturní podobnost s IP_3 kanálem a s RyR-receptorem a oproti nim je i malý (okolo 20 kDa). Přestože se nachází v mnoha typech tkání (srdeční sval, pankreas, játra), vlastnosti a fyziologická funkce tohoto kanálu nejsou moc známy.

3.5 Toxiny ovlivňující vápníkovou signalizaci

Jak již bylo uvedeno v kapitole 3.3, je známa řada bakteriálních patogenů a jejich toxinů, které po interakci s cílovou buňkou mohou ovlivnit její vápníkovou signalizaci. V následujících kapitolách jsou popsány některé toxiny, které tuto signalizaci ovlivňují.

3.5.1 α -hemolyzín *Escherichia coli*:

Hemolyzín (HlyA) je RTX toxin produkovaný kmenem *Escherichia coli* ARD6, který způsobuje pyelonefritidu. Pyelonefritida je jedna z nejčastějších horečnatých onemocnění u dětí. Jestliže není ihned léčena, může způsobit nevratné poškození až selhání ledvin (UHLÉN *et al.* 2000).

Infekce bakterií *E.coli* vyvolává v buňkách proximálních tubulů ledvin oscilaci intracelulárního vápníku, která je způsobena sekrecí hemolyzínu. Oscilace se objevuje asi 30 minut po vystavení buněk s bakterií a trvají nejméně 60 minut. Předpokládá se, že tyto oscilace spouští napadená buňka jako obranný mechanismus proti dlouhodobě zvýšené intracelulární koncentraci Ca^{2+} . Tyto oscilace spouští změny v genové expresi, neboť indukují tvorbu cytokinů IL-6 a IL-8. Oscilace je odstraněna použitím nifedipinu, který blokuje napětově-ovládaný kanál L-typu a pomocí 2-APB (2-aminoethyl difenyl borinát), který blokuje IP_3 receptorový kanál. To znamená, že odpověď buňky závisí na vstupu vápníku přes plazmatickou membránu napětově ovládaným kanálem (VOC) a na uvolnění vápníku z vnitřních zásob aktivací IP_3 receptoru (UHLÉN *et al.* 2000). Nejedná se tedy o vstup vápníku do cytoplazmy buňky přes póry tvořené přímo α -hemolyzínem.

3.5.2 Listeriolyzín O bakterie *Listeria monocytogenes*:

Listeria monocytogenes je enteroinvazivní patogen, který způsobuje meningitidu a encefalitidu.

Listeriolyzín O (LLO) patří k rodině toxinů, které vyžadují mikrodomény v cytoplazmatické membráně (bohaté na cholesterol) pro inzerci a oligomerizaci do membrány buněk (GOLDFINE a WADSWORTH 2002). LLO vytváří pór -o průměru 20-30nm- v buněčné membráně, který kolísá mezi otevřeným a zavřeným stavem a

kteřý vykazuje malou specifitu pro ionty (DRAMSI a COSSART 2003). Tato aktivita dovoluje vstup vápníku do buňky, což vede k déle-trvající odpovědi v podobě oscilací (NHIEU 2004). Již dříve bylo ukázáno (WADSWORTH a GOLDFINE 1999), že bakterie *Listeria monocytogenes* je schopna vyvolat po interakci s makrofágy J774 celkem tři vlny změn v koncentraci vnitrobuněčného vápníku. Ukázalo se, že první vzestup hladiny $[Ca^{2+}]_i$ je dán vstupem vápníku z extracelulárního prostředí přes receptorem ovládané kanály v cytoplazmatické membráně. Druhé a třetí zvýšení hladiny cytozolického vápníku bylo dáno jeho uvolněním z endoplazmatického retikula přes IP_3 -řizené kanály. Bylo zjištěno, že listeriolyzin může ovlivněním vápníkové signalizace regulovat kinetiku fagocytózy, případně únik z fagozómu, což zvyšuje šanci bakterie přežít v makrofázích.

3.5.3 Anthrax edema toxin bakterie *Bacillus anthracis*

Anthrax patří mezi tzv. zoonózy, tedy onemocnění, které se přenáší ze zvířete na člověka a jeho původcem je *Bacillus anthracis*, gram-pozitivní a sporulující bakterie, která produkuje exotoxin.

Exotoxin se skládá ze tří složek: PA, EF a LF (angl. PA-„protective antigen“, EF-„edema factor“ a LF- „lethal factor“). Tyto tři složky nejsou toxické, účinkují-li každá zvlášť. PA se váže na receptory na povrchu cílové buňky a usnadňuje vstup edema faktoru do těchto buněk. Edema faktor je kalmodulinem aktivovaná adenylát cykláza, která katalyzuje syntézu cAMP v cytozolu hostitelských buněk (KUMAR *et al.* 2002). Po přidání PA a EF k lymfocytům různého typu dochází v cytoplasmě buněk k rychlé akumulaci iontů Ca^{2+} (KUMAR *et al.*, 2002). Vápenaté kationty pocházejí z extracelulárního prostředí a jejich vstup do cytozolu je nutný pro intoxikaci buněk cAMP. Vápenaté ionty se vážou na kalmodulin, který se stává aktivním a aktivuje adenylát cyklázu EF. Tvorbou cAMP narušuje toxin imunitní odpověď buněk a tak přispívá k přežití bakterie v hostitelském organismu.

3.5.4 Aerolyzín bakterie *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila u člověka způsobuje různá onemocnění- od gastroenteritidy až po septikémii. Aerolyzín hraje důležitou roli v patogenitě bakterie, protože imunizace proti tomuto toxinu má protektivní účinek při infekci tímto patogenem.

Toxin je sekretován jako inaktivní dimerický prekurzor (proaerolyzín), který se stává aktivním po proteolytickém štěpení C-konce v napadené buňce.

Proaerolyzín se na cytoplazmatické membráně váže na proteiny, které jsou uchyceny přes GPI kotvu. Vazba na buněčný povrch vede pravděpodobně k lokálnímu vzrůstu koncentrace toxinu a umožňuje tak aerolyzínu vytvářet heptamerický komplex, který vytváří kanál (KRAUSE *et al.* 1998). Tímto kanálem tvořeným aerolyzínem dochází ke vstupu vápenatých iontů z extracelulárního prostředí do cytozolu buněk. K dalšímu zvýšení intracelulární koncentrace dochází uvolňováním vápníku z endoplazmatického retikula signalizací pomocí G-proteinů, fosfolipázy C a IP₃ (KRAUSE *et al.* 1998).

Je vidět, že mechanismy vstupu vápníku do buněk, který je indukován působením bakteriálních toxinů, mohou být velmi rozmanité.

4. Materiál a metody

4.1 Chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Seznam použitého materiálu a chemikálií

2-aminoethyl diphenyl borinát (2-APB): Sigma, USA

ampicilin: Biotika, SR

akrylamid: Biochemical Corp., USA

Bacto-tryptone: Oxoid, Anglie

Bacto-agar: Oxoid, Anglie

bromfenolová modř: Sigma, USA

Coomassie Brilliant blue R250: Serva, SRN

DEAE-Sepharose: Sigma, USA

dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma, USA

dodecylsulfát sodný (SDS): Serva, SRN

hovězí sérový albumin (BSA): Sigma, USA

chlorid lanthanitý: Sigma, USA

chlorid kademnatý: Sigma, USA

chlorid nikelnatý: Sigma, USA

izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG): Sigma, USA

kvasničný extrakt: Oxoid, Anglie

N,N'-metylenbis-akrylamid: Serva, SRN

močovina: Merck, USA

1-(β -[3-(4-methoxyphenyl) propoxy]-4-methoxyphenethyl)-1H-imidazol hydrochlorid (SK&F 96365): Sigma, USA

nifedipin: Sigma, USA

persulfát amonný (APS): Serva, SRN

Phenyl-Sepharose: Sigma, USA

N,N,N',N'-tetramylethyldiamin (TEMED): Serva, SRN

Thapsigargin: ICN Biomedicals, USA

Tris (hydroxymetyl) aminometan-hydrochlorid (Tris-HCl): Serva, SRN

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

4.1.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy Explorer Pro, Ohaus, USA

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Spektrofluorometr Fluoromax-3, Jobin Yvon Horriba, Francie

Inkubátor pro tkáňové kultury Sanyo MCO-20 AIC, Kanada

Mrazicí box (-20°C), Whirlpool,

Mrazicí box (-80°C), Jouan, Francie

Odstředivka Sorvall RT6000B, Du Pont Instruments, USA

pH-metr, IQ Scientific Instruments, USA

Předvážky Scout Pro, Ohaus, USA

Ultrasonikátor 4710, Cole-Parmer Instruments Co., USA

Vortex MS 1, IKA-Works, USA

Zdroj pro elektroforesu, Vývojové dílny ČSAV, ČR

4.1.3 Použité plazmidy

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

4.1.4 Bakteriální kmeny

Pro manipulaci s DNA i pro intracelulární expresi ACT byl používán bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 Blue (*E. coli* *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'pro AB lac I^ZΔ M15 Th10 (Tet^r)^f*). Bakteriální kmen XL-1 Blue (Stratagene, USA) nese gen pro rezistenci na tetracyklin.

4.1.5 Použité roztoky

Roztok I (pro izolaci plazmidové DNA) pH 8,0

glukóza..... 50 mM

Tris-HCl..... 25 mM

EDTA..... 10 mM

Sterilizuje se autoklávováním při tlaku 0,12 MPa po dobu 15 minut. Uchovává se při 4 °C.

Roztok II (pro izolaci plazmidové DNA)

NaOH..... 0,2 mM

SDS..... 1% (w/v)

Roztok III (pro izolaci plazmidové DNA)

5 M octan draselný60 ml

ledová kyselina octová..... 11,5 ml

H₂O28,5 ml

Uchovává se při 4 °C.

TE pufr (pro izolaci plazmidové DNA) pH 8,0

Tris-HCl..... 10 mM

EDTA..... 1 mM

Bromfenol blue (BFB) (5x koncentrovaný)

bromfenol blue 0,25% (w/v)

glycerol 40% (v/v)

čínidlo Bradfordové pro stanovení proteinů

Coomassie Brilliant blue R2500,01% (w/v)

ethanol47% (v/v)

H₃PO₄.....8,7% (v/v)

Tris-glycinový pufr (pro SDS-PAGE) pH 8,0

Tris..... 25 mM
glycin 250 mM
SDS..... 0,1% (w/v)
Sacharóza 75 mM

TC pufr (pro močovinový extrakt) pH 8,0

Tris-HCl..... 50 mM
CaCl₂..... 0,2 mM

UTN -A pufr (pro DEAE-Sepharose) pH 8,0

Močovina 8 M
Tris-HCl..... 50 mM
NaCl..... 120 mM

UTN -B pufr (pro DEAE-Sepharose) pH 8,0

Močovina 8 M
Tris-HCl..... 50 mM
NaCl..... 2 M

TN pufr (pro Phenyl-Sepharose) pH 8,0

Tris-HCl..... 50 mM
NaCl..... 1 M

T pufr (pro Phenyl-Sepharose) pH 8,0

Tris-HCl..... 50 mM

UTE pufr (pro Phenyl-Sepharose) pH 8,0

Močovina 8 M
Tris-HCl..... 50 mM
EDTA..... 2 mM

HBSS (pro měření fluorescence)

pH 7,4

HEPES-Na	10mM
NaCl.....	140 mM
KCl	5 mM
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	3 mM
glukóza.....	1%

Pufř HBSS byl sterilizován filtrací přes filtr (Gelman Laboratory, Syringe Filter 0,2 μ m).

Použité roztoky pro SDS –PAGE:

Vzorkový pufř pro SDS-PAGE

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE

methanol	225 ml
voda	225 ml
kyselina octová.....	50 ml
Coomassie Brilliant Blue R250...	0,5 g

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE

methanol	250 ml
voda	650 ml
kyselina octová.....	100 ml

Uchovávací roztok pro gel SDS-PAGE

voda	75 ml
glycerol	25 ml

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE (5%)

pH 6,8

akrylamid	240 µl
H ₂ O	1,3 ml
Tris (1 M, pH 6,8)	200 µl
SDS (10%)	60 µl
APS (25%)	20 µl
TEMED	20 µl

Rozdělovací gel pro SDS-PAGE (7,5%)

pH 8,8

Akrylamid	1,24 ml
H ₂ O	1,8 ml
Tris (1 M, pH 8,8)	1,87 ml
SDS (10%)	50 µl
APS (25%)	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

4.1.6 Kultivační media

4.1.6.1 Tekutá kultivační media

LB medium (Luria-Bertani medium) pro kultivaci kompetentních buněk pH 7,0

Bacto-tryptone	10 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
deionizovaná voda	ad 1000 ml

MDO medium pro kultivaci kompetentních buněk

pH 7,0

KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
thiamin	10 mg
kvasničný extrakt.....	20 g
glycerol	20 g
deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

Sterilizuje se autoklárováním při tlaku 0,12 MPa po dobu 20 minut.

Sigma F12 médium (N3520)

pH 7,3

práškové médium (N3520)	11,15 g
bikarbonát sodný	2,5 g
ampicilin	10 ml
fetální telecí sérum	100 ml
deionizovaná voda.....	ad 1000 ml

Sterilizuje se filtrací s použitím membrány (velikost póru 0,22 µm)

MDO medium s ampicilinem

Připraví se MDO medium podle výše uvedeného návodu. Po sterilizaci a vychladnutí se k mediu přidá antibiotikum ampicilin (rozpuštěný v destilované vodě) do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

4.1.6.2 Pevná kultivační media

LB médium s ampicilinem

Připraví se LB medium podle návodu uvedeného v předchozím odstavci. Před sterilizací se přidá do media 18 g/l bakteriologického agaru a po sterilizaci a vychladnutí ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

4.2 Příprava ACT – produkce rekombinantního ACT v *E.coli* (kmen XL1 blue) a jeho izolace

4.2.1 Izolace plazmidové DNA (miniprep)

- Nejprve byla zaočkována jedna čerstvě narostlá bakteriální kolonie z agarové plotny do 1,5 ml LB media s ampicilinem, následná kultivace proběhla 14 hodin při intenzivním třepání při 37 °C.
- Poté byly bakteriální buňky odděleny odstředěním při 12 000 RPM po dobu 30 s při 20 °C a resuspendovány ve 100 µl roztoku I.
- Poté byly buňky lyzovány přidavkem 200 µl roztoku II, šetrně zamíchány a umístěny na 5 minut do ledu. K lyzovaným buňkám se přidalo 150 µl roztoku III, jenž byl předtím předchlazen na 4 °C. Po promíchání se buňky umístily na 15 minut do ledu.
- Centrifugací (12 000 RPM, 15 minut, 4 °C) se odstraní zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromozomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrokumavky a k supernatantu byl přidán stejný objem izopropanolu. Srážení plazmidové DNA probíhalo při 4 °C 10 minut.
- Po centrifugaci (12 000 RPM, 15 minut, 4 °C) byl pelet sražené DNA promyt 1 ml 70% ethanolu. Mikrokumavka s peletem byla sušena na vzduchu 10 minut.
- Poté byl pelet rozpuštěn ve 40 µl TE pufru pH 8 s termostabilní pankreatickou RNázou (20 µg/ml) a směs byla inkubována 30 minut při 70 °C. Plazmidová DNA byla uchovávána při teplotě - 20 °C.

4.2.2 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

- K 50 μl suspenze kompetentních buněk (*Escherichia coli* XL-1 Blue) byla přidána 1 μl plazmidové DNA a obsah zamíchán. Poté byla mikrozkuhavka umístěna na 20 minut do ledu, rychle přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a potom opět na 2 minuty do ledu.
- Po přidání 1 ml tekutého LB media byla kultura vložena do vodní lázně o teplotě 37 °C na 30 minut.
- Poté byla 200 μl suspenze rozetřena na agarovou LB plotnu s ampicilinem a plotna byla inkubována 14 hodin při 37 °C.

4.2.3 Produkce toxinu

- Jedna bakteriální kolonie, která nesla plazmid s genem pro rekombinantní ACT, byla zaočkována do 50 ml tekutého media MDO s ampicilinem. Za intenzivního třepání byly bakterie kultivovány 12 až 14 hodin při 37 °C.
- 20 ml suspenze bakterií se přenesla do 500 ml MDO media předehřátého na 37 °C obsahující ampicilin. Za intenzivního třepání byly bakterie kultivovány při teplotě 37 °C a sledovala se optická denzita (OD).
- Při dosažení $\text{OD}_{600} = 0,3$ až 0,6, což nastalo asi 2 hodiny po zaočkování, byl přidán roztok IPTG (do výsledné koncentrace 1 mM), který vyváže represor a dochází k indukci syntézy ACT.
- Dále byly bakterie kultivovány za intenzivního třepání při 37 °C 4 hodiny a poté byla kultura ochlazená na ledu. Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována při 6 000 RPM, 20 minut ve 4 °C.

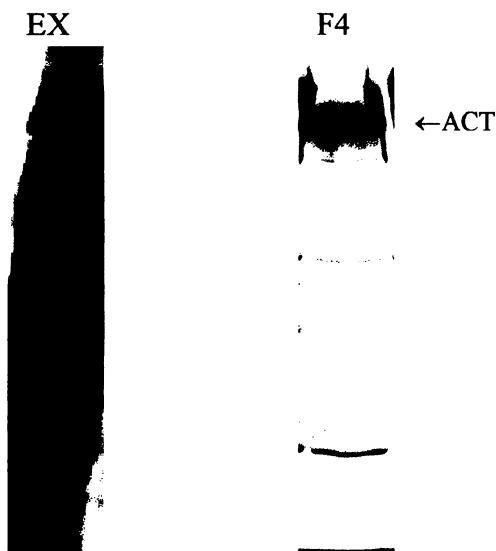
4.2.4 Extrakce inkluzních tělísek

- Během exprese v *Escherichia coli* ACT zůstává v cytoplazmě buněk v podobě inkluzních tělísek. Je proto nutné rozrušit buněčnou stěnu buněk sonikací.
- Pelet z předchozího kroku byl resuspendován v 10 ml TC pufru a sonikován po dobu 6x30 s při 4°C (výkon sonikátoru 50 W, kmitočet 30 kHz).
- Poté byly bakteriální buňky s rozrušenými buněčnými stěnami centrifugovány při 15 000 RPM po dobu 15 minut při 4 °C, a pak byl odstraněn supernatant.
- Sediment byl resuspendován v 10 ml 8 M močoviny v TC pufru a znovu centrifugován při 18000 RPM po dobu 30 minut ve 4 °C.
- Supernatant obsahující extrahovaný ACT byl uchováván při - 20 °C. Tento vzorek je označován jako močovinový extrakt ACT.

4.2.5 Purifikace toxinu chromatografií na DEAE-Sepharose

- Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml gelu DEAE-Sepharose, tedy asi 15 ml suspenze DEAE-Sepharose v 20% ethanolu a propláchnuta 100 ml neionizované vody, aby došlo k úplnému odmytí ethanolu.
- Na povrch kolony byl nasazen hydrofóbní porézní kroužek, který brání vyschnutí kolony.
- Kolona se ekvilibrovala UTN-A pufrem. Ekvilibrace probíhala tak dlouho, dokud nebylo pH roztoku, který vytékal z kolony, stejné jako pH ekvilibračního roztoku (= pH 8).
- K připravenému močovinovému extraktu toxinu se přidal roztok NaCl (1M) do výsledné koncentrace 50 mM.
- Takto upravený močovinový extrakt ACT se naněs na kolonu. ACT se zachytil v náplni kolony. Většina ostatních proteinů byla za těchto podmínek vymyta 25 ml ekvilibračního roztoku UTN-A .
- Po odstranění nenavázaných proteinů se ACT eluoval UTN-B pufrem o vysoké koncentraci NaCl (2 M).

- Jímaly se frakce eluátu o objemu 2 ml, u kterých se průběžně měřilo množství proteinu testem Bradfordové (10 μ l frakce a 90 μ l činidla Bradfordové, viz kap.4.2.6).
- Zastoupení jednotlivých proteinů v každé frakci se zjistil analýzou pomocí SDS-PAGE (Obr. 8).

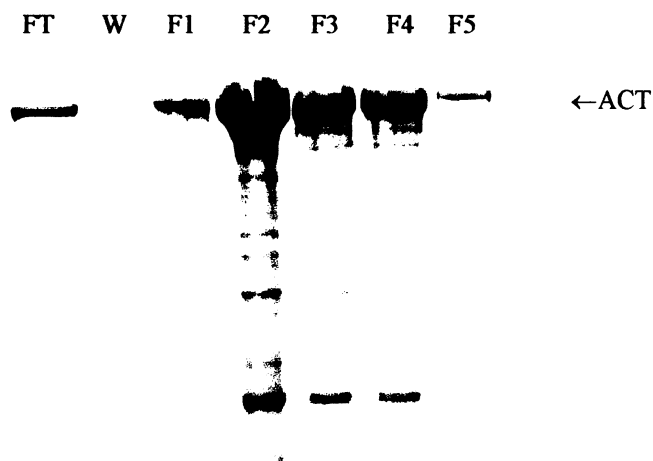


Obr. 8: SDS-PAGE částečně přečištěného ACT po DEAE-Sepharose (EX-extrakt před přečištěním, F4-frakce po eluci ACT pufrem UTN-B)

4.2.6 Purifikace toxinu chromatografií na Phenyl-Sepharose

- Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml gelu Phenyl-Sepharose, (asi 3 ml suspenze Phenyl-Sepharose v 20% ethanolu).
- Kolona s Phenyl-Sepharose se propláchla deionizovanou vodou a na povrch kolony se nasadil porézní kroužek zabraňující jejímu vyschnutí.
- Kolona byla ekvilibrována 20 ml TN pufrem.
- Vzorek s toxinem, jenž byl předtím purifikován na DEAE-Sepharose, se zředil 4x v TN pufrem a byl nanesen na kolonu s Phenyl-Sepharose.
- Kolona s naneseným vzorkem se propláchla 20 ml předchlazeného (4°C) T pufrem.
- Toxin byl eluován pomocí UTE pufrem a byly jímány frakce po 1 ml.

- Množství obsaženého proteinu se proměřilo testem Bradfordové (10 μ l frakce, 90 μ l činidla Bradfordové, viz kap. 4.2.1.6)
- Zastoupení jednotlivých proteinů v každé frakci byl zjištěn pomocí analýzy na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE, Obr. 9).



Obr.9: SDS-PAGE toxinu ACT po chromatografii na Phenyl-Sepharose (FT-frakce po nanesení vzorku na kolonu, W-frakce po promytí T pufrem, F1-5-frakce po eluaci UTE pufrem)

4.2.7 Stanovení množství proteinu metodou Bradfordové

- Nejprve byl připraven kalibrační standard BSA (2 mg/ml) o objemu 50 μ l a koncentraci 50, 100 a 200 μ g/ml.
- Dále byl připraven měřený vzorek o objemu 50 μ l a do jedné mikrozkušavky bylo přidáno 50 μ l samotného UTE pufru pro měření pozadí
- Každý vzorek a standard byl připraven v tripletech (pro přesnost měření).
- Do všech mikrozkušavek bylo přidáno 450 μ l činidla Bradfordové, směsi byly promíchány. Po 15 minutách při pokojové teplotě byla změřena absorbance naředěných standardů, vzorků a nulového vzorku při vlnové délce 595 nm.

- Naměřené hodnoty absorpance ředěných standardů byly vyneseny do grafu proti koncentraci proteinu ($\mu\text{g/ml}$). Tímto způsobem byla sestrojena kalibrační křivka, z níž byla určena koncentrace proteinů jednotlivých vzorků.

4.2.8 Elektroforéza v 7,5% polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

- Pomocí SDS-PAGE byl analyzován močovinový extrakt nebo purifikovaný toxin. K 15 μl analyzovaného vzorku se přidalo 5 μl 5x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE
- Vzorek se zahřál na 100 °C po dobu 5 minut.
- V zařízení pro SDS elektroforézu byl připraven SDS polyakrylamidový gel (9x9 cm), který se skládá ze 7,5% roztředovacího gelu a 5% zaostřovacího gelu (složení jednotlivých gelů viz kap 4.1.5).
- Elektroforéza probíhala při konstantním proudu 30 mA po dobu 1,5 hodiny v tris-glycinovém pufru pH 8,3.
- Dále byly elektroforeticky rozdělené proteiny na polyakrylamidovém gelu obarveny v barvicím roztoku s Coomassie Brilliant Blue R250.
- Poté byly gely odbarveny v odbarvovacím roztoku a po odbarvení přeneseny do uchovávacího roztoku. Gely byly skladovány vysušené v celofánové fólii.

4.3 Makrofágy J744A.1 a CHO buňky

4.3.1 Kultivace

Myši makrofágy J774.A1 (American type culture collection) byly kultivovány v termostatu při 37°C a 5% koncentraci CO_2 v RPMI médiu doplněného 10% (v/v) tepelně- inaktivovaným hovězím bovinním sérem, penicilinem (100 i.u/ml), streptomycinem (100 $\mu\text{g/ml}$) a amphotericinem B (250 ng/ml). Pro fluorescenční

měření jsou buňky vysety do 6- jamkové destičky (firma TPP, cca 100 000 buněk J774A.1/ na jamku), kde jsou umístěná krycí sklíčka, na která buňky sedimentují.

Příprava krycích sklíček:

Krycí sklíčka (1,5x1,5 cm) se pomocí ostrého kopíčka upraví na rozměr cca 0,7x1,5 cm. Takto upravená sklíčka se ponoří do koncentrované kyseliny sírové po dobu 1h. Poté se sklíčka opláchnou destilovanou vodou a vyčistí se papírovým ubrouskem. Sklíčka se zabalí do alobalu a nechají se sterilizovat 3 h při 120°C.

CHO buňky (American type culture collection) byly kultivovány v termostatu při 37°C a 5% koncentraci CO₂ v Sigma F12 médiu (N3520). Postup při vysetí buněk do jamek a při přípravě vzorků je stejný pro makrofágy J774A.1 i pro CHO buňky.

4.3.2 Příprava vzorků

Buňky se nechají několik hodin sedimentovat na krycí sklo (při 37°C a 5% CO₂) a pak jsou přeneseny v temperované nádobě na místo měření. Samotné měření následovalo asi 16 hodin po transportu (po tuto dobu byly buňky opět ve 37°C a 5% CO₂).

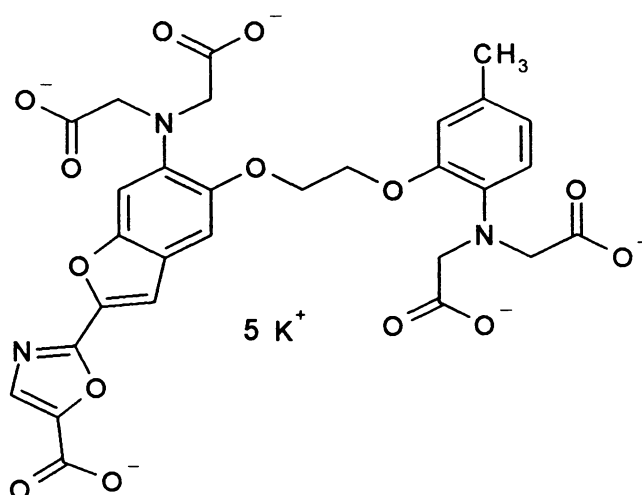
Krycí skla s přisedlými buňkami se 1 hodinu před měřením obarví v roztoku fluorescenční sondy Fura-2/AM. Postup byl následující (zde se již pracuje nesterilně při 24°C):

1. buňky jsou barveny 30 minut v roztoku 3 uM Fura-2 v 1,5 ml HBSS (ve tmě)
2. poté jsou buňky přeneseny na 30 minut do roztoku HBSS (ve tmě)
3. každé sklo je těsně před měřením upevněno do měřícího zařízení (viz kap. 4.3.3)

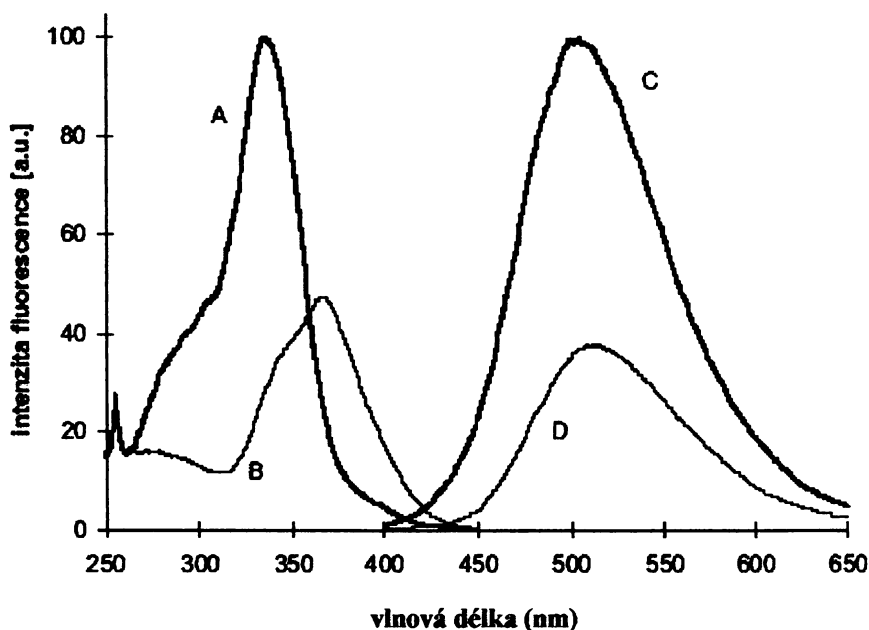
4.3.3 Měření vstupu vápníku do buněk

4.3.3.1 Fura-2/AM

Fluorescenční sonda Fura-2 (Obr.10) se používá jako intracelulární indikátor koncentrace Ca^{2+} (OZAKI a KUME 1988, HU 1993, SHIBUYA a DOUGLAS 1993). Disociační konstanta pro vazbu Ca^{2+} je asi 150 nM při 22°C a pH =7,2 (LAMBERT 1999). Sonda se může nacházet ve dvou různých stavech. Pokud Fura-2 váže ionty Ca^{2+} , má její excitační spektrum maximum při vlnové délce 337 nm. Molekuly sondy bez navázaných iontů vápníku mají maximum excitačního spektra při vlnové délce 368 nm. Emisní spektra obou forem mají maximum mezi 505 a 510 nm, viz Obr.11 (HAUGLAND 1999).



Obr.10: Strukturální vzorec fluorescenční sondy Fura-2



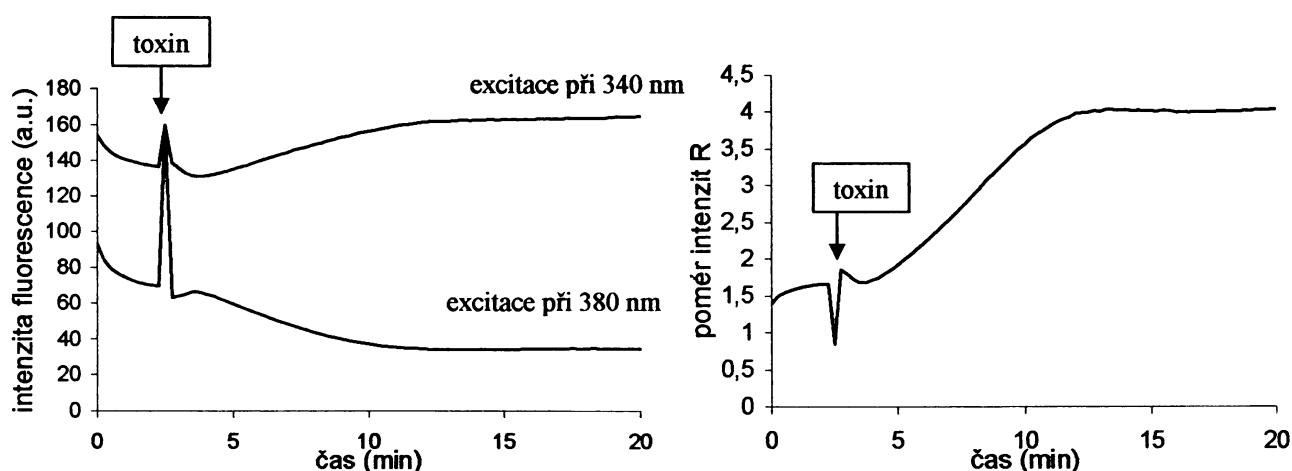
Obr.11: Excitační a emisní spektrum sondy fury-2 s navázaným vápníkem (křivky A,C) a excitační a emisní spektrum fury-2 bez navázaného vápníku (křivky B,D). Excitační spektrum bylo zaznamenáno při emisní vlnové délce 510 nm a emisní spektrum při excitaci na 340 nm. Přejato z HAUGLAND (1999).

Těchto vlastností se dá využít při takzvaném poměrovém měření, kdy jsou molekuly sondy fury-2 střídavě excitovány při dvou vlnových délkách, které odpovídají maximům excitačních spekter obou forem, tj. 340 a 380 nm. Emitované záření je detekováno při 510 nm. Poměr obou zaznamenaných intenzit vypovídá o poměrném zastoupení obou forem sondy (Fura bez a s navázaným vápníkem) ve vzorku. Pokud takto zjistíme molární poměr sondy s navázanými ionty Ca^{2+} a bez nich, můžeme vypočítat koncentraci Ca^{2+} v roztoku (viz Rovnice 1, FIŠER 2003).

$$\text{Rov.1: } [\text{Ca}^{2+}] = K_D (R - R_{\min} / R_{\max} - R) \cdot (F^{380}_{\max} / F^{380}_{\min}), \quad \text{kde } R = F^{340} / F^{380}.$$

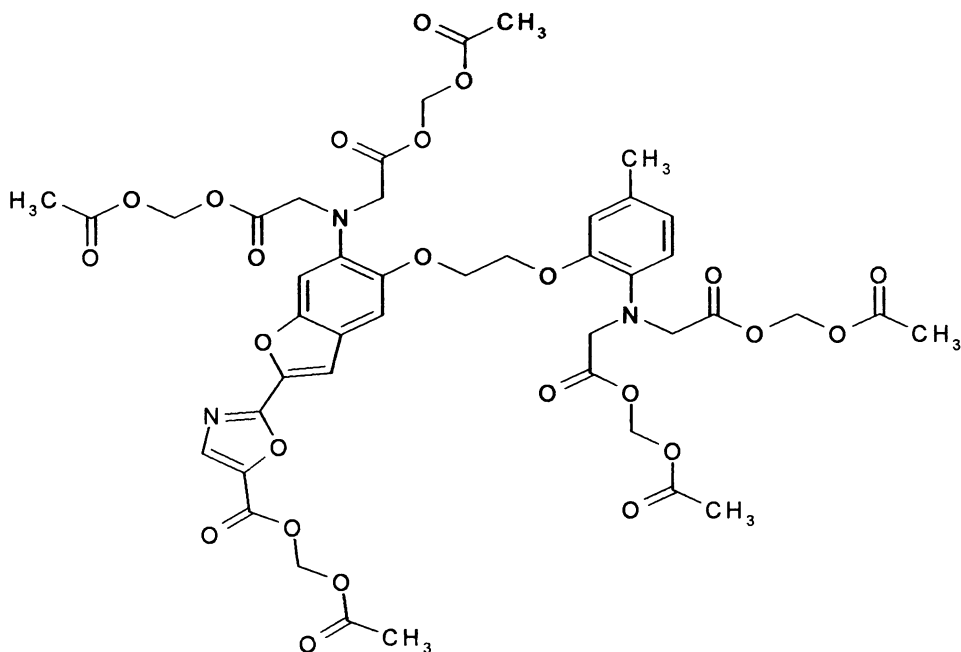
Symboly F^{340} a F^{380} značí intenzitu fluorescence zkoumaného vzorku při excitaci při vlnové délce 340 nm a 380 nm. R vždy značí poměr těchto dvou intenzit. F^{380}_{\max} značí intenzitu při vlnové délce 380 nm ve vzorku bez Ca^{2+} a F^{380}_{\min} v nadbytku Ca^{2+} , kdy je veškerá sonda v komplexu s ionty Ca^{2+} . R_{\min} je poměr intenzit v nepřítomnosti Ca^{2+} a R_{\max} v nadbytku Ca^{2+} . K_D je disociační konstanta. Pro zjištění příslušných hodnot v nepřítomnosti Ca^{2+} se většinou

používá chelatační činidlo EGTA. Pokud je stanovován obsah Ca^{2+} uvnitř buněk, je navíc nutné permeabilizovat jejich buněčné membrány vhodným ionoforem (LAMBERT 1999). Kalibraci hodnot poměrového měření na koncentraci intracelulárního vápníku jsem neprováděla. Pro naše účely bylo zcela dostačující zaznamenávat pouze intenzity při dvou vlnových délkách excitace a vyhodnocovat jejich poměr R (viz Obr.12, Rov.1), což dostatečně vypovídá o změnách koncentrace vápníku, které jsme sledovali.



Obr.12: Záznam poměru intenzit fluorescence sondy Fura-2 v buňkách J774A.1 pro různé vlnové délky excitace (vlevo) a hodnoty R - viz Rov.1 (vpravo). Šipka označuje přidavek toxinu wt-ACT.

Pokud je sledována koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě buněk, je vhodné použít místo sondy Fura-2 její derivát s acetoxy-methylovými (AM) skupinami připojenými esterovou vazbou, Fura-2/AM (Obr.13). Tato látka může během barvení buněk prostupovat buněčnou membránou. V buňkách jsou acetoxy-methylové skupiny odštěpeny buněčnými esterázami. Tím se stává sonda hydrofilní a nemůže buňky opouštět. Sonda Fura-2/AM navíc není citlivá na změnu koncentrace Ca^{2+} a jako indikátor slouží až po rozštěpení v buňkách (LAMBERT 1999).

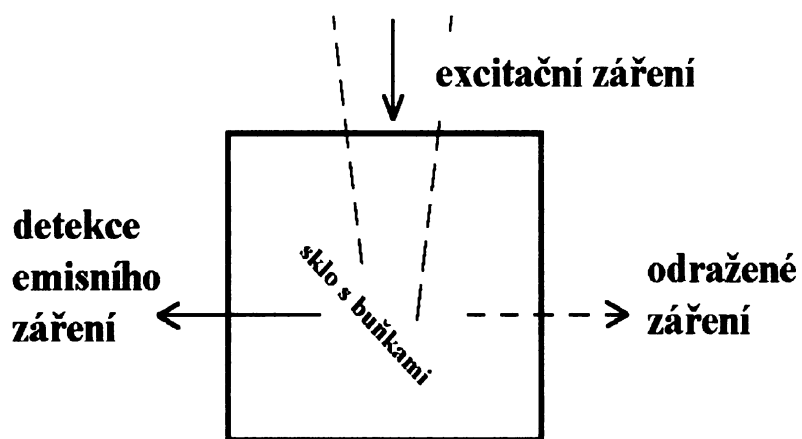


Obr.13: Strukturní vzorec Fura-2/AM. Tento derivát prochází membránami buněk.

4.3.3.2 Měření na spektrofluorometru

Vstup vápníku do buněk jsem měřila na spektrofluorometru Fluoromax-3. Zdrojem excitačního záření je xenonová výbojka. S pomocí monochromátorů si lze vybrat potřebnou část spektra, pro excitaci jsem používala vlnové délky 340 a 380 nm. Šířka propouštěného pásma byla 4 nm. Emitované světlo jsem snímala v kolmém směru k excitačnímu paprsku tak, že docházelo k minimálnímu odrazu do emisního monochromátoru (Obr.14). Detekce fluorescence probíhá ve fotonásobiči, kde se měří procházející proud.

Před vlastním měřením jsem pod mikroskopem zkontrolovala vitalitu buněk. Pak jsem krycí sklo, na kterém byly přisedlé obarvené buňky (viz kap. 4.3.2) upevnila do plastového držáku. Ten jsem umístila do polystyrénové kyvety s roztokem HBSS. Toxin jsem přidávala v roztoku močoviny (8M). Sklo bylo umístěno svisle a svíralo s dopadajícím paprskem excitačního záření úhel asi 45°.



Obr.14: Uspořádání kyvetového prostoru spektrofluorometru Fluoromax-3 při měření fluorescence sondy Fura-2 s buňkami J744A.1. Pohled shora.

5. Výsledky

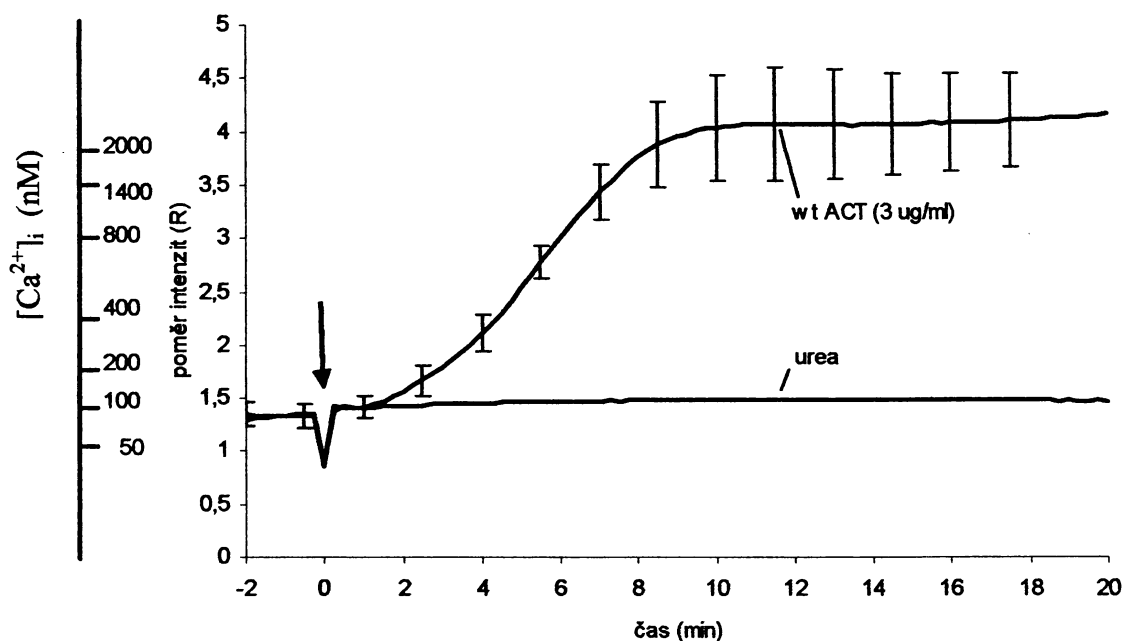
5.1 Interakce ACT s buňkami myších makrofágů J774A.1

Má práce navazuje na diplomovou práci Radovana Fišera (2003), který dokázal, že při interakci ACT s plazmatickou membránou buňky dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku $[Ca^{2+}]_i$. Při studiu interakce ACT s membránou použil myší makrofágy J774A.1, neboť tyto buňky exprimují receptor pro ACT – integrin CD11b/CD18 (GUERMONPREZ *et al.* 2001). Mým cílem bylo tedy dále zjistit, jakým mechanismem dochází ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ a které vápníkové kanály se tohoto zvýšení účastní.

Ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ může obecně docházet vstupem Ca^{2+} z extracelulárního prostředí pomocí vápníkových kanálů ROC, SOC a VOC nebo uvolněním vápníku z vnitřních zásob buňky pomocí inositol trifosfátového nebo ryanoidního kanálu (viz kap.3.4). Aby bylo možno zjistit mechanismus vstupu vápníku, bylo potřeba použít různé inhibitory k zablokování jednotlivých typů vápníkových kanálů. Při vybírání těchto inhibitorů bylo třeba zároveň zjistit, zda použité inhibitory neovlivňují intenzitu fluorescence nebo zda nějak neinteragují se sondou Fura-2/AM.

Všechny své pokusy jsem prováděla na spektrofluorometru Fluoromax-3. Buňky jsem před měřením nechala 30 minut inkubovat v roztoku HBSS s fluorescenční sondou Fura-2/AM (3 μ M). Poté jsem buňky přemístila na 30 minut do roztoku HBSS (doba potřebná k odštěpení acetoxymethylových skupin z Fura-2/AM, viz kap. 4.3.3.1).

Hladina intracelulárního vápníku se v buňkách J774A.1 zvyšuje cca 1,5-2,0 minutou po interakci s wt-ACT a hladina dosahuje maxima mezi 8-12 min po přidání toxinu (obr.15). Je vidět, že koncentrace intracelulárního vápníku je udržována na hladině kolem 80 nM, ale po přidání wt-ACT dochází ke zvýšení této koncentrace až na 2000 nM, tj. 2 μ M.



Obr.15: Záznam poměru intenzit fluorescence R (poměr intenzit při excitaci 340 a 380 nm, viz kap. 4.3.3) sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Šipka ukazuje čas přidání toxinu, resp. močoviny. Toxin wt-ACT byl přidán ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontrola slouží přidavek samotné 8M močoviny (urea), v níž je ACT rozpuštěn. Stupnice vlevo ukazuje hladinu intracelulárního vápníku (FIŠER *et al.* 2006). Závislosti představují typické provedení z nejméně třech nezávislých stanovení, úsečky představují směrodatné odchylky.

Přidávaný ACT byl rozpuštěn v 8M močovíně. Tato látka v odpovídající finální koncentraci 80 nM sloužila jako kontrolní vzorek. Z grafu (obr. 15) je patrné, že přidavek močoviny nemá na hladinu intracelulárního vápníku žádný vliv.

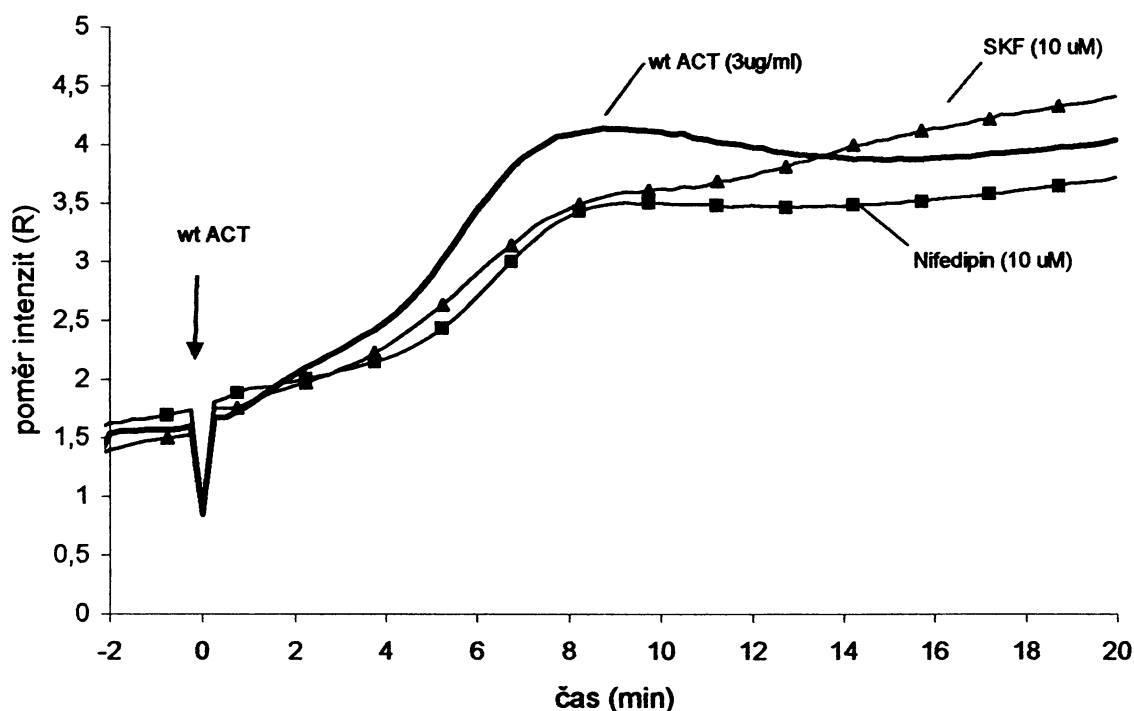
5.1.1 Inhibitory buněčných vápníkových kanálů

Pouze některé typy buněk a od nich odvozených buněčných linií jsou charakterizovány tak dobře, že víme jaké vápníkové kanály se na nich vyskytují. V případě, že tomu tak není, se používají všechny inhibitory vápníkových kanálů - bez ohledu na to, zda se v dané buňce tyto kanály nacházejí. S používáním inhibitorů je samozřejmě problém, protože v závislosti na koncentraci ovlivňují fyziologii buněk. Proto se musí zjistit optimální koncentrace inhibitoru – taková, která už vykazuje na obdobných systémech účinek. Přitom je také nutno zjistit do jaké míry ovlivňuje

životaschopnost buněk. Následující kapitoly se týkají popisu inhibitorů jednotlivých vápníkových kanálů.

5.1.1.1 Inhibitor receptorem ovládaných kanálů (ROC): SK&F 96365

K zablokování receptorem ovládaných kanálů (ROC) jsem použila inhibitor SK&F 96365 (obr. 16). Podle údajů různých autorů (KARNAM 2004, GUSTAFSSON 2005), kteří pracovali s tímto inhibitorem, jsem použila 10 μM koncentraci SK&F 96365.



Obr.16: Záznam poměru intenzit fluorescence R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 20 min v 10 μM SK&F (\blacktriangle) nebo v 10 μM nifedipinu (\blacksquare). Šipka vyznačuje přidávek toxinu wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

Makrofágy J774 byly 30 min inkubovány ve tmě v HBSS se sondou Fura-2/AM (3 μM). Poté byly buňky přeneseny na 10 minut do roztoku HBSS a na 20 minut do roztoku HBSS s 10 μM SK&F 96365. Při vlastním měření fluorescence byly buňky v kyvetě s roztokem HBSS s 10 μM SK&F 96365 a po cca 3 min byl přidán wt-ACT (čas $t=0$).

Obr.16 ukazuje vstup vápníku v buňkách po použití inhibitoru SK&F 96365. Je vidět, že tento inhibitor nemá vliv na vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Z toho lze usuzovat, že ACT

nevyvolává změny intracelulárního vápníku zprostředkované receptorem ovládaným kanálem.

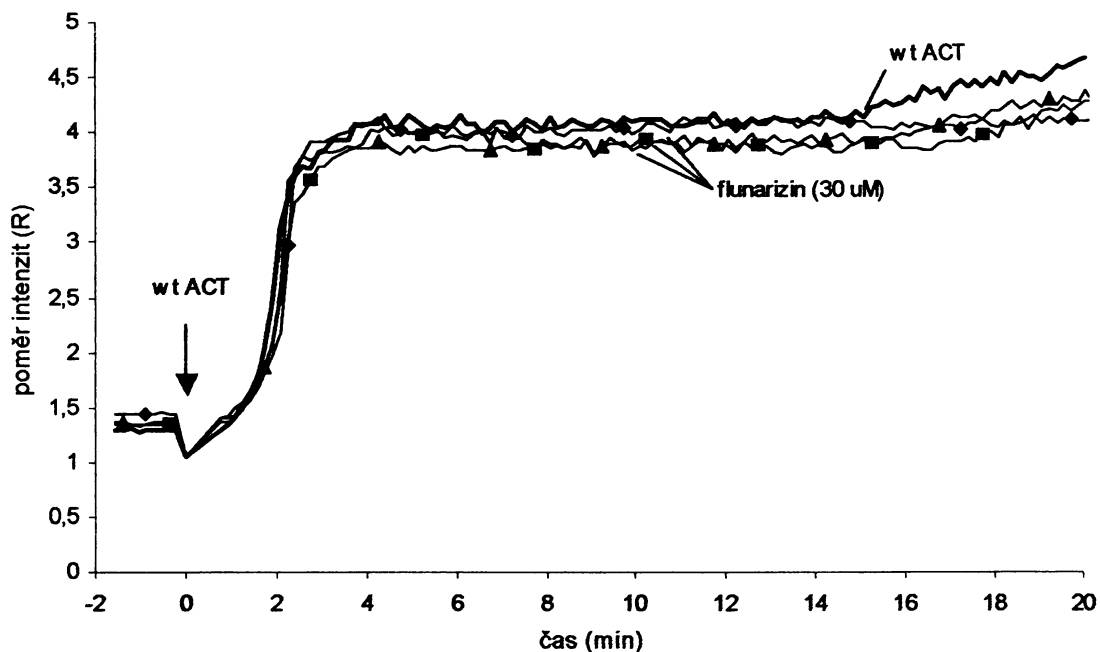
5.1.1.2 Inhibitor napětím ovládaných kanálů L-typu (VOC) :Nifedipin

Dále jsem použila Nifedipin, což je inhibitor napětím ovládaných kanálů L-typu (VOC, kap. 3.4.3). Kanály VOC se nachází hlavně na membránách vzrušivých buněk (např. svalová a nervová buňka). Podle práce THORE *et al.* 2005, kde s tímto inhibitorem pracovali, jsem použila 10 μM koncentraci inhibitoru. Buňky byly inkubovány 30 min v roztoku HBSS s 3 μM fluorescenční sondou Fura-2/AM. Poté byly buňky přeneseny na 10 minut do roztoku HBSS a následně na 20 min do roztoku 10 μM nifedipinu v HBSS. V tomto roztoku byly buňky i v průběhu měření fluorescence.

Z obr. 16 je vidět, že přidání 10 μM nifedipinu vykazuje stejný průběh křivky vstupu vápníku jako při použití samotného wt-ACT. Z toho vyplývá, že se na zvyšování $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po interakci buněk s ACT nepodílí kanály VOC.

5.1.1.3 Inhibitor T-typu napětím ovládaných kanálů (T-VOC): Flunarizin

K zablokování T-typu napětím ovládaných kanálů (viz kap. 3.4.3) byl použit inhibitor Flunarizin (obr.17). Podle údajů ze současných prací (PATRAT *et al.* 2000, WINGERTZAHN a OCHS 2001) byly buňky inkubovány 20 min v roztoku 30 μM flunarizinu. Měření vlivu flunarizinu na vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na buňkách J774A.1 probíhalo na fluorescenčním mikroskopu (Visitron, SRN). Tyto výsledky jsem přejala od Radovana Fišera (FIŠER *et al.* ,2006) a jsou zde uvedeny proto, aby kapitola ukazovala všechny inhibitory, které jsme v naší skupině zkoumali. Fluorescenční mikroskop umožňuje sledovat poměr intenzit fluorescence v jednotlivých buňkách, tj. každá křivka v grafu (obr.17) zaznamenává odpověď jednotlivé buňky. Buňky byly inkubovány v roztoku HBSS a 3 μM Fura-2/AM. Poté byly buňky 10 min v HBSS a 20 min v roztoku 30 μM flunarizinu v HBSS.

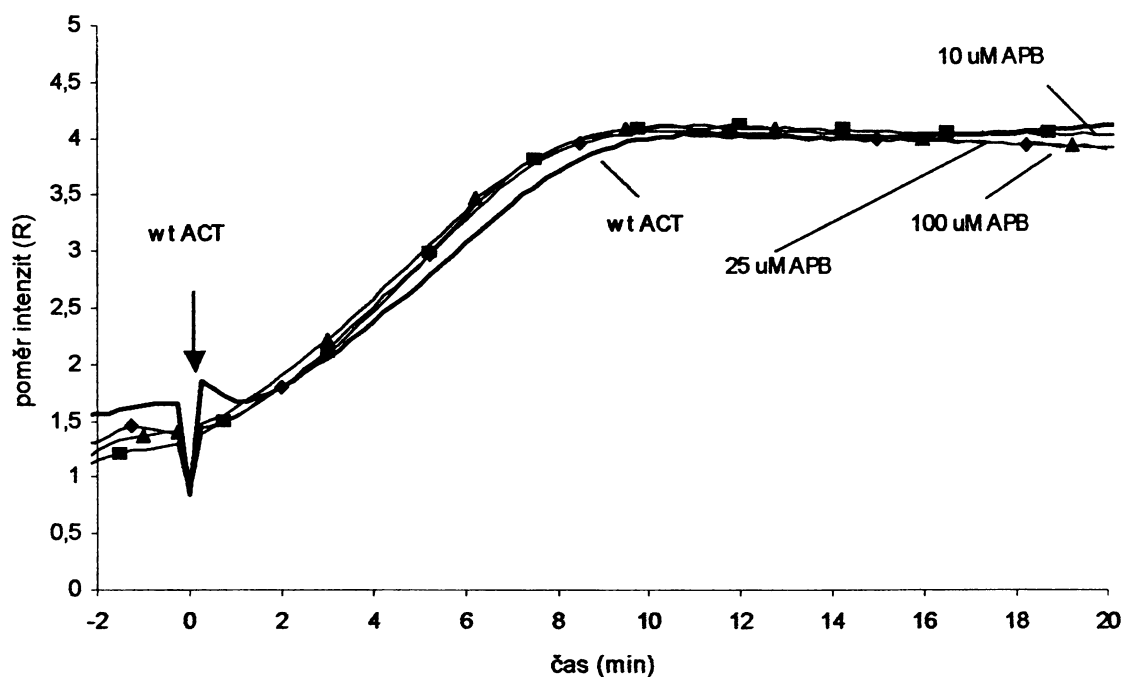


Obr.17: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány ve 30 μM flunarizinu. Záznam vstupu vápníku do buněk byl pořízen na fluorescenčním mikroskopu. Šipka určuje čas přidavku wt-ACT (3 $\mu\text{g/ml}$). Přejato od Radovana Fišera.

Jak je z grafu (obr.17) vidět, po inkubaci buněk s 30 μM flunarizinem nedochází k inhibici vzestupu intracelulární koncentrace vápníku. To znamená, že na zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po interakci buněk J774A.1 s wt-ACT se nepodílí T-typ napětím ovládaného kanálu.

5.1.1.4 Inhibitor SOC kanálů: 2-APB

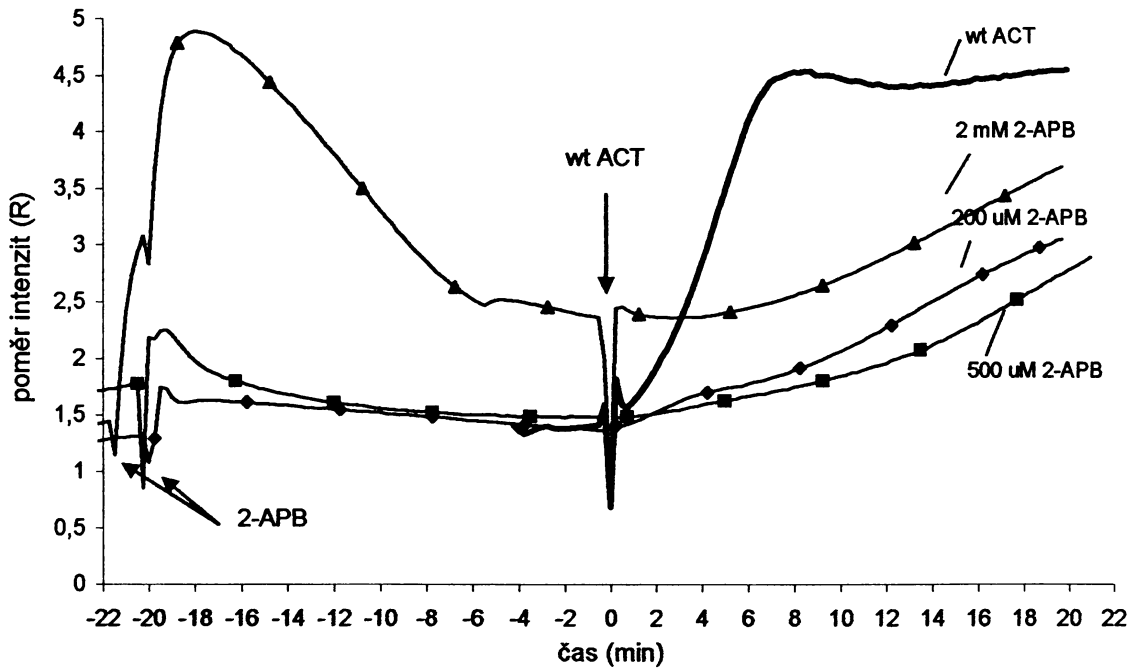
Pro zablokování SOC kanálů (viz kap. 3.4.2) jsem použila látku 2-APB (2-aminoethyldifenyl borinát). Podle údajů z různých článků (GREGORY *et al.* 2001; BOOTMAN *et al.* 2002), kde používali 2-APB v rozmezí 1-100 μM , jsem použila koncentraci 10, 25 a 100 μM 2-APB. Makrofágy byly inkubovány 30 min v roztoku HBSS s 3 μM Fura-2/AM. Poté byly přeneseny na 20 min do HBSS a na 10 min do roztoku HBSS s příslušnou koncentrací 2-APB (obr. 18). V roztoku HBSS s 2-APB byly buňky i v průběhu měření.



Obr.18: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 10 min v HBSS s 10 μM (■), 25 μM (◆) a 100 μM (▲) koncentrací 2-APB. Šipka označuje přidávek toxinu ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

Nejdříve jsem zkoušela 2-APB v koncentraci 10 μM a postupně jsem zvyšovala koncentraci až na 100 μM . Jak je vidět z grafu 18, po přidání wt-ACT k buňkám inkubovaných s 10, 25 a 100 μM 2-APB vykazují křivky stejný průběh jako wt-ACT přidáný k buňkám bez inkubace s 2-APB. To znamená, že SOC kanály se nepodílí na zvýšení intracelulární koncentrace vápníku.

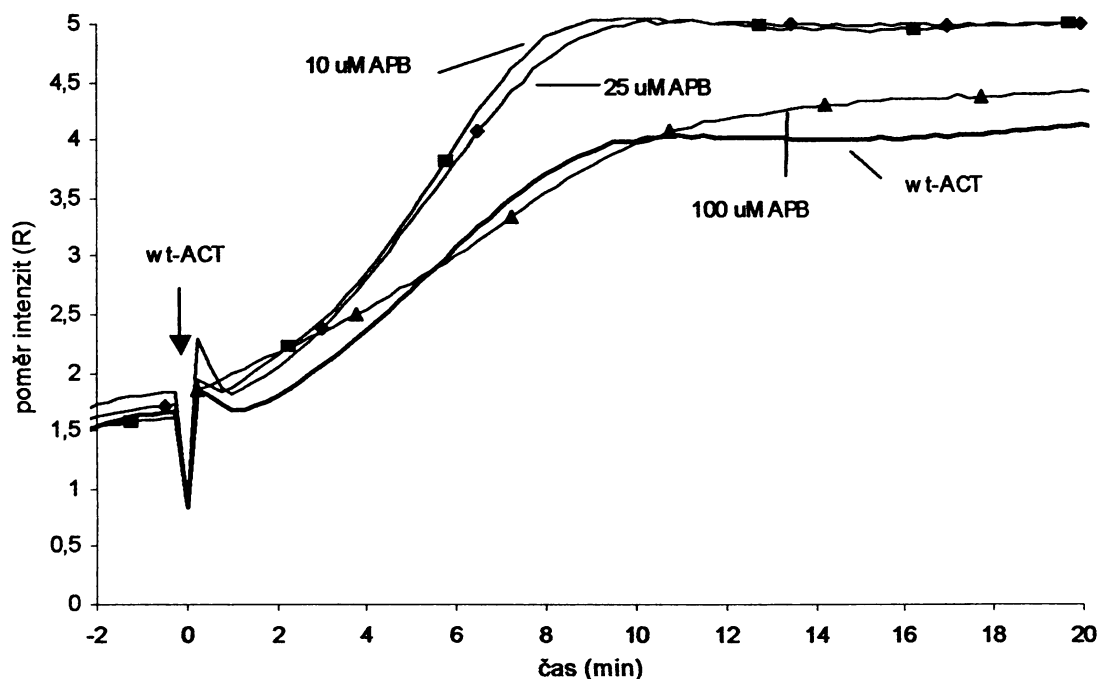
Po tomto negativním výsledku jsem zjistila, že autoři DOBRYDNEVA a BLACKOMORE (2001) používali koncentraci 2-APB v rozmezí 1-500 μM . Proto jsem zkusila zvýšit koncentraci 2-APB na 200, 500 a 2000 μM při 20 min inkubaci buněk s 2-APB (obr. 19). Z obr. 19 je patrné, že při použití 200 a 500 μM koncentrací 2-APB dochází po přidání wt-ACT k podstatně menšímu nárůstu $[\text{Ca}^{2+}]_i$; oproti kontrolnímu wt-ACT, což naznačuje, že vstup vápníku do buněk by se mohl uskutečňovat prostřednictvím SOC kanálů.



Obr. 19: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 20 min v HBSS s 200 μM (\blacklozenge), 500 μM (\blacksquare) a 2000 μM (\blacktriangle) koncentrací 2-APB. Šipka označuje přidávek toxinu ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

Při použití 2000 μM a 500 μM koncentrace 2-APB ale dochází ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ hned po přidání samotného 2-APB, což znamená, že je tato koncentrace možná příliš vysoká a působí na buňky toxicky. Kolegové v MBÚ (MAŠÍN a BASLER, nepublikované výsledky) proto testovali účinek 2-APB v koncentraci 200, 500 a 2000 μM na makrofágy J774A.1. Měřením množství laktátdehydrogenázy uvolňované z buněk po interakci ACT zjistili, že 2-APB ovlivňuje životaschopnost buněk již v koncentraci 200 μM . To znamená, že 2-APB v mých pokusech (obr. 19) neinhiboval vstup vápníku do buněk blokací SOC kanálů, ale tím, že buňky po 20 minutách inkubace v těchto koncentracích 2-APB nebyly už natolik životaschopné, aby vstupem vápníku odpověděly na přidávek wt-ACT.

Proto jsem zkusila znovu použít nižší koncentraci 2-APB (10, 25 a 100 μM), ale s prodlouženou dobou inkubace buněk v roztoku s 2-APB (z 10 min na 20 min, obr.20). Z grafu je zřejmé, že ani při 20 min inkubaci a při koncentraci 10, 25, a 100 μM , 2-APB nezablokoval vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$. To znamená, že na zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po interakci buněk J774A.1 s wt-ACT se nepodílí SOC kanály.

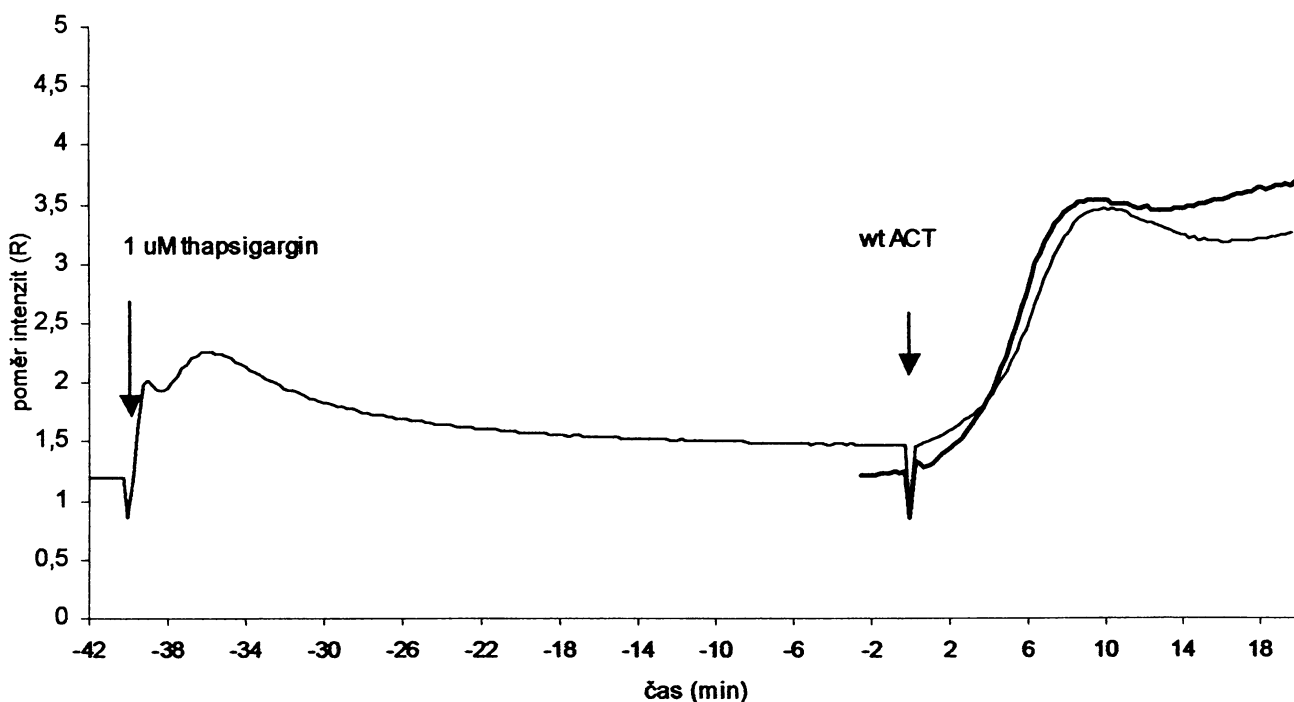


Obr.20: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Inkubace buněk byla prodloužena z 10 min na 20 min v HBSS s 10 μM (■), 25 μM (◆) a 100 μM (▲) koncentrací 2-APB. Šipka označuje přidávek toxinu ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

5.1.1.5 Inhibitor SERCA ATPázy v membráně endoplazmatického retikula: thapsigargin

V předchozích kapitolách jsem se zabývala blokováním vápníkových kanálů lokalizovaných na plazmatické membráně. Jak jsem už uvedla, zvýšení intracelulární koncentrace vápníku se může uskutečnit i uvolněním vápníku z intracelulárních zásob buňky. K blokaci této dráhy se používá thapsigargin, který blokuje SERCA ATPázu na membráně endoplazmatického retikula. Tento inhibitor zajistí, že vápník se nemůže dostat do ER, ale kanály které transportují vápník ven z ER zablokovány nejsou. V pokusech s thapsigarginem (CARDOZO *et al.* 2005, HARPER *et al.* 2005) jsou proto buňky inkubovány s inhibitorem delší dobu, aby bylo zaručeno uvolnění vápenatých iontů z ER.

Buňky byly inkubovány 30 min v roztoku 3 μM Fura-2/AM v HBSS a poté byly přemístěny na 30 min do HBSS. Během měření byly buňky v 1 μM roztoku thapsigarginu v HBSS. Po 40 min inkubace s thapsigarginem byl přidán toxin wt-ACT.



Obr.21: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 40 min v HBSS s 1 μM thapsigarginem a poté byl přidán wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

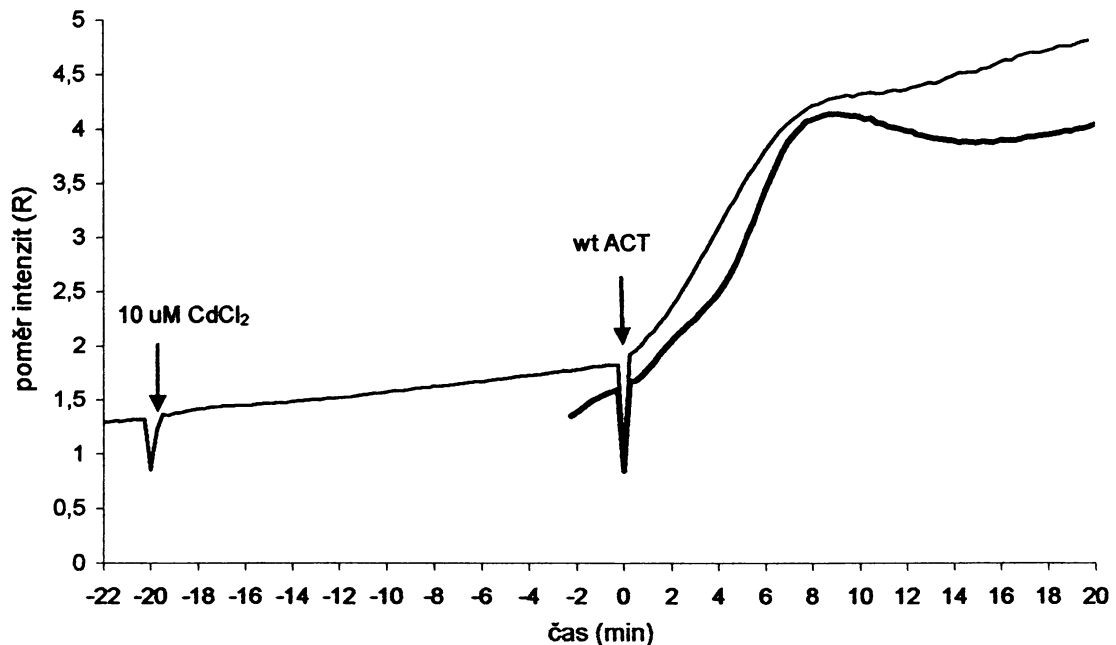
Z grafu je vidět, že po přidání thapsigarginu dochází ke zvýšení $[\text{Ca}^{2+}]_i$, což znamená, že dochází k uvolňování vápníku z ER pomocí blokace SERCA ATPázy tímto inhibitorem. Po přidání wt-ACT k buňkám inkubovaných 40 min s thapsigarginem nedochází k inhibici nárůstu intracelulárního vápníku. To znamená, že po přidání wt-ACT k buňkám, nedochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku jeho uvolněním z endoplazmatického retikula, ale vápník do buňky vchází jiným způsobem.

5.1.1.6 Nespecifické inhibitory

Inhibitory, které byly zatím v práci použity pro výzkum mechanismu vstupu vápníku po interakci buněk s wt-ACT (SK&F 96365, nifedipin, flunarizin, 2-APB a thapsigargin) blokovaly jednotlivé typy vápníkových kanálů specificky. Dále jsem se snažila zkoumat mechanismus vstupu vápníku pomocí nespecifických inhibitorů: dvoj- a trojmocných iontů kovů.

Nejprve jsem použila chlorid kademnatý (CdCl_2 , obr. 22), který se používá jako nespecifický inhibitor VOC kanálů (WANG a CAI 2003). Buňky byly inkubovány 30 min v roztoku 3 μM Fura-2/AM v HBSS a poté 30 min v samotném HBSS. Po této

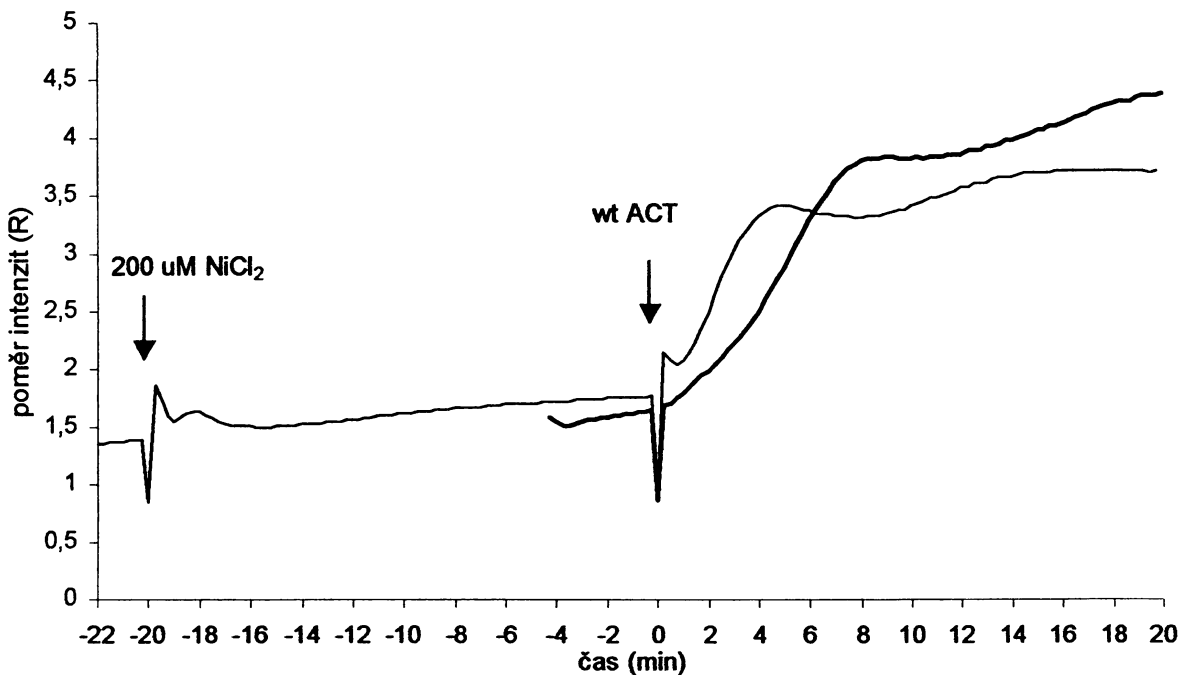
době jsem buňky přemístila do kyvety s roztokem 10 μM CdCl_2 v HBSS a začala měřit. Je lepší zaznamenávat odpověď buněk ihned po přidání CdCl_2 , neboť je možno pozorovat okamžitý vliv inhibitoru na buňky. Tento postup je používáme tehdy, pokud nevíme, zda tato látka nemá sama na buňky v této koncentraci toxický účinek. Po 20 min jsem k buňkám přidala wt-ACT.



Obr.22: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 20 min v HBSS s 10 μM koncentrací CdCl_2 . Šipka označuje přidavek wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

Při této koncentraci nemají kadmennaté ionty žádný vliv na vstup vápníku do buněk po interakci s wt-ACT. Proto jsem zkoušela zvýšit koncentraci CdCl_2 na 100 μM , ale tato koncentrace vyvolala velmi vysoký vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ po přidání samotného inhibitoru (výsledky nejsou prezentovány) podobně jako u vysokých koncentracích 2-APB (kap 5.1.1.4).

Dalším nespecifickým inhibitorem, který jsem použila, byl chlorid nikelnatý (NiCl_2). Buňky byly inkubovány 30 min v roztoku 3 μM Fura-2/AM v HBSS a poté 30 min v samotném HBSS. Po této době jsem buňky přemístila do kyvety s roztokem 200 μM NiCl_2 (HOOGLAND a SAGGAU 2004) v HBSS a začala měřit (obr. 23).

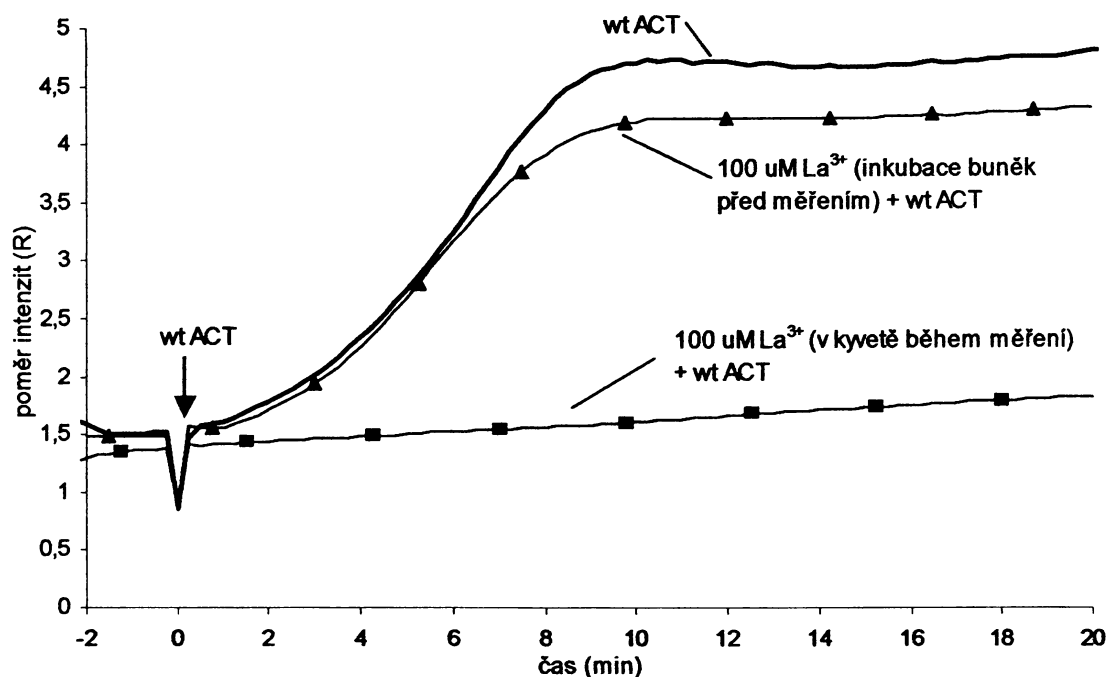


Obr. 23: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 20 min v HBSS s 200 μM koncentrací NiCl₂. wt-ACT byl přidán ve finální koncentraci 3 μg/ml.

Při použití 200 μM koncentrace NiCl₂ došlo sice ke snížení vstupu vápníku do buněk oproti použití samotného wt-ACT, ale tento rozdíl je malý s porovnáním směrodatných odchylek při měření samotného toxinu (obr. 15).

5.1.1.7 Nespecifický inhibitor LaCl₃

Dalším nespecifickým inhibitorem vápníkových kanálů, který jsem používala, byl chlorid lanthanitý (LaCl₃). Podle údajů z článku HIROSHI *et al.* (2003) jsem použila 100 μM koncentraci LaCl₃. Buňky byly inkubovány 30 min v roztoku 3 μM sondy Fura-2/AM v HBSS a 10 min v roztoku HBSS. Poté bylo sklíčko s buňkami přesunuto na 20 min do roztoku 100 μM LaCl₃. V roztoku LaCl₃ jsou buňky i během vlastního měření (obr. 24). Z grafu je vidět, že 100 μM LaCl₃ inhibuje vzestup intracelulární koncentrace vápníku po interakci buněk s wt-ACT. Je zajímavé, že LaCl₃ inhibuje vzestup [Ca²⁺]_i jen tehdy, je-li přítomen v roztoku během měření. Jestliže buňky necháme před měřením 20 min inkubovat v 100 μM LaCl₃ v HBSS, ale před měřením jsou přeneseny do HBSS bez LaCl₃, k inhibici nedochází (obr.24, přejato od Radovana Fišera). Bylo zjištěno, že lanthan nijak neovlivňuje translokaci AC domény a ani neovlivňuje produkci cAMP v buňce (FIŠER *et al.* 2006).



Obr. 24: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Buňky byly inkubovány 20 min v HBSS s 100 μM koncentrací LaCl_3 , inhibitor byl přítomen během měření v kyvetě (■). Při dalším měření byly buňky také inkubovány 20 min v 100 μM LaCl_3 , ale během měření byly buňky v HBSS bez LaCl_3 (▲, přejato od Radovana Fišera). Šipka označuje přidávek toxinu wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$.

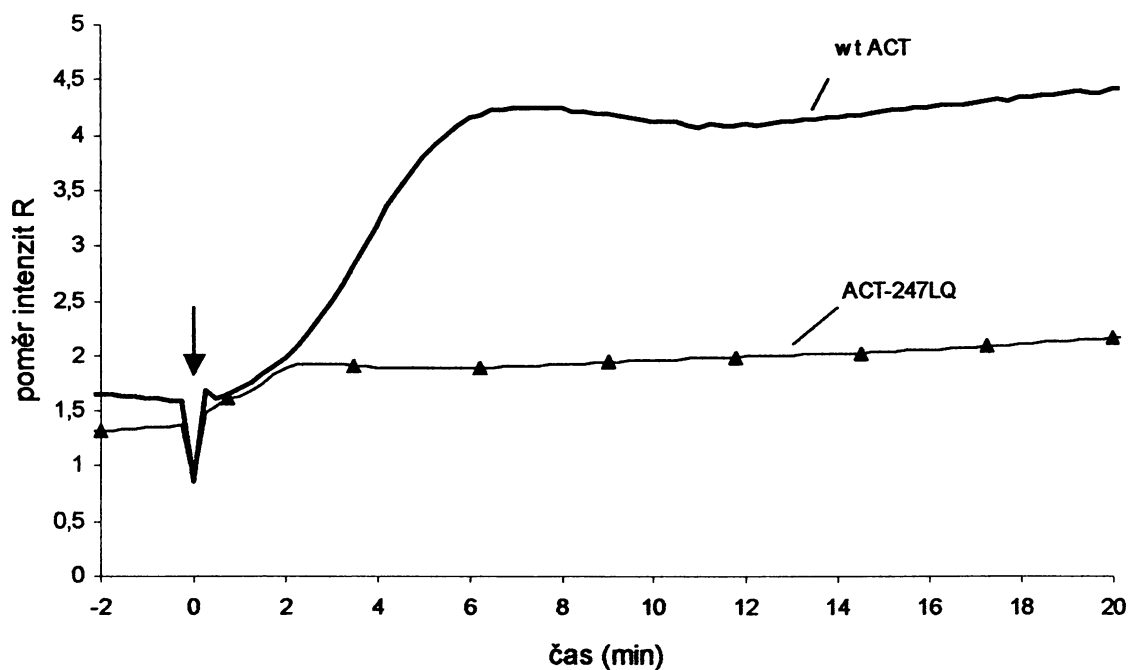
5.1.2 Vstup vápníku do buněk J774A.1 indukovaný ACT s mutacemi v AC doméně

Jak jsem už zmínila dříve, na tomto projektu jsem spolupracovala s laboratoří Ing. Petera Šeba (MBÚ AV ČR), kde se pro různé účely připravovaly a studovaly různé mutantní formy ACT. V této laboratoři bylo zjištěno (FIŠER *et al.* 2006), že mutantní toxiny se zvýšenou kanálovou aktivitou, neměly vliv na vstup vápníku do buněk. Naproti tomu mutanty se sníženou schopností translokace způsobovaly menší vstup vápníku do buněk v porovnání s wt-ACT. Lze proto předpokládat, že vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ je spojen s translokací AC-domény. Dále bylo dokázáno, že inserce různých oligopeptidů (CD^{8+} a CD^{4+} epitopy) do polypeptidového řetězce ACT neovlivňuje translokaci AC domény navzdory změnám v konformaci této domény, které tyto mutace vyvolávají

(OSIČKA *et al.*, 2000, LOUCKÁ *et al.* 2002). V této kapitole jsem se proto zabývala měřením toxinů mutantních v AC doméně, které ovlivňují konformaci AC-domény s cílem zjistit, do jaké míry může být vstup vápníku závislý na této konformaci. Všechny tyto toxiny neprodukuje cAMP, buďto kvůli neschopnosti vázat kalmodulin (ACT-247 LQ) nebo kvůli inzerci dipeptidu Cys-Thr mezi aminokyselinové zbytky 188 a 189 v ATP vazebném místě (ACT-336 OVA/det, ACT-108 OVA/det).

Buňky byly inkubovány 30 min v 3 μ M sondě Fura-2/AM a poté byly přemístěny na 30 do roztoku HBSS. Toxiny byly k buňkám přidány ve finální koncentraci 3 μ g/ml.

- **ACT-247 LQ:** toxin s vloženým dipeptidem (Leu-Gln) v pozici 247 v kalmodulin-vazebném místě (HEVEKR a LADANT 1997)

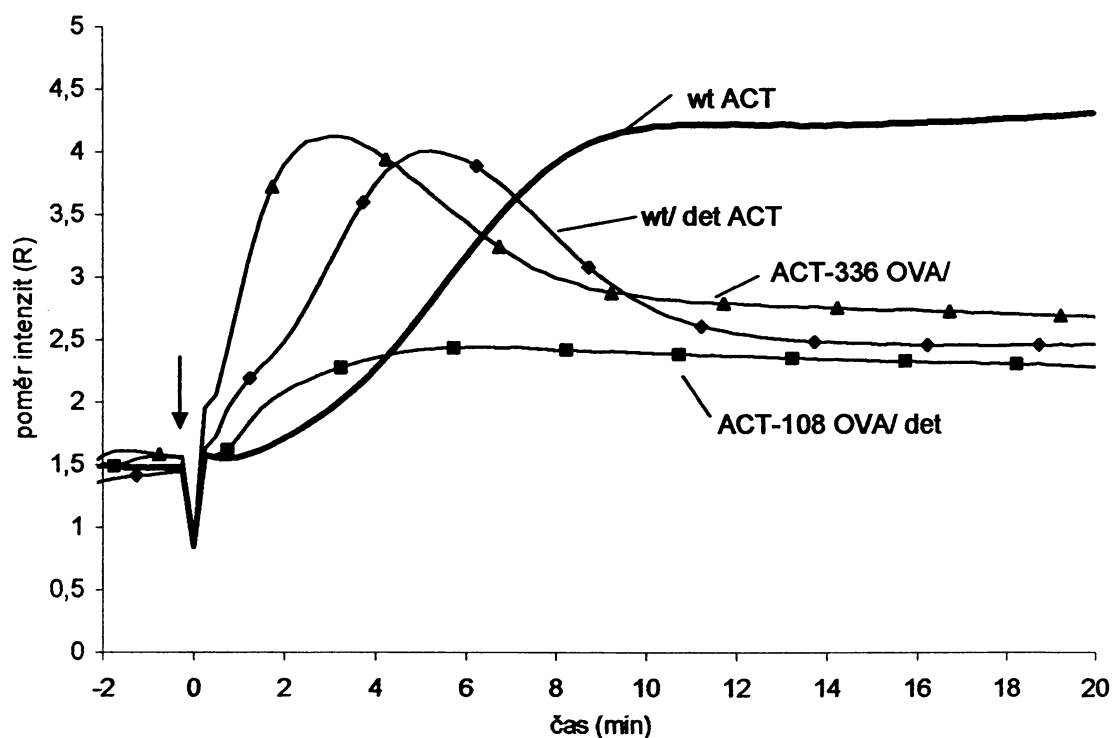


Obr. 25: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Toxiny ACT-247LQ a wt-ACT byly přidány k buňkám ve finální koncentraci 3 μ g/ml. Šipka označuje přidavek toxinu.

Z grafu (obr.25) je patrné, že toxin ACT-247LQ s mutací v kalmodulin-vazebném místě není schopen vyvolat vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Tato mutanta má stejnou translokační aktivitu jako wt-ACT, a přesto nezpůsobuje vzestup $[Ca^{2+}]_i$. To znamená, že ne vždy translokace AC domény způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a že vložení dipeptidu do kalmodulin-vazebného místa inhibuje vzestup $[Ca^{2+}]_i$.

- **ACT-336 OVA/det, ACT-108 OVA/det** : toxiny s vloženým oligopeptidem (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) v pozici 336 resp. 108 (OSIČKA *et al.* 2000). Toxiny mají stejnou translokační a kanálotvornou aktivitu jako wt-ACT. Tyto toxiny mají navíc v pozici 188 navázaný dipeptid, proto nejsou schopné tvořit v buňce cAMP z ATP (det = detoxifikované toxiny).

Lze předpokládat, že tyto mutantní toxiny budou způsobovat podobný vzestup $[Ca^{2+}]_i$ jako ACT/det (obr. 26). Tento toxin je také neschopný tvořit cAMP a stejně jako 108 OVA/det a 336 OVA/det nemá ovlivněnou translokační a kanálotvornou schopnost. Po přidání detoxifikovaného toxinu (ACT/det) dochází asi po 5. minutě k poklesu $[Ca^{2+}]_i$. Je to tím, že ACT/det netvoří cAMP a buňka má tak dostatek ATP na odstranění vápníku z cytoplazmy pomocí PMCA kanálů, čímž se buňka vyhýbá letálnímu účinku vysoké koncentrace $[Ca^{2+}]_i$ (FIŠER *et al.* 2006).



Obr. 26: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Toxiny wt-ACT, ACT/det (♦), ACT-336 OVA/det (▲) a ACT-108 OVA/det (■) byly přidány k buňkám ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$. Šipka označuje přidávek toxinu.

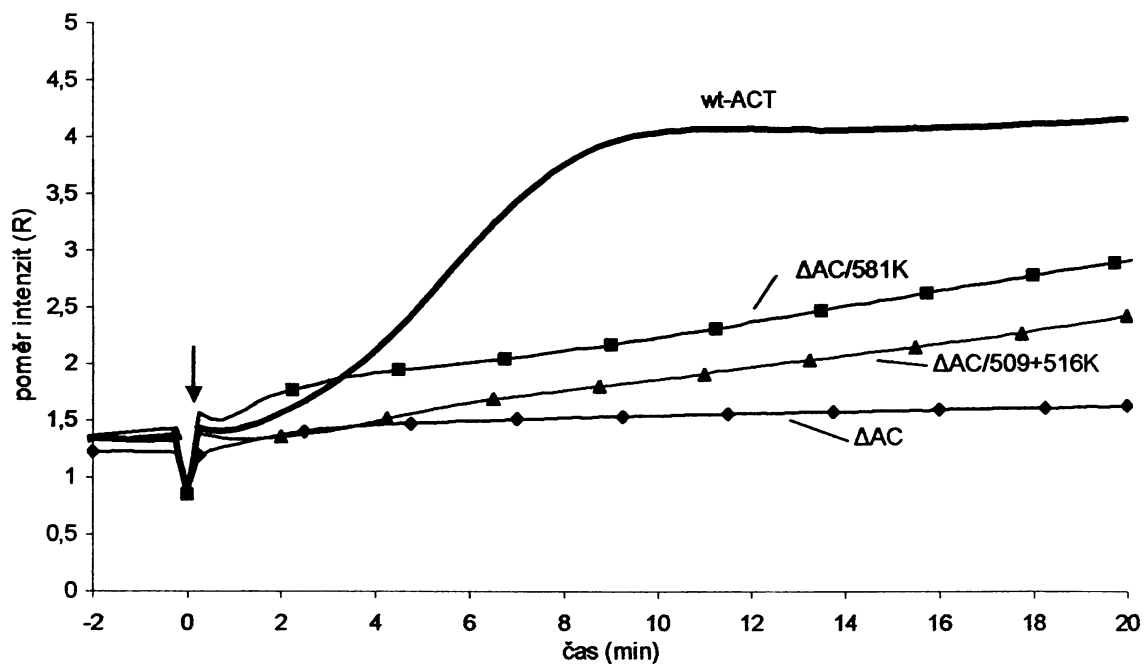
Z grafu (obr. 26) je patrné, že pouze toxin ACT-336 OVA/det způsobuje podobný vzestup $[Ca^{2+}]_i$ jako ACT/det. Toxin ACT-108 OVA/det způsobuje pouze malé zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Lze říci, že inserce stejného polypeptidu na dvě různá místa lokalizovaná mimo

kalmodulin-vazebné místo a mimo katalytické místo může stimulovat (ACT-336 OVA/det) nebo inhibovat (ACT-108 OVA/det) vzestup $[Ca^{2+}]_i$.

5.1.3 Vstup vápníku do buněk J774A.1 indukovaný ACT s mutacemi v hemolytické doméně

▪ hemolytická mutanta ACT- Δ AC/E581K

Jak jsem už zmínila na začátku předcházející kapitoly, vzestup intracelulární koncentrace vápníku je zřejmě spojen s translokací AC domény. Použitím řady mutant se zvýšenou hemolytickou aktivitou jsme hledali takovou variantu ACT, která nemá AC doménu (ACT- Δ AC), ale která přesto dovoluje vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Měřením na černých lipidových membránách (BASLER *et al.* 2006, připraveno k publikaci) se zjistilo, že substituce glutamátu za lyzín v pozici 581 u mutanty E581K způsobuje větší stabilitu a vyšší frekvenci tvorby kanálů tvořených ACT v plazmatické membráně. Proto byla zkonstruována mutanta ACT- Δ AC/E581K ke zjištění, zda mutace ovlivňující vlastnosti kanálů tvořených ACT může indukovat vzestup $[Ca^{2+}]_i$ bez translokace AC domény (obr. 27). Mutantní toxin ACT- Δ AC/E581K má cca 3x větší hemolytickou aktivitu než wt-ACT.



Obr. 27: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách J774A.1. Toxiny wt-ACT, ACT- Δ AC/581K (■), ACT- Δ AC/509+516K (▲) a ACT- Δ AC (◆) byly přidány k buňkám ve finální koncentraci 3 μ g/ml. Šipka označuje přidávek toxinů.

Z grafu (obr. 27) je vidět, že mutanta ACT- Δ AC/581K způsobuje větší nárůst $[Ca^{2+}]_i$ v porovnání s mutantou ACT- Δ AC, která vliv na vzestup $[Ca^{2+}]_i$ nemá. To by znamenalo, že zvýšená kanálová aktivita mutanty ACT- Δ AC/581K nahrazuje vzestup $[Ca^{2+}]_i$ vyvolaný translokací AC domény u wt-ACT.

▪ hemolytická mutanta ACT- Δ AC/E509K+E516K

Tato mutanta má zvýšenou hemolytickou aktivitu v kombinaci s 5x nižší selektivitou pro kationty membránových kanálů tvořených toxinem v porovnání s wt-ACT (FIŠER *et al.* 2006). Zjišťovala jsem, nakolik by snížená selektivita kanálů mohla hrát určitou roli při vzestupu koncentrace vápníku v buňce. Buňky byly inkubovány 30 min v 3 μ M roztoku sondy Fura-2/AM a poté byly buňky přeneseny na 30 min do roztoku HBSS. V roztoku HBSS byly buňky i v průběhu měření (obr. 27).

Mutantní toxin ACT- Δ AC/E509K+E516K vykazuje jen nepatrný nárůst $[Ca^{2+}]_i$ v porovnání s toxinem ACT- Δ AC/E581K (obr. 26). To znamená, že ani klesající iontová selektivita kanálů, tvořených toxinem ACT- Δ AC/E509K+E516K, spolu se zvýšenou hemolytickou aktivitou není schopná vyvolat vzestup $[Ca^{2+}]_i$.

Tento výsledek je zajímavý v porovnání s toxinem ACT- Δ AC/E581K, protože naznačuje, že pro vzestup $[Ca^{2+}]_i$ bez účasti translokace je důležitější frekvence tvorby pórů tvořených toxinem ACT- Δ AC/E581K, než jejich snížená iontová selektivita (toxin ACT- Δ AC/E509+516K).

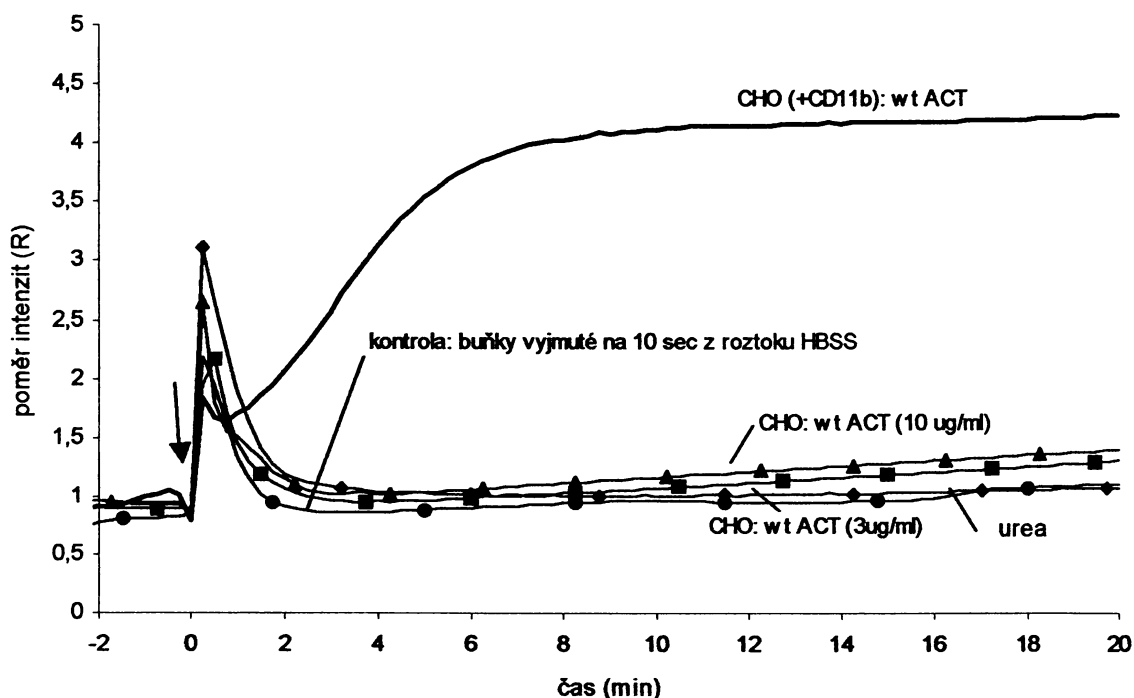
5.2 Interakce ACT s buňkami CHO

5.2.1 Role receptoru CD11b/CD18

Adenylátcyklázový toxin se váže na receptor CD11b/CD18 na povrchu buněk pomocí své repetitivní domény (viz kap 3.2.3). Ke zjištění, jakým způsobem tento receptor ovlivňuje vstup vápníku do buněk, jsem používala buňky CHO (ovariální buňky čínského křečka). CHO buňky neexprimují receptor CD11b/CD18, ale genetickou modifikací byl do nich vložen gen s promotorem zajišťující jeho vysokou expresi (dar od prof. C. Leclerc, Institut Pasteur). Získala jsem tedy dva typy buněk, které se navzájem lišily pouze přítomností resp. nepřítomností receptoru CD11b/CD18.

Srovnáním těchto buněčných typů co do indukce vstupu vápníku po přidání ACT je možné zjistit, jak se pro stejnou koncentraci ACT liší vstup vápníku v buňce s receptorem a bez něj a tím ozřejmit úlohu receptoru při tomto vstupu. Toto srovnání je výhodné i proto, že se tyto dva typy buněk liší pouze přítomností receptoru a ne přítomnými transportními systémy pro vápník a jinými fyziologickými parametry.

K oběma typům buněk jsem přidala toxin wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ (obr. 28). Z grafu je vidět, že přidání wt-ACT k buňkám exprimujícím receptor vyvolává vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$ velmi podobný jako u buněk J774A.1. Naproti tomu přidavek wt-ACT k buňkám, které integrinový receptor neexprimují, nevyvolává žádný vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$, a to ani v případě přidavku wt-ACT ve finální koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. To znamená, že pro zvýšení intracelulární koncentrace vápníku účinkem wt-ACT je přítomnost receptoru CD11b/CD18 na membráně nezbytná.



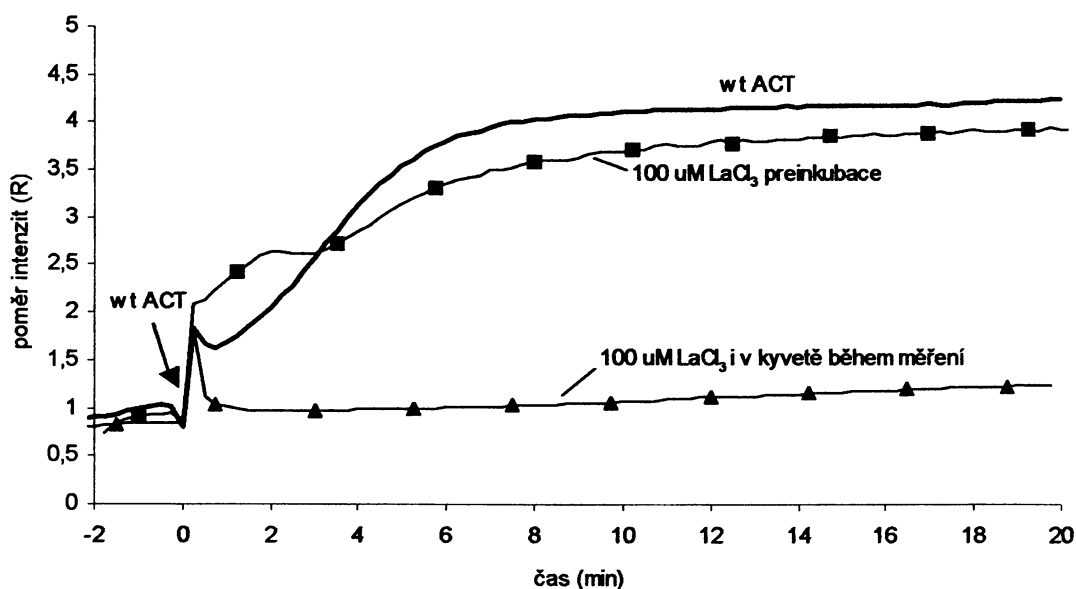
Obr.28: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách CHO. Buňky neexprimující integrin jsou označeny jako CHO, buňky které integrin exprimují jsou označeny jako CHO (+CD11b). Toxin wt-ACT byl přidán k buňkám v koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ (■), popřípadě 10 $\mu\text{g/ml}$ (▲). Jako kontrolní vzorek jsem použila samotnou močovinu ve finální koncentraci 80 mM (◆). Další kontrolní měření (●) zaznamenává vyjmutí sklíčka s buňkami CHO (+CD11b) na 10 sec bez přidavku ACT a močoviny. Šipka označuje přidavek toxinů, popř. močoviny nebo vyjmutí vzorku z kyvety.

Je zajímavé, že ihned po přidání toxinu k buňkám dochází ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ a do cca 2 min se hladina vápníku vrací na svoji původní úroveň (obr. 28). Uzavřela jsem, že za toto zvýšení je zodpovědná samotná močovina, neboť kontrolní vzorek (urea) vykazuje stejný počáteční vzestup s návratem stejně jako ostatní systémy. Buňky J774A.1 po přidání samotné močoviny tento efekt nevykazovaly (obr. 15).

Dále jsem zkusila buňky přichycené na sklíčku pouze vyndat 10 vteřin z kyvety s roztokem HBSS (tedy úkon, který jsem prováděla při každém měření, abych mohla přidat do kyvety určitý toxin) bez přídavku toxinu a močoviny (obr. 28). I tentokrát došlo ke krátkodobému zvýšení koncentrace vápenatých iontů. CHO buňky tedy reagují na samotné vyjmutí z roztoku HBSS a ne na přídavek močoviny.

5.2.2 Nespecifický inhibitor $LaCl_3$

Jak jsem zjistila, inhibitor $LaCl_3$ je schopen zablokovat vzestup $[Ca^{2+}]_i$ u buněk J774A.1 indukovaný toxinem (obr. 24). Proto jsem zkusila tímto inhibitorem zablokovat vstup vápníku i na buňkách CHO. Stejně jako při měření na J774A.1 jsem použila 100 μM koncentraci $LaCl_3$ (obr. 30). Buňky byly inkubovány 30 min v 3 μM sondě Fura-2/AM, poté byly přemístěny na 10 min do roztoku HBSS a na 20 min do roztoku 100 μM $LaCl_3$ v HBSS.

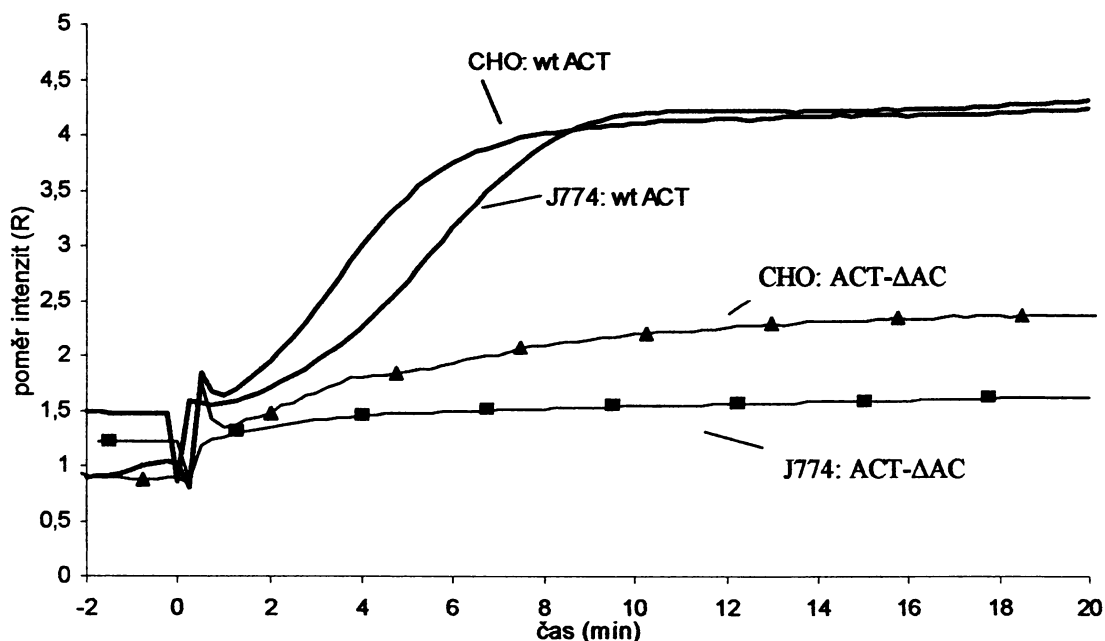


Obr.29: Záznam poměru intenzit R sondy Fura-2 v buňkách CHO. Buňky byly inkubovány 20 min v 100 μM $LaCl_3$, inhibitor byl přítomen i během měření v kyvetě (\blacktriangle). Buňky inkubované 20 min v 100 μM $LaCl_3$, pro měření byly přeneseny do HBSS bez $LaCl_3$ (\blacksquare). Šipka označuje přidavek toxinu wt-ACT ve finální koncentraci 3 $\mu g/ml$.

Jak je z grafu patrné (obr. 29), stejně jako u buněk J774A.1 (obr. 24), dochází v přítomnosti 100 μM LaCl_3 k inhibici vstupu vápníku do CHO buněk. Jsou-li buňky inkubovány 20 min v LaCl_3 , ale během měření jsou přeneseny do HBSS bez inhibitoru, k inhibici vstupu vápníku nedochází. To by znamenalo, že ACT zřejmě vyvolává vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$; stejným mechanismem jak u buněk J774A.1, tak i u CHO –lanthan totiž blokuje buněčné vápníkové kanály ireverzibilně (FIŠER-osobní sdělení), takže pravděpodobné, že vápník proudí do CHO buněk samotným ACT. K úplnému potvrzení této hypotézy by ale bylo zapotřebí vyzkoušet úplnou sérii inhibitorů analogicky jako u buněk J774A.1 (kap. 5.1.1).

5.3 Porovnání odpovědi J774A.1 a CHO buněk na přidávek wt-ACT a mutantních toxinů.

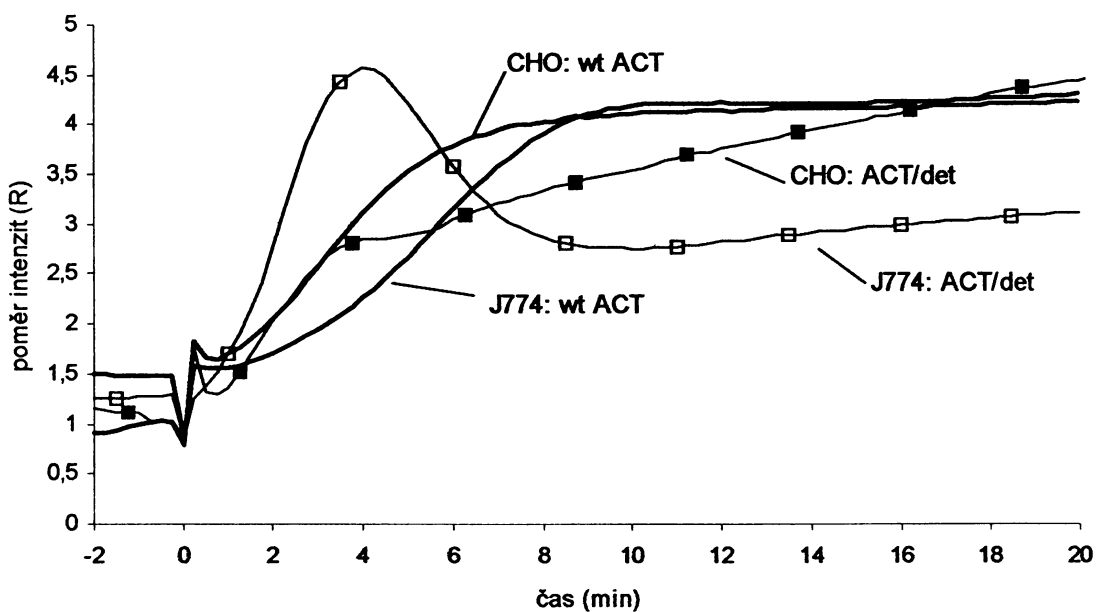
Dále jsem se zabývala porovnáváním indukce vstupu vápníku vyvolaných wt-ACT a jeho variantami na buňkách J774A.1 a buňkách CHO. Jedním z těchto toxinů byl ACT- ΔAC , který nemá AC doménu a proto by neměl indukovat vzestup $[\text{Ca}^{2+}]_i$. To se také potvrdilo při měření na buňkách J774A.1 (obr. 30).



Obr.30: Záznam poměru intenzit (R) sondy Fura-2 v buňkách CHO a J774A.1. Toxin ACT- ΔAC byl k buňkám CHO (\blacktriangle) přidán v koncentraci 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, při stejné koncentraci byl přidán i k buňkám J774A.1 (\blacksquare). Toxin wt-ACT byl k buňkám J774A.1 a CHO ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Šipka označuje přidávek toxinu ACT.

Při měření ACT- Δ AC na CHO buňkách se ale ukázalo, že toxin vyvolává vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Tento vzestup je sice malý, ale přesto o dost vyšší než v buňkách J774A.1.

Další toxin, který odpověděl odlišně u buněk J774A.1 a CHO buněk byl toxin ACT/det. Jak jsem už popsala v kapitole 5.1.2, detoxifikovaný ACT není schopen tvořit cAMP a buňka má tak dostatek ATP na pohánění transportních mechanismů, které odčerpávají vápník ven z cytoplazmy. To se projevuje velkým poklesem $[Ca^{2+}]_i$ u J774A.1 od 4. minuty po přidání toxinu (obr. 31).



Obr.31: Záznam poměru intenzit (R) sondy Fura-2 v buňkách CHO a J774A.1. Toxin ACT/det byl k buňkám CHO (■) přidán v koncentraci 3 μ g/ml, při stejné koncentraci byl přidán i k buňkám J774A.1 (◻). Toxin wt-ACT byl k buňkám J774 a CHO přidán ve finální koncentraci 3 μ g/ml. Šipka označuje přidavek toxinu ACT.

Naproti tomu při měření ACT/det na buňkách CHO se tento pokles neprojevil (obr. 31). Různá účinnost toxinů ACT- Δ AC a ACT/det v indukci vstupu vápníku na buňkách J774A.1 a buňkách CHO je nejspíš způsobena vyšší hustotou integrinového receptoru na buňkách CHO. Zatímco na buňkách J774A.1 se integrinový receptor vyskytuje přirozeně, u CHO buněk se gen pro integrinový receptor vkládá genetickou modifikací s cílem jeho vysoké exprese a proto je jeho hustota pravděpodobně větší než na buňkách J774A.1. Tato zvýšená hustota by podle obr. 30 a 31 měla dva důsledky. V případě toxinu ACT- Δ AC (obr. 30) by byl zvýšený vstup vápníku vyvolán zvýšeným počtem molekul toxinu vázaných na buňky prostřednictvím integrinu a normální

hemolytickou aktivitou tohoto toxinu, neboť chybí AC doména a není tudíž možný vstup vápníku spojený s její translokací, který předpokládáme u wt-ACT při interakci s J774A.1 buňkami. V případě toxinu ACT/det by bylo nutno uvažovat, že zvýšená vazba toxinu ACT/det vyvolává takový vstup vápníku, který buňka nedovede kompenzovat i přes dostatečné energetické rezervy (ATP).

6. Diskuze

Má práce navazuje na diplomovou práci Radovana Fišera (2003), který dokázal, že po interakci buněk J774A.1 s adenylátcyklázovým toxinem dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. Mým cílem bylo dále zjistit, jakým mechanismem ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ dochází.

Ke zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ může obecně dojít vstupem vápníku z extracelulárního prostředí nebo uvolněním vápníku z vnitřních zásob buňky. K zablokování dráhy uvolňující vápník z endoplazmatického retikula jsem použila thapsigargin (obr. 21). Tento inhibitor blokuje SERCA ATPázu, kterou prochází vápník směrem do ER. Tím se zajistí, že po určité době dojde k vyprázdnění ER od vápenatých iontů a po interakci ACT s buňkou nemůže ER uvolnit vápník do cytoplazmy buňky. Protože po přidání ACT k buňkám inkubovaných 40 min v thapsigarginu nedochází k inhibici vstupu vápníku, tato dráha se neúčastní zvýšení $[Ca^{2+}]_i$.

Na vstupu vápníku do buněk z extracelulárního prostředí se podílí několik typů vápníkových kanálů lokalizovaných na plazmatické membráně: receptorem ovládaný kanál (ROC), napětím ovládaný kanál (VOC) a kanál ovládaný intracelulární zásobou vápníku (SOC). Ke zjištění účasti vápníkových kanálů na indukci vstupu vápníku do buněk jsem použila specifické inhibitory těchto kanálů. K zablokování kanálu ROC jsem použila inhibitor SK&F 96365. Z grafu (obr. 16) je vidět, že po přidání ACT k buňkám inkubovaných v tomto inhibitoru dochází ke stejnému zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ v porovnání s wt-ACT u buněk bez inhibitoru, což znamená, že ROC kanál se nepodílí na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Inhibitor nifedipin (obr. 16) jsem použila k zablokování L-typu VOC a flunarizin (obr. 17) jsem použila k zablokování T-typu VOC kanálu. Po přidání ACT nedošlo u buněk inkubovaných s nifedipinem k výraznému ovlivnění indukce vstupu vápníku v porovnání s buňkami bez inhibitoru. Stejný výsledek nastal i u buněk s flunarizinem, což znamená že VOC kanál se nepodílí na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Použití 2-APB (inhibitor SOC kanálu) ukázalo, že po přidavku wt-ACT nedochází k inhibici indukce vstupu vápníku do buněk. To znamená, že se SOC kanál také nepodílí na zvýšení $[Ca^{2+}]_i$.

Tyto výsledky naznačují, že vzestup $[Ca^{2+}]_i$ je způsoben vstupem vápníku z extracelulárního prostředí prostřednictvím samotného toxinu tj. bez účasti vápníkových kanálů, které se za normálních okolností podílí na udržování určité hladiny

vápníku v buňce. Při měření mutantních toxinů, které měly sníženou schopnost translokace AC domény a toxinů se zvýšenou kanálotvornou aktivitou, autoři uzavřeli, že vzestup $[Ca^{2+}]_i$ je zřejmě spojen s translokací AC domény (FIŠER *et al.* 2006). Tento výsledek tak podporuje závěr z inhibitorů vápníkových kanálů, že vstup vápníku do buňky se děje prostřednictvím účinku samotného toxinu tj. bez účasti vápníkových kanálů.

Po zjištění, že vstup vápníku do buněk je zřejmě spojen s translokací AC domény, jsem se dále zabývala měřením toxinů s mutací v AC doméně, které ovlivňují konformaci AC-domény s cílem zjistit, do jaké míry může být vstup vápníku závislý na této konformaci. Jedním z těchto toxinů je ACT-247 LQ, který má vložený dipeptid (Leu-Gln) v pozici 247, kam se váže kalmodulin. Tento toxin má stejnou translokační schopnost jako wt-ACT. Z grafu (obr. 25) je patrné, že toxin ACT-247LQ s mutací v kalmodulin-vazebném místě není schopen vyvolat vzestup $[Ca^{2+}]_i$. To znamená, že ne vždy translokace AC domény způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace vápníku a že vložení dipeptidu do kalmodulin-vazebného místa inhibuje vzestup $[Ca^{2+}]_i$.

Další toxin, který má mutaci ovlivňující konformaci AC domény, je ACT-336 OVA/det, který má vložený oligopeptid v pozici 336. Toxin má ještě vložený dipeptid v pozici 188, a proto není schopen v buňce katalyzovat přeměnu ATP na cAMP (det=detoxifikovaný). Translokace AC domény a kanálotvorná schopnost však není ovlivněna. Z obr. 26 je vidět, že indukce vstupu $[Ca^{2+}]_i$ vyvolaná toxinem ACT-336 OVA/det má podobný průběh jako u toxinu ACT/det, který také není schopen tvořit cAMP v buňce. Charakter odpovědi u toxinu ACT-336 OVA/det napovídá, že hlavní vliv na vstup vápníku do buňky u tohoto toxinu má jeho neschopnost tvořit cAMP. Buňka má tak dostatek ATP na odstranění vápníku z cytoplazmy pomocí PMCA kanálů (to se projevuje v grafu náhlým snížením koncentrace vápníku v buňce po cca 4. minutě po přidání toxinu), čímž se buňka vyhýbá letálnímu účinku vysoké koncentrace $[Ca^{2+}]_i$. Dále z grafu (obr. 26) vyplývá, že vložení oligopeptidu na pozici 336 neovlivňuje konformaci AC domény natolik, aby tato změna konformace byla schopná zablokovat vstup vápníku do buněk během translokace AC domény.

Další toxin s mutací v AC doméně je ACT-108 OVA/det, který není schopen tvořit v buňce cAMP a má vložený oligopeptid v pozici 108. Stejně jako předchozí toxin nemá ovlivněnou translokační schopnost a kanálotvornou aktivitu. Z obr. 26 je patrné, že toxin ACT-108 OVA/det má v porovnání s toxinem ACT-336 OVA/det výrazně sníženou schopnost indukce vstupu vápníku v buňkách. Tyto dva toxiny se liší

pouze umístěním oligopeptidu, proto lze říci, že oligopeptid (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) v pozici 336 nemá na konformaci AC domény výraznější vliv, zatímco tentýž oligopeptid v pozici 108 ovlivňuje konformaci AC domény tak, že dochází k inhibici vstupu vápníku do buněk.

Adenylátcyklázový toxin pravděpodobně přenáší vápník do cytoplazmy podobným mechanismem jako ostatní vápníkové kanály, neboť vzestup $[Ca^{2+}]_i$ jím indukovaný je zablokován nescifickým inhibitorem vápníkových kanálů $LaCl_3$ (obr. 24). Účinek $LaCl_3$ je přitom reverzibilní a nemá vliv na translokaci a aktivitu AC domény (FIŠER *et al.* 2006). Mnoho bakteriálních toxinů, které pronikají plazmatickou membránou zaujímá lineární rozvinutou konformaci polypeptidového řetězce. Kdyby ACT pronikal přes membránu také v této rozvinuté podobě, těžko by to mohla být konformace odpovědná za vstup $[Ca^{2+}]_i$, protože mutantní toxiny s inzercí v AC doméně (ACT-247 LQ, ACT-108 OVA/det) mají nezměněnou schopnost translokace (v porovnání s wt-ACT), ale neindukují žádný vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Lze se proto domnívat, že ACT proniká membránou jiným způsobem a inzercí oligopeptidu do AC domény v určitém místě se naruší její schopnost zaujmout při transportu takovou konformaci v membráně, při které dochází k transportu iontů do cytoplazmy buněk. Tyto podrobnosti mechanismu vstupu vápníku jsou zatím čistě hypotetické a budou vyžadovat další studium.

Jak jsem už zmínila na začátku kapitoly, vzestup intracelulární koncentrace vápníku je zřejmě spojen s translokací AC domény. Proto jsem chtěla zjistit, zda mutanta se zvýšenou hemolytickou aktivitou, ale bez AC domény (ACT- Δ AC) dovoluje vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Vhodným toxinem byla mutanta ACT- Δ AC/E581K, protože se zjistilo že substituce glutamátu za lyzin v pozici 581 způsobuje větší stabilitu a vyšší frekvenci tvorby kanálů (BASLER *et al.* 2006, připraveno k publikaci) tvořených ACT v plazmatické membráně. Mutantní toxin ACT- Δ AC/E581K má cca 3x větší hemolytickou aktivitu než wt-ACT. Z grafu (obr. 27) je vidět, že po přidání toxinu ACT- Δ AC/581K dochází k indukci vstupu vápníku do buněk. To znamená, že zvýšená kanálotvorná aktivita mutanty ACT- Δ AC/E581K nahrazuje vzestup $[Ca^{2+}]_i$ vyvolaný translokací AC domény u wt-ACT.

Další mutantou bez AC domény vykazující zvýšenou hemolytickou aktivitu je toxin ACT- Δ AC/E509+516K, která má 5x nižší selektivitu pro kationy membránových kanálů tvořených toxinem v porovnání s wt-ACT (FIŠER *et al.* 2006). Mutantní toxin ACT- Δ AC/E509K+E516K (obr. 27) vykazuje jen nepatrný nárůst $[Ca^{2+}]_i$ v porovnání

s toxinem Δ ACT/E581K (obr. 27). To znamená, že klesající iontová selektivita kanálů, tvořených toxinem ACT- Δ ACT/E509K+516K, spolu se zvýšenou hemolytickou aktivitou není schopná vyvolat vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Tento výsledek tak naznačuje, že pro vzestup $[Ca^{2+}]_i$ bez účasti translokace je důležitější frekvence tvorby pórů tvořených toxinem ACT- Δ ACT/E581K, než jejich snížená iontová selektivita (toxin ACT- Δ ACT/E509+516K).

Dalším cílem mé diplomové práce bylo zjistit, jak odlišná je indukce vstupu vápníku u buněk bez integrinového receptoru v porovnání s buňkami, které integrin exprimují. Tyto studie jsem prováděla na CHO buňkách (ovariální buňky čínského křečka), které integrin neexprimují a na CHO buňkách, do kterých byl genetickou modifikací vložen gen pro integrin (GUERMONPREZ *et al.* 2001). Použití těchto buněk je výhodné i proto, že se tyto dva typy buněk liší pouze přítomností receptoru a ne přítomnými transportními systémy pro vápník. K oběma typům buněk jsem přidala toxin wt-ACT v koncentraci 3 μ g/ml (obr. 28). Zatímco CHO buňky exprimující integrin odpověděly podobně jako buňky J774A.1 (buňky přirozeně exprimující integrin) tj. zvýšením intracelulární koncentrace vápníku na stejnou hladinu, CHO buňky bez integrinového receptoru nevyvolaly žádné zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Zkusila jsem proto zvýšit přídavek toxinu wt-ACT na 10 μ g/ml (obr. 28). Ani tato vysoká koncentrace wt-ACT však nevyvolala u buněk CHO bez integrinu zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. Z těchto výsledků je patrné, že pro indukci vstupu vápníku je nutná přítomnost integrinového receptoru na membráně. Tento výsledek byl potvrzen dalším pokusem, kdy byla použita CD11b-specifická monoklonální protilátka M1/70, která blokuje vazbu ACT na integrinový receptor. V přítomnosti této protilátky nedochází k indukci vstupu vápníku po přidavku ACT k buňkám J774A.1 (FIŠER *et al.* 2006). Lze se proto domnívat, že k indukci vstupu vápníku je potřebná vazba ACT na integrinový receptor. Při použití mutantního toxinu ACT- Δ ACT, který se váže na integrinový receptor ve stejné míře jako wt-ACT, jsem zjistila, že tento toxin není schopen na buňkách J774A.1 vyvolat zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ (obr.27). K indukci vstupu vápníku je tedy potřebná vazba ACT na integrin, ale sama o sobě vazba ACT na integrin nestačí k vyvolání vstupu vápníku do buněk.

Při měření ACT- Δ ACT na CHO buňkách se ale ukázalo, že toxin vyvolává vzestup $[Ca^{2+}]_i$. Tento vzestup je sice malý, ale přesto o dost vyšší než v buňkách J774A.1 (obr. 30). Proto jsem zkusila proměřit i jiné mutantní toxiny s cílem zjistit, zda některý toxin také odpoví odlišně na CHO buňkách a buňkách J774A.1. Toxin, který takto odpověděl,

byl toxin ACT/det. Jak jsem už popsala v kapitole 5.1.2, detoxifikovaný ACT není schopen tvořit cAMP a buňka má tak dostatek ATP na pohánění transportních mechanismů, které odčerpávají vápník ven z cytoplazmy. To se projevuje velkým poklesem $[Ca^{2+}]_i$; u J774A.1 od 4. minuty po přidání toxinu (obr. 31). Naproti tomu při měření ACT/det na buňkách CHO se tento pokles neprojevil (obr. 31). Různá účinnost toxinů ACT- Δ AC a ACT/det v indukci vstupu vápníku na buňkách J774A.1 a buňkách CHO je nejspíš způsobena vyšší hustotou integrinového receptoru na buňkách CHO. Zatímco na buňkách J774A.1 se integrinový receptor vyskytuje přirozeně, u CHO buněk se gen pro integrinový receptor vkládá genetickou modifikací s cílem jeho vysoké exprese a proto je jeho hustota pravděpodobně větší než na buňkách J774A.1.

V případě toxinu ACT- Δ AC (obr. 30) je zvýšený vstup vápníku vyvolán zvýšeným počtem molekul toxinu vázaných na buňky a normální hemolytickou aktivitou, protože toxin nemá AC doménu a není tedy možný vstup vápníku spojený s její translokací (který předpokládáme u wt-ACT). V případě toxinu wt/det vyvolává zvýšená vazba na integrin takový vstup vápníku, který buňka nedovede kompenzovat i přes dostatečné energetické rezervy (ATP).

Vzhledem k tomu, že nespecifický inhibitor vápníkových kanálů $LaCl_3$ byl schopen zablokovat vstup vápníku do buněk J774A.1 po jejich interakci s ACT (obr. 24), zjišťovala jsem, zda $LaCl_3$ bude inhibovat vstup vápníku i v případě CHO buněk. Z grafu (obr. 29) je patrné, že v přítomnosti $LaCl_3$ dochází k inhibici vstupu vápníku do CHO buněk. Proto se domnívám, že ACT vyvolává vzestup $[Ca^{2+}]_i$ podobným mechanismem u buněk J774A.1 i u buněk CHO. K úplnému potvrzení této hypotézy by bylo potřeba použít stejné inhibitory vápníkových kanálů jako v případě buněk J774A.1.

Při pokusech na buňkách J774A.1 a CHO jsem používala relativně vysokou koncentraci ACT (3 μ g/ml). Tato koncentrace je vhodná při pozorování podstatného zvýšení $[Ca^{2+}]_i$ v buňce a při studiu vztahů mezi kanálotvornou aktivitou ACT, translokací AC domény a vstupem vápníku do buněk. Ve fyziologických podmínkách je koncentrace ACT mnohem menší, proto se očekává, že ACT vyvolá pouze malé zvýšení $[Ca^{2+}]_i$. K tomu přispívá i přítomnost kalmmodulinu a jiných proteinů v blízkosti plazmatické membrány, které vycytávají vápník přicházející z extracelulárního prostředí. Dalším důvodem je kompetice AC domény s ostatními buněčnými proteiny o dostupný kalmmodulin. Situace v přirozené živé buňce může být proto podstatně odlišná od experimentů prováděných *in vitro*.

7. Souhrn

Ve své diplomové práci jsem se věnovala studiu transportu vápenatých iontů do cytoplazmy buněk po jejich interakci s adenylátcyklázovým toxinem (ACT) bakterie *Bordetella pertussis*. Používala jsem tři buněčné linie: myší makrofágy (J774A.1), které přirozeně exprimují integrinový receptor pro ACT a na kterých jsem studovala mechanismus transportu vápníku do buněk, ovariální buňky křečka (CHO), které integrin neexprimují, a dále transfekovanou linii CHO, která integrin exprimuje. Porovnáváním buněk CHO exprimujících integrin a CHO buněk neexprimujících integrin jsem chtěla zjistit, jakou úlohu v indukci vstupu vápníku do buněk zde hraje přítomnost integrinu na povrchu buněk. Ke zjištění hladiny vápníku v buňce jsem používala fluorescenční stanovení pomocí sondy Fura-2/AM. Došla jsem k následujícím závěrům:

- vzestup $[Ca^{2+}]_i$ indukovaný toxinem ACT probíhá na účet vstupu vápníku z extracelulárního prostředí prostřednictvím samotného toxinu tj. bez účasti vápníkových kanálů a je blokován ionty lanthanu
- pokud je vstup vápníku spojen s translokací AC domény (FIŠER *et al.* 2006), pak translokace AC domény nezpůsobuje nutně zvýšení intracelulární koncentrace vápníku, pokud mutace v AC doméně mění její konformaci, jak ukazuje mutanta ACT-247 LQ postižená ve vazbě kalmodulinu
- inzerce stejného polypeptidu (Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu) do různých pozic v AC doméně buďto neovlivňuje indukci vstupu extracelulárního vápníku nebo ji může inhibovat, což rovněž ukazuje na určité požadavky na konformaci AC domény s ohledem na indukci vzestupu $[Ca^{2+}]_i$
- vzestup $[Ca^{2+}]_i$ bez účasti translokace AC domény je možný prostřednictvím pórů tvořených toxinem u mutantních „superhemolytických“ toxinů. Pro vzestup $[Ca^{2+}]_i$ bez účasti translokace je zde důležitější frekvence tvorby pórů než jejich snížená iontová selektivita

- ACT nejspíš vyvolává vzestup $[Ca^{2+}]_i$ na buňkách CHO a J774A.1 stejným mechanismem, různá účinnost toxinů v indukci vstupu vápníku na buňkách J774A.1 a buňkách CHO je zřejmě způsobena vyšší hustotou integrinového receptoru na buňkách CHO
- při koncentracích ACT používaných v této práci je přítomnost integrinového receptoru na membráně nutná pro indukci vstupu vápníku u CHO buněk i u buněk J774A.1 (FIŠER *et al.* 2006)

8. Seznam citované literatury:

1. Basar T., Havlíček V., Bezoušková S., Halada P., Hackett M., Šebo P. (1999). 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.* 274:10777-10783
2. Basar, T., Havlíček, V., Bezoušková, S., Hackett, M., Šebo, P. 2001. Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J. Biol. Chem.* 276:348-354
3. Bellalou J., Sakamoto H., Ladant D., Geoffroy C., Ullmann A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect. Immun.* 58:3242-3247
4. Benz R., Maier E., Ladant D., Ullmann A., Šebo P. (1994). Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. *J. Biol. Chem.* 269:27231-27239
5. Berridge M. J., Bootman M. D., Lipp P. (1998). Calcium- a life and death signal. *Nature*, Vol.395, 645-648.
6. Bootman M. D., Lipp P. (2001). Calcium signalling and regulation of cell function. *Encyclopedia of life sciences.*
7. Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Llewelyn-Roderick H., Berridge M.J., Peppiatt C.M. (2002). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of $InsP_3$ -induced Ca^{2+} release. *The FASEB Journal*, August, Vol.16: 1145-1150
8. Cardozo A.K., Ortis F., Storling J., Feng Y.M., Rasschaert J., Tonnesen M., Van Eylen F., Mandrup-Poulsen T., Herchuelz A., Eizivik D.L. (2005). Cytokines Downregulate the Sarcoendoplasmic Reticulum Pump Ca^{2+} ATPase 2b and Deplete Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} , Leading to Induction of Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Beta-cells. *Diabetes* 54: 452-461.
9. Dobrydneva Y. and Blackmore P. (2001). 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Directly inhibits Store-Operated Calcium Channels in Human Platelets. *Molecular Pharmacology* 3: 541-552.
10. Dolphin A. C. (2001). Calcium channel diversity. *Encyclopedia of life sciences.*

11. Dramsi S., Cossart P. (2003). Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infection and immunity*, June, 3614-3618.
12. Duke R.C., Witter R.Z., Nash P.B., Young J.D., Ojcius D.M. (1994). Cytolysis mediated by ionophores and pore-forming agents: role of intracellular calcium in apoptosis. *Faseb J.* 8:237-246
13. El-Azami El-Idrissi M., Bauche C., Loucká J., Osička R., Šebo P., Ladant D., Leclerc C. (2003). Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278:38514-38521
14. Fišer R. (2003). Diplomová práce. Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* a jeho interakce s biologickou membránou.
15. Fišer R., Mašín J., Basler M., Krůšek J., Špuláková V., Konopásek I., Šebo P. (2006). Membráně translokace *Bordetella* adenylate cyclase toxin promotes calcium entry into CD11b⁺ J774A.1 macrophage cells. (připraveno k publikování)
16. Glazka, A. 1992. World Health Stat. Q.Q. 45:238
17. Glaser, P., Emaoglou-Lazaridou, A., Krin, E., Ladant, D., Barzu, O., Danchin, A. 1989. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *EMBO J.* 8:967-972
18. Goldfine H. and Wadsworth S.J. (2002). Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection.* Vol.4: 1335-1343.
19. Gray M., Szabo G., Otero A.S., Gray L., Hewlett E.L. (1998). Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J. Biol. Chem.* 273:18260-18267
20. Gregory R.B., Rychkov G., Barritt G.J. (2001). Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem.J.* 354: 285-290
21. Gross, M. K., Au, D.C., Smith, A.L., and Storm, D.R. 1992. 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.* 89:4898-4902

22. Guermonprez P., Khelef N., Blouin E., Rieu P., Ricciardi-Castagnoli P., Guiso N., Ladant D., Leclerc C. (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 193:1035-1044
23. Gustafsson A.J., Ingelman-Sundberg H., Dzabic M., Awasum J., Nguyen K.H., Ostenson C.G., Pierro C., Tedeschi P., Woolcott O., Chionan S., Lund P.E., Larson O., Islam M.S. (2005). Ryanodine receptor-operated activation of TRP-like channels can trigger critical Ca²⁺-signaling events in pancreatic beta-cells. *Faseb Journal*, Feb.; 19 (2): 301-303
24. Hanski E. (1989). Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem. Sci.* 14:459-463
25. Harper C., Wootton L., Michelangeli F., Lefievre L., Barratt C., Publiconer S. (2005). Secretory pathway Ca²⁺-ATPase (SPCA1) Ca²⁺ pumps, not SERCA, regulate complex [Ca²⁺]_i signals in human spermatozoa. *The Journal of Cell Science* 118, 1673-1685
26. Haugland R.P. (1999). Handbook of fluorescent probes and research chemicals.
27. Havlíček V., Higgins L., Chen W., Halada P., Šebo P., Sakamoto H., Hackett M. (2001). Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J. Mass. Spectrom.* 36:384-391
28. Heveker, N., and Ladant, D. (1997). Characterization of mutant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins with reduced affinity for calmodulin - Implications for the mechanism of toxin entry into target cells, *European Journal of Biochemistry* 243, 643-649.
29. Hiroshi K., Fujio O., Hidefumi F., Keisuke T., and Koji O. (2003). Mechanism and role of high-potassium-induced reduction of intracellular Ca²⁺ concentration in rat osteoclasts. *AJP Cell Physiol* 285: C457-C466.
30. Hoogland T.M., Saggau P. (2004). Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors. *J Neurosci* Sep 29; 24 (39): 8416-27.
31. Hořejší V., Bartůňková J. (2001). Základy imunologie. *Nakladatelství Triton.*
32. Hu P.S. (1993). On the usefulness of Fura-2 measurements of intrasynaptosomal calcium levels in rat cortical synaptosomes to study mechanisms of presynaptic function. *Acta Physiol Scand* 148: 115-123.

33. Murthy S.K., Zhou H., Huang J., Pentylala S.N. (2004). Activation of PLC- δ 1 by $G_{i/o}$ -coupled receptor agonists. *AJP Cell Physiol* 287: C1679-C1687
34. Kramer R.H. (2001). Cyclic Nucleotide-gated Ion Channels. *Encyclopedia of Life Sciences*.
35. Knapp O., Maier E., Polleichtner G., Mašin J., Šebo P., Benz R. (2003). Channel formation in model membranes by the Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: effect of calcium. *Biochemistry* (26), 8077-8084.
36. Krause K.- H., Fivaz M., Monod A., Gisou van der Goot F. (1998). Aerolysin induces G-protein activation and Ca^{2+} release from intracellular stores in human granulocytes. *The Journal of biological chemistry*, July, Vol.273 No.29, 18122-18129.
37. Kumar P., Ahuja N., Bhatnagar R. (2002). Anthrax edema toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. *Infection and immunity*, Sept., 4997-5007.
38. Ladant D., Ullmann A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology*, Vol.7 No.4, 172-176.
39. Lambert D.G. (1999). Calcium signaling protocols. *Methods in molecular biology* 114: Humana Press, Totowa, New Jersey.
40. Loucká, J., Schlecht, G., Vodolánová, J., Leclerc, C., Šebo, P. 2002. Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect. Immun.* 70:1002-1005
41. Mašin J. (2005). Doktorská dizertační práce.
42. Mattoo S. and Cherry J.D. (2005). Molecular pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestation of Respiratory Infection Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews*, Apr Vol.18, No.2, 326-382.
43. Nhieu G. T. V., Clair C., Grompone G., Sansonetti P. (2004). Calcium signalling during cell interaction with bacterial pathogens. *Biology of the cell* (96), 93-101.
44. Osička R., Osičková A., Basar T., Guermontprez P., Rojas M., Leclerc C., Šebo P. (2000). Delivery of CD8⁺ T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase: Delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infection and immunity*, Jan., 247-256.

45. Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R., Šebo, P. 1999. An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J. Biol. Chem.* 274:37644-37650
46. Otero A. S., Yi X.B., Gray M.C., Szabo G., Hewlett E.L. (1995). Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* 270:9695-9697
47. Ozaki Y., Kume S. (1988). Functional responses of aequorin-loaded human neutrophils. Comparison with Fura-2-loaded cells. *Biochem Biophys Acta* 972: 113-119.
48. Parekh A. B. and Putney J. W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85:757-810
49. Patrat C., Serres C., Jouannet P. (2000). Induction of a sodium ion influx by progesterone in human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, May; 62 (5): 1380-6.
50. Rizzuto R., Bernardi P., Pozzan T. (2000). Mitochondria as all round players of the calcium game. *J. Physiol.* 529:37-47
51. Rogel A. and Hanski E. (1992). Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 267:22599-22605
52. Rose T., Šebo P., Bellalous J., Ladant D. (1995). Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate cyclase toxin. *The Journal of biological chemistry*, Vol.270 No.44, 26370-26376.
53. Shibuya I., Douglas W.W. (1993). Indications from Mn-quenching of Fura-2 fluorescence in melanotrophs that dopamine and baclofen close Ca channels that are spontaneously open but not those opened by high [K⁺]_o; and that Cd preferentially blocks the latter. *Cell calcium* 14:33-44.
54. Šebo P., Ladant D. (1993). Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* α -haemolysin translocator. *Mol. Microbiol.* 9:999-1009
55. Šimšová M., Šebo P., Leclerc C. (2004). The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* –a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *J. Med. Microbiol* 293, 571-576.

56. Thore S., Dyachok O., Gylfe E., Tengholm A. (2005). Feedback activation of phospholipase C via intracellular mobilization and store-operated influx of Ca^{2+} in insulin-secreting beta-cells. *The Journal of Cell Science*, Oct 1; 118 (Pt19): 4463-71
57. Uhlén P., Laestadlus Á., Jahnukainen T., Söderblom T., Bäckhed F., Celsi G., Brismar H., Normark S. (2000). α -Haemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* induces Ca^{2+} oscillations in renal epithelial cells. *Nature*, June, Vol.405, 694-697.
58. Wadsworth S., Goldfine H. (1999). *Listeria monocytogenes* phospholipase C-dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infect. Immun.* 67:1770-1778
59. Wang H., Cai H.R. (2003). Modulation of extracellular calcium on miniature inhibitory postsynaptic currents of *Xenopus*' optical tectal neurons. *Sheng Li Xue Bao*. Oct.25; 55 (5): 599-606.
60. Weiss A. A., Hewlett E.L., Myers G.A., Falkow S. (1984). Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* 150:219-222
61. Wingertzahn M.A. and Ochs R.S. (2001). Changes in ryanodine receptor-mediated calcium release during skeletal muscle differentiation. II. Resolution of a Caffeine-Ryanodine Paradox. *Exp. Biol. Med.*, Feb,226 (2): 119-26.