

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra genetiky a mikrobiologie**

## **DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* – oligomerizace v membráně a využití při indukci antigenně specifické imunitní odpovědi

**Mgr. Jana Vojtová**

**Školitel : Ing. Peter Šebo, CSc.**

**Konzultant : RNDr. Oldřich Benada, Csc.**

Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky  
V Praze 2006

Prohlašuji, že jsem doktorskou dizertační práci vypracovala samostatně a že jsem použila pouze prameny, které cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

Předložená dizertační práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v laboratoři molekulární mikrobiologie bakteriálních patogenů a v laboratoři elektronové mikroskopie.

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Peterovi Šebovi, CSc. za vedení dizertační práce, cenné podněty a připomínky. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat RNDr. Oldřichu Benadovi, CSc. za užitečné rady a konzultace dosažených výsledků. Děkuji také Jiřině Loucké, Markovi Baslerovi a Radimovi Osičkovi za spolupráci na některých experimentech a členům obou laboratoří za vytvoření příjemné pracovní atmosféry.

Dále děkuji Dr. Olze Kofroňové za zpracování vzorků pro skenovací elektronový mikroskop, Oliverovi Knappovi z laboratoře prof. Rolanda Benze (Wurzburg, Německo) za analýzu mutantních forem ACT v planárních lipidových membránách a Geraldine Schlecht z laboratoře Dr. Claude Leclerc (Institut Pasteur, Francie) za provedení imunologických pokusů s konstrukty ACT nesoucími MalE epitop. Děkuji rovněž panu doc. RNDr. Pavlovi Hozákovi a Toljovi Philimonenkovi za konzultace a poskytnutí programu na testování statisticky významného shlukování označených antigenů.

V neposlední řadě děkuji svému manželovi a svým rodičům za jejich velkou trpělivost a podporu během mého postgraduálního studia.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>2. PŘEHLED LITERATURY</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. BAKTERIE BORDETELLA PERTUSSIS</b> .....	<b>12</b>
2.1.1. <i>Patogeneze černého kašle</i> .....	12
2.1.2. <i>Prevence černého kašle</i> .....	13
2.1.2.1. Očkování proti černému kašli v České republice.....	14
2.1.3. <i>Faktory virulence</i> .....	14
2.1.3.1. Adheziny.....	15
2.1.3.2. Toxiny.....	16
2.1.3.3. Regulace exprese faktorů virulence.....	18
<b>2.2. TOXINY TVOŘÍCÍ PÓRY PRODUKOVANÉ GRAMNEGATIVNÍMI BAKTERIEMI A JEJICH INTERAKCE S BIOLOGICKOU MEMBRÁNOU</b> .....	<b>19</b>
2.2.1. <i>Struktura biologické membrány</i> .....	19
2.2.1.1. Lipidová dvojvrstva.....	19
2.2.1.1.1. Uspořádání lipidů v membráně.....	20
2.2.1.2. Membránové proteiny.....	20
2.2.1.3. Modely biologické membrány.....	21
2.2.1.3.1. Model tekuté mozaiky.....	21
2.2.1.3.2. Membránové mikrodomény (rafty).....	21
2.2.2. <i>RTX toxiny</i> .....	24
2.2.2.1. Adenylátcyklázový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i> .....	24
2.2.2.1.1. Syntéza, sekrece a struktura ACT.....	24
2.2.2.1.2. Model interakce ACT s membránou.....	28
2.2.2.1.3. Mechanismus tvorby pórů u ACT.....	30
2.2.2.1.4. Účinky ACT na cílové buňky.....	31
2.2.2.3. <i>Hemolyziny typu Sh1A bakterie Serratia marcescens</i> .....	34
2.2.2.3.1. Syntéza, sekrece a struktura hemolyzinu Sh1A.....	34
2.2.2.3.2. Mechanismus tvorby pórů u hemolyzinu Sh1A.....	35
2.2.2.3.3. Účinky hemolyzinu Sh1A na cílové buňky.....	36
2.2.2.4. <i>Cytolyziny skupiny Vibrionaceae</i> .....	36
2.2.2.4.1. Syntéza, sekrece a struktura cytolyzinu bakterie <i>Vibrio cholerae</i> .....	36
2.2.2.4.2. Mechanismus tvorby pórů u cytolyzinu bakterie <i>Vibrio cholerae</i> .....	37
2.2.2.4.3. Účinky cytolyzinu <i>Vibrio cholerae</i> na cílové buňky.....	38
2.2.2.4. <i>Aerolyzin</i> .....	38
2.2.2.4.1. Syntéza, sekrece a struktura aerolyzinu.....	39
2.2.2.4.2. Mechanismus tvorby póru.....	39
2.2.2.4.3. Účinky aerolyzinu na cílové buňky.....	40
2.2.2.5. <i>Koliciny</i> .....	41
2.2.2.5.1. Syntéza, sekrece a struktura kolicinů.....	41
2.2.2.5.2. Mechanismus tvorby póru.....	42
2.2.2.5.3. Účinky kolicinů na cílové buňky.....	43
<b>2.3. VYUŽITÍ ACT PRO INDUKCI ANTIGENNĚ SPECIFICKÉ IMUNITNÍ ODPOVĚDI</b> .....	<b>43</b>
2.3.2. <i>Indukce antigenně specifických imunitních mechanismů</i> .....	43
2.3.2.1. Buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď.....	44
2.3.2.2. Využití ACT pro dopravu cizorodých epitopů do buněk prezentujících antigen a k indukci specifických buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí.....	45
<b>3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1. STUDIUM OLIGOMERIZACE ADENYLÁT-CYKLÁZOVÉHO TOXINU V MEMBRÁNĚ ERYTROCYTŮ</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2. PŘÍPRAVA SADY REKOMBINANTNÍCH ACT NESOUCÍCH SPECIFICKÝ CD4<sup>+</sup> T-BUNĚČNÝ EPITOP</b> .....	<b>49</b>
<b>4. MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1. SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ A MATERIÁLŮ</b> .....	<b>50</b>
4.1.1. <i>Použité protilátky</i> .....	50
4.1.2. <i>Použité restriční endonukleázy a ostatní enzymy</i> .....	51



4.1.3.	<i>Použité bakteriální toxiny</i> .....	52
4.1.4.	<i>Použité standardy molekulových hmotností proteinů</i> .....	52
<b>4.2.</b>	<b>PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3.</b>	<b>ROZTOKY A KULTIVAČNÍ MÉDIA</b> .....	<b>53</b>
4.3.1.	<i>Roztoky a pufry</i> .....	53
4.3.2.	<i>Kultivační média</i> .....	59
4.3.2.1.	<i>Tekutá kultivační média</i> .....	59
4.3.2.2.	<i>Pevná kultivační média</i> .....	60
<b>4.4.</b>	<b>GENETICKÉ METODY</b> .....	<b>60</b>
4.4.1.	<i>Použité plazmidy</i> .....	60
4.4.2.	<i>Použité bakteriální kmeny</i> .....	61
4.4.3.	<i>Uchovávání bakteriálních kmenů</i> .....	61
4.4.4.	<i>Příprava kompetentních buněk Escherichia coli</i> .....	61
4.4.5.	<i>Izolace plazmidové DNA metodou alkalické lýze</i> .....	62
4.4.6.	<i>Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk</i> .....	62
4.4.7.	<i>Manipulace s plazmidovou DNA</i> .....	63
4.4.7.1.	<i>Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami</i> .....	63
4.4.7.2.	<i>Parciální štěpení plazmidové DNA restrikční endonukleázou</i> .....	63
4.4.7.3.	<i>Zatupení kohezních konců fragmentů plazmidové DNA</i> .....	63
4.4.7.4.	<i>Ligace fragmentů DNA</i> .....	64
4.4.8.	<i>Elektroforéza v agarózovém gelu</i> .....	64
4.4.9.	<i>Izolace fragmentu plazmidové DNA z agarózového gelu pomocí Lego kitu</i> .....	64
4.4.10.	<i>Konstrukce mutantních proteinů ACT/MalE</i> .....	65
4.4.11.	<i>Detoxifikace ACT/MalE proteinů</i> .....	66
4.4.12.	<i>Sekvenace plazmidové DNA</i> .....	67
<b>4.5.</b>	<b>PURIFIKACE ACT</b> .....	<b>68</b>
4.5.1.	<i>Příprava močovinnového extraktu</i> .....	68
4.5.2.	<i>Purifikace ACT iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharóze</i> .....	68
4.5.3.	<i>Purifikace ACT hydrofóbní chromatografií na Phenyl-Sepharóze</i> .....	69
4.5.4.	<i>Biotinylace ACT</i> .....	69
4.5.5.	<i>SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)</i> .....	70
4.5.6.	<i>Stanovení koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové</i> .....	70
<b>4.6.</b>	<b>STANOVENÍ ADENYLÁTCYKLÁZOVÉ, VAZEBNÉ, INVAZIVNÍ A HEMOLYTICKÉ AKTIVITY ACT</b> .....	<b>70</b>
4.6.1.	<i>Příprava erytrocytů</i> .....	70
4.6.2.	<i>Stanovení adenylátcyklázové (AC) aktivity ACT</i> .....	71
4.6.2.1.	<i>Vlastní postup při stanovení adenylátcyklázové aktivity</i> .....	71
4.6.2.2.	<i>Výpočet adenylátcyklázové aktivity</i> .....	72
4.6.2.3.	<i>Stanovení specifické AC aktivity u purifikovaného toxinu</i> .....	73
4.6.3.	<i>Stanovení vazebné a invazivní aktivity purifikovaného toxinu</i> .....	74
4.6.4.	<i>Stanovení invazivní aktivity ACT měřením hladiny cAMP</i> .....	74
4.6.5.	<i>Stanovení hemolytické aktivity purifikovaného toxinu</i> .....	75
<b>4.7.</b>	<b>MIKROSKOPICKÉ METODY</b> .....	<b>76</b>
4.7.1.	<i>Transmisní elektronová mikroskopie</i> .....	76
4.7.1.1.	<i>Negativní barvení ovčích erytrocytů po inkubaci s ACT</i> .....	76
4.7.1.2.	<i>Imunodetekce ACT</i> .....	76
4.7.1.2.1.	<i>Nepřímé imunoznačení ACT pomocí IgG s navázaným 5 nm zlatem</i> .....	76
4.7.1.2.2.	<i>Nepřímé imunoznačení ACT pomocí proteinu A s navázaným 5 nm zlatem</i> .....	77
4.7.2.	<i>Skenovací elektronová mikroskopie</i> .....	78
4.7.3.	<i>Fluorescenční a konfokální mikroskopie</i> .....	78
<b>4.8.</b>	<b>METODY STUDIA KOMPLEXŮ ACT</b> .....	<b>79</b>
4.8.1.	<i>Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE)</i> .....	79
4.8.2.	<i>Western blot</i> .....	80
4.8.3.	<i>Kvantifikace tvorby komplexů ACT</i> .....	80
4.8.4.	<i>Analýza komplexů ACT ve druhém rozměru</i> .....	81
4.8.5.	<i>Imunoprecipitace ACT z membrány erytrocytů</i> .....	81
<b>4.9.</b>	<b>VAZBA ACT NA ERYTROCYTY PO ODSTRANĚNÍ CHOLESTEROLU Z MEMBRÁNY</b> .....	<b>82</b>
<b>4.10.</b>	<b>VAZBA ACT NA LIPOZÓMY</b> .....	<b>82</b>
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>83</b>
<b>5.1.</b>	<b>OLIGOMERIZACE ADENYLÁTCYKLÁZOVÉHO TOXINU V MEMBRÁNĚ OVČÍCH ERYTROCYTŮ... 83</b>	
5.1.1	<i>Oligomery adenylátcyklázového toxinu tvoří v membráně pravidelné kompaktní struktury detekovatelné pomocí negativního barvení</i> .....	83

5.1.2.	<i>Hemolytická aktivita adenylátcyklázového toxinu je zodpovědná za morfologické změny erytrocytů</i> .....	86
5.1.3.	<i>Adenylátcyklázový toxin tvoří v membráně ovčích erytrocytů pravděpodobně nejméně dimery</i> .....	91
5.1.4.	<i>Extrakce oligomerů, monomeru a zkrácené formy ACT z membrány ovčích erytrocytů</i> .....	100
5.1.5.	<i>Množství oligomerů ACT vytvořené v membráně odpovídá specifické hemolytické aktivitě toxinu</i> .....	107
<b>5.2.</b>	<b>VAZBA ACT DO SPECIFICKÝCH OBLASTÍ V MEMBRÁNĚ ERYTROCYTŮ</b> .....	<b>114</b>
5.2.1.	<i>Tvorba shluků molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů není závislá na laterální pohyblivosti molekul toxinu v membráně</i> .....	114
5.2.2.	<i>Shluky molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů mají konstantní stechiometrii</i> .....	116
5.2.3.	<i>Odstranění cholesterolu z membrány ovčích erytrocytů vede ke snížení vazby ACT</i> .....	118
5.2.4.	<i>ACT se nejvíce váže na lipozómy připravené ze sfingomyelinu a cholesterolu</i> .....	118
<b>5.3.</b>	<b>PŘÍPRAVA SADY TOXOIDŮ ACT NESOUCÍCH SPECIFICKÝ CD4<sup>+</sup> T-BUNĚČNÝ EPITOP MALE</b> .....	<b>120</b>
5.3.1.	<i>Konstrukce mutantních ACT/MalE</i> .....	120
5.3.2.	<i>Kontrola produkce ACT/MalE proteinů</i> .....	121
5.3.3.	<i>Vazebná, invazivní a hemolytická aktivita ACT/MalE proteinů</i> .....	121
5.3.4.	<i>Detoxifikace ACT/MalE proteinů</i> .....	122
5.3.5.	<i>Purifikace detoxifikovaných ACT/MalE proteinů</i> .....	122
5.3.6.	<i>Studium schopnosti toxoidů ACT/MalE dopravovat vložený epitop MalE do buněk prezentujících antigen a stimulovat specifickou CD4<sup>+</sup> T-buněčnou imunitní odpověď</i> .....	123
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>125</b>
6.1.	<b>OLIGOMERIZACE ADENYLÁT-CYKLÁZOVÉHO TOXINU V MEMBRÁNĚ OVČÍCH ERYTROCYTŮ</b> .....	<b>125</b>
6.2.	<b>PŘÍPRAVA SADY REKOMBINANTNÍCH ACT NESOUCÍCH SPECIFICKÝ CD4<sup>+</sup> T-BUNĚČNÝ EPITOP</b> .....	<b>134</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚRY</b> .....	<b>137</b>
7.1.	<b>OLIGOMERIZACE ADENYLÁT-CYKLÁZOVÉHO TOXINU V MEMBRÁNĚ OVČÍCH ERYTROCYTŮ</b> .....	<b>137</b>
7.2.	<b>INDUKCE ANTIGENNĚ SPECIFICKÉ IMUNITNÍ ODPOVĚDI</b> .....	<b>138</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>140</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>158</b>
9.1.	<b>PUBLIKACE 1</b> .....	<b>158</b>
9.2.	<b>PUBLIKACE 2</b> .....	<b>159</b>
9.3.	<b>PUBLIKACE 3</b> .....	<b>160</b>

## SEZNAM ZKRATEK

$A_{492}$	absorbance při vlnové délce 492 nm
$A_{541}$	absorbance při vlnové délce 541 nm
AC doména	adenylátcyklázová doména
ACT	adenylátcyklázový toxin
ADP	adenozin-5'-difosfát
$A_H$	hemolytická aktivita ACT
$A_I$	celková adenylátcyklázová aktivita v systému
$A_B$	absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erytrocytů bez ACT
$A_M$	absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erytrocytů s ACT
$A_N$	absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erytrocytů s mutovaným ACT
$A_{0M}[^3H]$	naměřená hodnota radioaktivity [2,8- $^3H$ ]cAMP v nulovém vzorku
$A_{0M}[^{32}P]$	naměřená hodnota radioaktivity fosforu [ $^{32}P$ ] v nulovém vzorku
$A_{0K}$	upravená hodnota radioaktivity nulového vzorku
$A_{0M}[^{32}P]$	naměřená radioaktivita fosforu [ $^{32}P$ ] nulového vzorku
$A_{0M}[^3H]$	naměřená radioaktivita [2,8- $^3H$ ]cAMP nulového vzorku
$A_{VK}[^{32}P]$	upravená hodnota radioaktivity fosforu [ $^{32}P$ ] ve vzorku
$A_{VM}[^3H]$	naměřená hodnota radioaktivity [2,8- $^3H$ ]cAMP ve vzorku
$A_{VM}[^{32}P]$	naměřená hodnota radioaktivity fosforu [ $^{32}P$ ] ve vzorku
$A_T[^3H]$	celková hodnota radioaktivity [2,8- $^3H$ ]cAMP v reakčním mixu
ATP	adenozin-5'-trifosfát
BN-PAGE	modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (z angl. <u>B</u> lue <u>N</u> ative <u>P</u> olyacrylamid <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
bp	párů bází
BSA	hovězí sérový albumin
BvgA	aktivátor <i>bvg</i> operonu
BvgS	senzor <i>bvg</i> operonu
CaM	kalmodulin
cAMP	adenozin-3',5'-(cyklický) monofosfát
CBS	vazebné místo pro kalmodulin
CD	označení pro povrchové molekuly leukocytů (z angl. <u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation)

CD4 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup>	označení pro T lymfocyty nesoucí na svém povrchu molekulu CD4 nebo CD8
d	ředění
DABCO	2-merkptoetylamin-1,4-diazabicyklo-2,2,2-oktan
DEAE	diethylaminoethan
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNT	dermonekrotický toxin (z angl. <u>D</u> er <u>m</u> o <u>N</u> ecrotic <u>T</u> oxin)
dpm	rozpady za minutu (z angl. <u>d</u> isintegrations per <u>m</u> inute)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FHA	vláknitý hemaglutinin (z angl. <u>F</u> ilamentous <u>H</u> em <u>A</u> glutinin)
FLAG	epitop obsahující aminokyseliny DYKDDDDK
g	gravitační zrychlení
GDP	guanosindindifosfát
GPI	glykosylfosfatidylozitol
GTP	guanosintrifosfát
HEPES	kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethansulfonová
HPV	lidský papilomavirus
HRP	křenová peroxidáza
IgG	imunoglobulin
IL	interleukin
IPTG	izopropyl β-D-thiogalaktopyranozid
kb	kilobáze
k <sub>cat</sub>	katalytická konstanta
K <sub>d</sub>	disociační konstanta
kDa	kiloDalton
LAU	libovolná lineární jednotka (z angl. <u>L</u> inear <u>A</u> rbitrary <u>U</u> nit)
LB	Luria-Bertani
LCMV	virus myši lymfocytární choriomeningitidy
m	množství navázaného ACT (g/ml)
mAb	monoklonální protilátka
M	molární hmotnost (g/mol)
MHC gp I	MHC glykoproteiny I. třídy (z angl. <u>M</u> ajor <u>H</u> istocopatibility <u>C</u> omplex)
MHC gp II	MHC glykoproteiny II. třídy
n	látkové množství ATP v 50 μl reakčního mixu [μmol]

$N_A$	Avogadrova konstanta
$NAD^+$	nikotinamidadenindinukleotid
ND	nestanoveno (z angl. <u>N</u> ot <u>D</u> etermined)
$N_{ACT}$	počet navázaných molekul ACT na erytrocyt
$N_K$	počet erytrocytů/ml
$OD_{600}$	optická hustota buněčné suspenze při vlnové délce 600 nm
p	hladina významnosti
PC	fosfatidylcholin
pI	izoelektrický bod
PP	pyrofosfát
proACT	neacylovaný ACT
pS	pikosiemens (jednotka vodivosti)
PTX	pertusový toxin (z angl. <u>P</u> ertussis <u>T</u> o <u>X</u> in)
PVDF	polyvinylidenfluorid
RTX	označení skupiny cytotoxinů (z angl. <u>R</u> epeat in <u>T</u> o <u>X</u> in)
SD	standardní odchylka
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsulfátem sodným
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SM	sřingomyelin
STR	streptavidin
Tcf	tracheální kolonizační faktor (z angl. <u>T</u> racheal <u>c</u> olonization <u>f</u> actor)
TCT	tracheální cytotoxin (z angl. <u>T</u> racheal <u>C</u> yto <u>T</u> oxin)
TEM	transmisní elektronový mikroskop
$T_H$	pomocné T lymfocyty
TNF	faktor nekrotizující nádory (z angl. <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor)
U	jednotka (z angl. <u>U</u> nit)
v/v	objemová procenta – mililitrů ve 100 ml roztoku
w/v	hmotnostní procenta – gramů ve 100 ml roztoku

Dále byly použity jednopísmenné zkratky pro označení jednotlivých nukleotidů a aminokyselin.

# 1. ÚVOD

Adenylátcyklázový toxin (ACT) je nepostradatelným faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis* (Weiss *et al.*, 1984), která způsobuje infekční respirační onemocnění černý kašel. ACT je důležitý v časných fázích bakteriální kolonizace respiračního traktu (Goodwin *et Weiss*, 1990; Khelef *et al.*, 1992), kdy inhibuje baktericidní funkce fagocytů, indukuje apoptózu u makrofágů (Confer *et Eaton*, 1982; Friedman *et al.*, 1987; Khelef *et al.*, 1993; Pearson *et al.*, 1987; Weingart *et Weiss*, 2000) a ovlivňuje maturaci dendritických buněk (Bagley *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2004). ACT rovněž indukuje syntézu prozánětlivého cytokinu IL-6 z řasinkových buněk respiračního epitelu (Bassinat *et al.*, 2004). Současné znalosti o účincích ACT na cílové buňky a jeho roli v patogenezi jsou shrnuty v příloženém přehledném článku (Vojtová *et al.*, 2006a).

Na povrchu buněk imunitního systému se ACT váže na receptorovou molekulu CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001). S nižší účinností je ACT schopen pronikat také do buněk, které nenesou receptorovou molekulu CD11b/CD18, jako jsou např. savčí erythrocyty (Rogel *et Hanski*, 1992). Po vazbě a inzerci do membrány ACT přenáší svou enzymatickou adenylátcyklázovou (AC) doménu přímo přes membránu cílové buňky do cytozolu, kde AC doména po vazbě kalmodulinu katalyzuje neregulovanou tvorbu cAMP. Kromě schopnosti katalyzovat tvorbu cAMP, ACT tvoří póry v plazmatické membráně buněk. Vytvořené póry jsou selektivní pro kationty (Benz *et al.*, 1994a) a podílejí se na zabíjení makrofágů (Basler *et al.*, 2006; Hewlett *et al.*, 2006) a mohou způsobit koloidně-osmotickou lyzi erythrocytů (Bellalou *et al.*, 1990a; Rogel *et al.*, 1991). Řada nepřímých důkazů naznačuje, že za tvorbu pórů jsou zodpovědné oligomery ACT. Existence oligomerů ACT v membráně ale nebyla doposud prokázána. V první části této dizertační práce byla proto testována přítomnost oligomerů ACT v membráně pomocí různých mikroskopických a biochemických metod a studována role oligomerů v hemolytické (kanálotvorné) aktivitě toxinu. Naše výsledky ukázaly, že ACT tvoří v membráně velmi pravděpodobně dimery a že schopnost tvořit oligomery koreluje se specifickou hemolytickou (kanálotvornou) aktivitou toxinu (Vojtová, připravovaná publikace). Dále, z našich výsledků vyplynulo, že hemolytická aktivita ACT je zodpovědná za vznik morfologických změn ovčích erythrocytů a že molekuly ACT se v nacházejí v erythrocytární membráně ve shlucích, jejichž vznik je pravděpodobně daný vazbou ACT do tzv. membránových mikrodomén (viz druhá příložená publikace Vojtová *et al.*, 2006b).

Díky schopnosti toxinu vázat molekulu CD11b/CD18 na povrchu makrofágů a dendritických buněk a přenášet AC doménu do cytozolu, byl ACT úspěšně použit jako nereplikativní vektor pro dopravu cizorodých antigenů do buněk prezentujících antigen. Cizorodé epitopy byly zpracovány a vystaveny na molekulách MHC gp I a indukovaly specifickou imunitní odpověď cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Fayolle *et al.*, 1996; Fayolle *et al.*, 1999; Osička *et al.*, 2000; Saron *et al.*, 1997; Šebo *et al.*, 1995; Šebo *et al.*, 1999). Nebylo ale známo, zda lze ACT využít také pro stimulaci pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů. V druhé části dizertační práce byly proto připraveny toxoidy ACT nesoucích specifický CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop pro otestování výše zmíněné hypotézy. Naše výsledky ukázaly, že ACT lze použít pro stimulaci pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (viz třetí příložená publikace Loucká *et al.*, 2002). V této souvislosti současné výsledky naznačují, že ACT by tak mohl být velmi vhodný nástroj při terapii některých chronických nebo nádorových onemocnění (Macková *et al.*, 2006; Preville *et al.*, 2005; Mascarell *et al.*, 2005), kdy je nezbytné indukovat imunitní odpověď jak cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů tak pomocných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů.

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1. Bakterie *Bordetella pertussis*

*Bordetella pertussis* patří mezi gramnegativní bakterie. Jedná se o striktně lidského patogena, jenž vyvolává dětské infekční respirační onemocnění černý kašel (pertuse). *Bordetella* byla pojmenována podle svého objevitele belgického bakteriologa Julese Bordeta, který ji v roce 1906 společně s Octavem Gengou izoloval z řasinkového epitelu horních cest dýchacích (Bordet *et* Gengou, 1906). Druhé jméno „*pertussis*“ znamená intenzivní kašel.

#### 2.1.1. Patogeneze černého kašle

Černý kašel je akutní, vysoce infekční onemocnění dýchacích cest. Infekce je přenášena kapénkovou cestou a postihuje především kojence, batolata a děti v předškolním věku. Zdrojem nákazy jsou děti i dospělí a inkubační doba onemocnění trvá jeden až tři týdny. Počáteční příznaky onemocnění připomínají běžné nachlazení. V této, tzv. katarální fázi, bakterie adherují na povrch epiteliálních buněk v průdušnici a bronších (Obr. 1), kde se rychle množí a blokují funkci řasinek (Bednář, 1996). V pozdějším stadiu onemocnění, tzv. paroxysmální fázi, se objevují charakteristické záchvaty intenzivního dráždivého kašle, které nemocného (zejména malé děti) velmi vyčerpávají. Konečnou fází onemocnění je stadium rekonvalescence, v němž záchvaty kašle mizí (Bednář, 1996). Průběh onemocnění často zhoršují sekundární bakteriální infekce (Bednář, 1996; Olson, 1975).



Obr. 1: Kolonizace řasinkového epitelu průdušnice bakterií *Bordetella pertussis*. Převzato z [www.textbookofbacteriology.net](http://www.textbookofbacteriology.net).



### 2.1.2. Prevence černého kašle

Do zavedení očkování byl černý kašel jedním z nejvážnějších onemocnění kojenců a malých dětí (Bednář, 1996). V současné době se černý kašel vyskytuje nejvíce u neočkované populace v rozvojových zemích a ročně způsobí okolo 300 000 úmrtí (WHO, 1999). Jako prevence proti černému kašli je prováděno očkování celobuněčnou vakcínou nebo podjednotkovou vakcínou složenou z definovaných bakteriálních komponent, často se jedná o pertusový toxoid kombinovaný s vláknitým hemaglutininem, pertaktinem nebo proteiny fimbrií (Jadhav *et Gairola*, 1999; Kuno-Sakai *et al.*, 2004; Rappuoli *et al.*, 1992; Trollfors *et Taranger*, 1997).

Jedním z důvodů pro vývoj podjednotkové vakcíny byl častý vznik mírných vedlejších účinků (otok, teplota, bolestivost, nevolnost) po podání celobuněčné vakcíny. S podáním celobuněčné vakcíny byl rovněž spojován vznik ojedinělých ale velmi vážných neurologických komplikací (Cowan *et al.*, 1993; Stephenson, 1988). Spojitost mezi podáním celobuněčné vakcíny a vznikem neurologických komplikací nebyla ale doposud jednoznačně prokázána (Gale *et al.*, 1994; Griffin *et al.*, 1990; Cherry, 1990; Moore *et al.*, 2004; Shields *et al.*, 1988). Na základě srovnání očkování provedeného celobuněčnou nebo podjednotkovou vakcínou vyšla najevo skutečnost, že podání podjednotkové vakcíny snižuje výskyt mírných vedlejších účinků (Gustafsson *et al.*, 1996; Matheson *et Goa*, 2000; Olin *et al.*, 1997), a očkování podjednotkovou vakcínou bylo zavedeno v řadě vyspělých zemí. Nicméně, především z finančních důvodů a důvodů snadné přípravy celobuněčné vakcíny, je tato vakcína v řadě zemí stále využívána (Mills, 2001). Celobuněčná vakcína je navíc v porovnání s podjednotkovou vakcínou stále účinnější (Liese *et al.*, 1997; Schmitt *et al.*, 1996; Simondon *et al.*, 1997). Situace v České republice v oblasti očkování proti černému kašli je popsána v kapitole 2.1.2.1.

V posledních letech je, navzdory dobré proočkovanosti kojenců a předškolních dětí, z mnoha zemí hlášena zvýšená incidence infekce *B. pertussis* a to ve dvou věkových skupinách: 1) u dosud neočkovaných novorozenců a kojenců a 2) u adolescentů a dospělých (Crowcroft *et al.*, 2003; von Konig *et al.*, 2002). Je známa skutečnost, že obranyschopnost po vakcinaci proti *B. pertussis* není celoživotní a již po 3 až 5 letech po očkování se snižuje a za 12 let je nedostatečná (Holčíková *et al.*, 1998; von Konig *et al.*, 2002). Adolescenti a dospělí, u kterých infekce probíhá často subklinicky (dlouhotrvající intermitentní kašel) a může zůstat nepoznána, se tak stávají nebezpečným zdrojem nákazy

pro dosud neočkované novorozence a kojence (Holčíková *et al.*, 1998; von König *et al.*, 2002; Vospělová *et Zapletalová*, 2004). U těch má infekce zpravidla těžký až fatální průběh (Vospělová *et Zapletalová*, 2004). Jednou z možností, jak zabránit těmto nákazám, je přeočkování dospělých (Robbins *et al.*, 2005; von König *et al.*, 2002), které už bylo doporučeno např. ve Francii, Německu nebo Kanadě. Další možností, jak zajistit dlouhotrvající imunitu, je připravit účinnější podjednotkovou vakcínu nebo připravit živou oslabenou vakcínu, která by byla podávána intranazálně tak, aby byla napodobena přirozená cesta infekce (Locht *et al.*, 2004).

#### 2.1.2.1. Očkování proti černému kašli v České republice

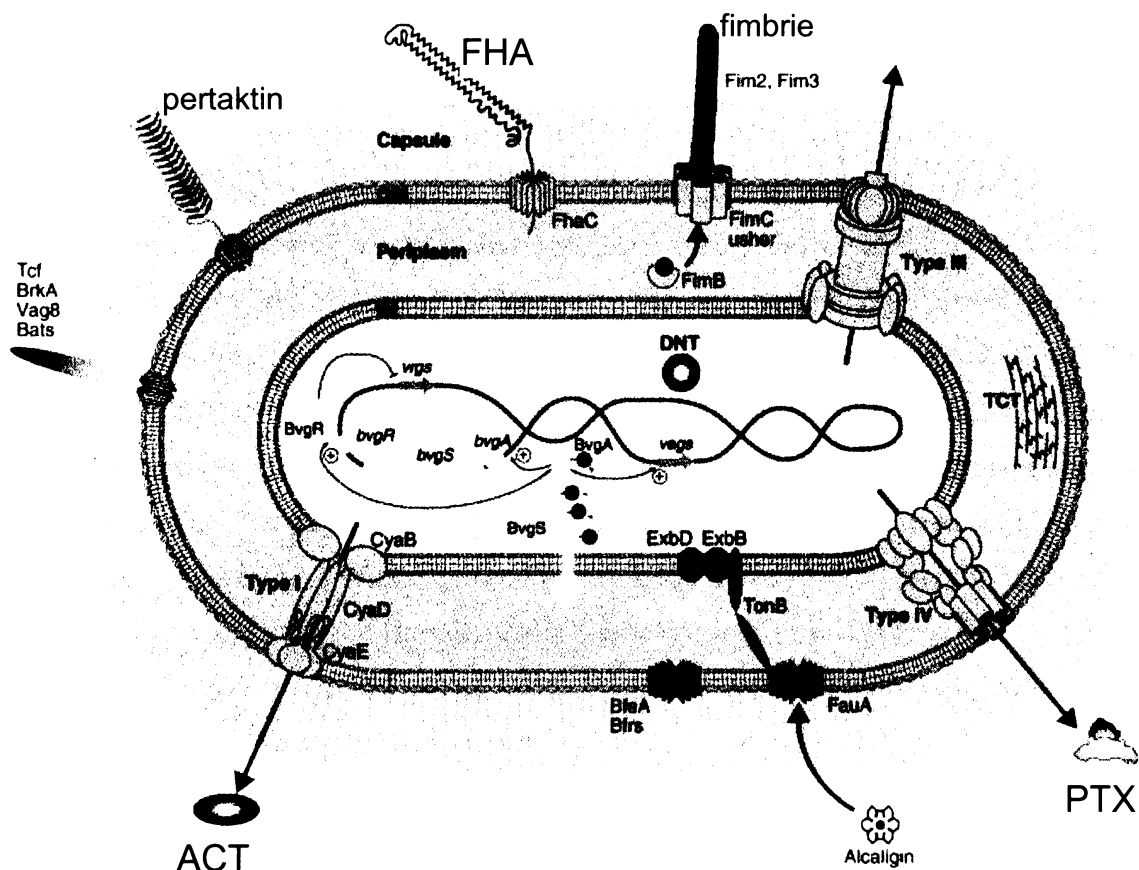
V České republice bylo v roce 1958 zavedeno celoplošné očkování proti černému kašli celobuněčnou vakcínou<sup>1</sup>, což vedlo k výraznému snížení počtu onemocnění. V roce 2001 bylo v ČR zavedeno očkování také podjednotkovou vakcínou, ale to pouze u alergických dětí, dětí s nízkou porodní váhou nebo dětí s neurologickými obtížemi (Škovránková *et al.*, 2004). Zavedení podjednotkové vakcíny rozšířilo počty očkováných dětí proti černému kašli v ČR, protože děti s neurologickými obtížemi (odhadem 3-5 % dětí) nebyly předchozí celobuněčnou vakcínou očkovány. Od 1.1.2003 je možné podjednotkovou vakcínou očkovat i děti, které nemají běžně nárok na tento typ vakcíny, a to za úhradu (Škovránková *et al.*, 2004).

#### 2.1.3. Faktory virulence

Bakterie *Bordetella pertussis* je vybavena řadou faktorů virulence (Obr. 2), které jí umožňují: 1) kolonizovat řasinkový epitel dýchací trubice, 2) uniknout imunitní odpovědi hostitele, 3) způsobit lokální poškození tkáně a 4) vyvolat systémové manifestace (Mattoo *et Cherry*, 2005; Weiss *et Hewlett*, 1986). Faktory virulence, které se nacházejí na povrchu bakterie a jsou zodpovědné za kolonizaci řasinkového epitelu, se nazývají adheziny. Ostatní faktory virulence, které bakterie sekretuje do okolního prostředí a jež se podílejí na vzniku a rozvoji onemocnění, se označují jako toxiny.

---

<sup>1</sup> Vakcína používaná v současné době obsahuje navíc ještě difterický a tetanický toxoid a inaktivovaný *Haemophilus influenzae*.



**Obr. 2:** Faktory virulence bakterie *Bordetella pertussis*. Adheziny: fimbrie, vláknitý hemaglutinin (FHA), partaktin, Tcf, BrkA, Vag8 a Bats jsou vyznačeny modře. Bakteriální toxiny: pertusový toxin (PTX), adenylátcyklázový toxin (ACT) a dermonekrotický toxin (DNT) jsou vyznačeny červeně. Sekreční systémy jsou vyznačeny šedě, systémy určené pro příjem železa zeleně a regulační proteiny (BvgS, BvgA) běžově. (IM) vnitřní membrána, (OM) vnější membrána, (Periplasm) periplazmatický prostor. Upraveno podle Locht *et al.* 2001.

### 2.1.3.1. Adheziny

Do skupiny adhezínů patří především vláknitý hemaglutinin, pertusový toxin, fimbrie a pertaktin. Mezi adheziny byly rovněž zařazeny proteiny BrkA, Tcf, Vag8 a proteiny BatA až BatE, které jsou podobné pertaktinu (Locht *et al.*, 2001). Většina adhezínů je velmi imunogenní, a proto jsou využívány k přípravě podjednotkových vakcín proti černému kašli (viz kapitola 2.1.2.).

**Vláknitý hemaglutinin** je protein o molekulové hmotnosti 220 kDa (Relman *et al.*, 1989), který byl pojmenován podle své vláknité struktury a schopnosti shlukovat různé typy erytrocytů (Arai *et Sato*, 1976). Na rozdíl od ostatních adhezínů může být vláknitý hemaglutinin uvolňován z bakteriálního povrchu do okolního prostředí, což *in vivo*

pravděpodobně usnadňuje kolonizaci a šíření bakterií na nová místa v dýchací trubici (Coutte *et al.*, 2003). Vlákknitý hemagglutinin obsahuje tripeptid Agr-Gly-Asp (tzv. motiv RGD), který je zodpovědný za adhezi na buňky řasinkového respiračního epitelu (Relman *et al.*, 1989; Tuomanen *et al.*, 1985). Váže se ale také na leukocyty (Hazenbos *et al.*, 1994; Ishibashi *et al.*, 1994), na jejichž povrchu rozeznává receptorovou molekulu CD11b/CD18 (Relman *et al.*, 1990). Po vazbě na leukocyty vlákknitý hemagglutinin spouští signalizaci přes komplex integrinu  $\alpha_v\beta_3$  a proteinu CD47, která aktivuje receptorové molekuly CD11b/CD18, a tak ještě zvyšuje jejich afinitu k hemagglutininu (Ishibashi *et al.*, 1994).

**Pertusový toxin, fimbrie a pertaktin** umožňují adhezi bakterie na povrch dýchací sliznice (Leininger *et al.*, 1991; van den Berg *et al.*, 1999) a leukocytů (Hazenbos *et al.*, 1994; Schaeffer *et Weiss*, 2001). Protein **BrkA** je zodpovědný za rezistenci bakterie ke komplementu (Elder *et Harvill*, 2004; Fernetez *et Weiss*, 1994) a **Tcf (tracheální kolonizační faktor)** se podílí na adhezi na epiteliální buňky (Locht *et al.*, 2001). Přesná funkce adhezinů **Vag** a proteinů **Bat** není objasněna (Locht *et al.*, 2001).

#### 2.1.3.2. Toxiny

Do skupiny toxinů produkovaných *B. pertussis* patří: pertusový toxin, tracheální cytotoxin, dermonekrotický toxin a adenylátcyklázový toxin.

**Pertusový toxin** tvoří podjednotka A, jež má enzymatickou aktivitu, a podjednotka B, která je zodpovědná za vazbu na povrch cílových buněk. Podjednotku B tvoří oligomer (pentamer), který rozeznává běžně se vyskytující sacharidové motivy na glykoproteinech (Brennan *et al.*, 1988), a tak umožňuje navázání na povrch různých savčích buněk (el Baya *et al.*, 1999; Kaslow *et Burns*, 1992). Podjednotka B je rovněž nutná k přenesení enzymatické podjednotky A do cytozolu (Kaslow *et Burns*, 1992), ke kterému dochází po endocytóze navázaného toxinu a jeho transportu do Golgiho aparátu (el Baya *et al.*, 1997). V cytozolu podjednotka A katalyzuje ADP-ribozylaci  $\alpha$  podjednotky  $G_i$  proteinu, která vede k trvalé aktivaci endogenní adenylátcyklázy. Výsledkem je narušení buněčné signalizace, které se *in vivo* projevuje celou řadou efektů. U monocytů a makrofágů pertusový toxin inhibuje fagocytózu (Schaeffer *et Weiss*, 2001), chemotaxi a migraci do místa infekce (Meade *et al.*, 1984). Pertusový toxin rovněž zvyšuje permeabilitu cévních stěn, citlivost na histamin a způsobuje lymfocytózu a hypoglykémii (Mattoo *et Cherry*, 2005).

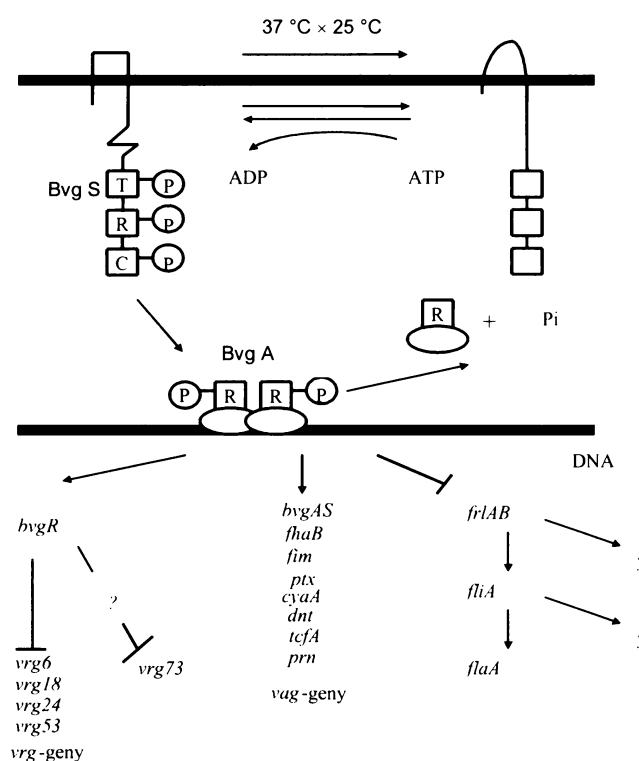
**Tracheální cytotoxin** je část peptidoglykanu o molekulové hmotnosti 1,8 kDa, kterou bordetely uvolňují do okolního prostředí během růstu (Rosenthal *et al.*, 1987). Tracheální cytotoxin společně s lipopolysacharidem z bakteriální stěny stimuluje sekreci oxidu dusnatého (NO) ze sekrečních buněk, a tak způsobuje poškození řasinkového epitelu horních cest dýchacích (Flak *et Goldman*, 1999).

**Dermonekrotický toxin** tvoří jeden polypeptid o molekulové hmotnosti 160 kDa (Kashimoto *et al.*, 1999). Jeho název byl odvozený od schopnosti tvořit po intradermálním vpichu v kůži morčat nebo jiných zvířat nekrotické léze (Horiguchi *et al.*, 1989). Dermonekrotický toxin stimuluje tvorbu aktinových vláken a fokálních spojení (focal adhesions), a tak vyvolává morfologickou změnu buněk. Změny v aktinovém cytoskeletu jsou způsobeny permanentní aktivací GTPázy Rho, kterou dermonekrotický toxin způsobí deaminací nebo polyaminací glutaminu v pozici 63 v molekule GTPázy (Horiguchi *et al.*, 1997; Masuda *et al.*, 2000). Kromě GTPázy Rho dermonekrotický toxin modifikuje rovněž GTPázy Rac a Cdc42, které jsou spojovány s tvorbou lamelopodií a filopodií (Masuda *et al.*, 2002). Za modifikaci GTPáz je zodpovědná C-koncová enzymatická část toxinu, zatímco N-koncová část zprostředkovává vazbu na zatím neznámý proteinový receptor (Matsuzawa *et al.*, 2002). Po vazbě na receptor dochází k endocytóze a následně k proteolytickému štěpení v časném endozómu, které vede k aktivaci a uvolnění dermonekrotického toxinu do cytozolu (Matsuzawa *et al.*, 2004).

**Adenylátcyklázový toxin (ACT)** je RTX (Repat in Toxin) protein o velikosti 177 kDa, který se primárně váže na buňky (např. makrofágy, neutrofilů nebo dendritické buňky) nesoucí na svém povrchu receptorovou molekulu CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001). ACT zvyšuje hladinu cAMP v cytozolu, a tak inhibuje chemotaxi, oxidační vzplanutí a fagocytózu u neutrofilů a makrofágů (Confer *et Eaton*, 1982; Friedman *et al.*, 1987; Pearson *et al.*, 1987; Weingart *et al.*, 2000) a způsobuje maturaci dendritických buněk (Bagley *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2004). Kromě tvorby cAMP má ACT rovněž schopnost tvořit kanály v plazmatické membráně buněk, které přispívají k lyzi makrofágů (Basler *et al.*, 2006; Boyd *et al.*, 2005; Hewlett *et al.*, 2006). Další a podrobnější informace o ACT obsahuje kapitola 2.2.2.1.

## 2.1.3.3. Regulace exprese faktorů virulence

Regulace exprese většiny faktorů virulence je u bakterie *B. pertussis* pod kontrolou *bvg* operonu (*bordetella virulence gene*), který obsahuje geny pro proteiny BvgA a BvgS (Arico *et al.*, 1989). Protein BvgA je cytoplazmatický aktivátor transkripce a protein BvgS je transmembránový protein, který funguje jako senzor (Stibitz *et al.*, 1991). Po zvýšení teploty na 37 °C dochází k autofosforylaci proteinu BvgS a k přenosu signálu na protein BvgA (Obr. 3). Fosforylovaný protein BvgA se pak váže na promotory genů kódujících faktory virulence (*vag*, *virulence activated genes*) a spouští jejich transkripci (Boucher *et al.*, 1994). Za nízkých teplot, kdy nedochází k fosforylaci proteinu BvgS a aktivaci genů faktorů virulence, jsou naopak aktivovány geny, které jsou během virulence neaktivní (*vrg*, *virulence repressed genes*). Přesná funkce těchto genů není objasněna (Locht *et al.*, 2001).



**Obr. 3: Model BvgAS regulonu.** BvgS je senzor, který odpovídá na zvýšení teploty na 37 °C autofosforylací své T domény. BvgS poté přenáší fosfátovou skupinu do svých vlastních akceptorových domén R a C a poté do akceptorové domény (R) transkripčního aktivátoru BvgA. BvgA je DNA vazebný protein, který ovlivňuje transkripci řady genů včetně genů kódujících faktory virulence a genů podílejících se na motilitě bakterie. Převzato z Akerley *et al.*, 1996.

## 2.2. Toxiny tvořící póry produkované gramnegativními bakteriemi a jejich interakce s biologickou membránou

Bakteriální toxiny tvořící póry jsou velmi důležité faktory virulence (viz přehledné články Alouf, 2003; Braun *et Focareta*, 1991 a Narayanan *et al.*, 2002). Tyto toxiny, často označované jako hemolyziny nebo cytolyziny, jsou řazeny do skupiny toxinů, které poškozují plazmatickou membránu buněk. Struktura biologické membrány a jejímu v současné době obecně přijímanému modelu je věnována úvodní kapitola 2.2.1. Následující kapitoly jsou zaměřeny na popis jednotlivých skupin toxinů tvořících póry, které produkují gramnegativní bakterie.

Gramnegativní bakterie produkují několik různých skupin toxinů tvořících póry. Mezi významné představitele patří RTX toxiny, mezi než patří adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, dále hemolyziny typu ShlA bakterie *Serratia marcescens*, hemolyziny vibrií, aerolyzin a koliciny. Základní srovnání vybraných zástupců jednotlivých skupin toxinů tvořících póry je uvedené v Tabulce I. (str. 23).

### 2.2.1. Struktura biologické membrány

Nezbytnou součástí každé buňky je cytoplazmatická membrána, která odděluje vnitřní prostředí buňky od okolí, zprostředkovává komunikaci s okolím a umožňuje selektivním způsobem vstup a výstup metabolitů z buňky. Bariérová funkce membrány je založena na existenci lipidové dvojvrstvy, většinu ostatních funkcí obstarávají membránové proteiny.

#### 2.2.1.1. Lipidová dvojvrstva

Cytoplazmatická membrána je tvořena dvojvrstvou složenou z amfifilních lipidů. Mezi hlavní složky lipidů patří fosfolipidy, sfingolipidy a steroidy. Fosfolipidy vznikají esterifikací glycerolu dvěma mastnými kyselinami a kyselinou fosforečnou. Vzniká tak kyselina fosfatidová, na kterou je dále navázána variabilní molekula, jako je např. cholin, serin, etanolamin, inositol nebo glycerol. Naproti tomu sfingolipidy jsou lipidy odvozené od ceramidu, který vzniká esterifikací aminoalkoholu sfingosinu mastnou kyselinou. Od ceramidu je dále odvozován sfingomyelin a glykosylované sfingolipidy: cerebrosidy a

gangliosidy. Nezbytnou složkou membrán jsou také steroidy, což jsou deriváty cyklopentanoperhydrofenanthrenu. Nejdůležitějším steroidem je cholesterol. Díky své hydroxylové skupině má cholesterol slabý amfifilní charakter a jeho cyklická struktura mu zaručuje větší pevnost v membráně než řetězce mastných kyselin u výše popsaných lipidů.

Lipidová dvojvrstva je asymetrická. Ve vnější vrstvě převládají sfingolipidy a fosfatidylcholin a ve vnitřní vrstvě pak fosfatidyletanolamin a negativně nabitý fosfatidylserin. Sfingolipidy mohou sloužit jako receptory pro bakteriální toxiny, viz přehledný článek (Hanada, 2005).

#### 2.2.1.1.1. Uspořádání lipidů v membráně

Uspořádání lipidů v membráně je z velké části určené tzv. fází lipidové dvojvrstvy. Fáze lipidové dvojvrstvy představuje stav membrány charakterizovaný určitým stupněm nahroučení, uspořádání a pohyblivosti daných lipidů. Existují dva mezní případy lipidové fáze: 1) fáze gelu (quasi-solid gel phase) a 2) fáze tekutého krystalu (liquid-crystalline nebo též liquid-disordered phase). Ve fázi tekutého krystalu mají lipidy velkou rotační a laterální pohyblivost, ve fázi gelu jsou lipidy naopak naskládány hustě vedle sebe (densely packed) a jejich pohyblivost je výrazně nižší.

Pokud je v membráně přítomen cholesterol, lipidová dvojvrstva se nachází ve stavu třetí, tzv. uspořádané fáze (liquid order phase). Uspořádaná fáze představuje přechodnou fázi mezi fází gelu a fází tekutého krystalu a předpokládá se o ní, že odpovídá uspořádání membránových mikrodomén (raftů) v membráně (viz kapitola 2.2.1.3.2.). Přítomnost cholesterolu v membráně na jedné straně zvyšuje uspořádanost mastných kyselin lipidů, ale na druhé straně zabraňuje jejich krystalizaci, a tak brání tvorbě gelové fáze. Kromě cholesterolu ovlivňuje fázi lipidové dvojvrstvy také teplota a chemická povaha řetězců mastných kyselin u fosfolipidů a sfingolipidů. Přítomnost nenasycených mastných kyselin u fosfolipidů snižuje uspořádanost lipidů. Naproti tomu základní kostra sfingolipidů, která obsahuje nasycené řetězce mastných kyselin, zvyšuje uspořádanost lipidů.

#### 2.2.1.2. Membránové proteiny

Membránové proteiny lze rozdělit na periferní a integrální. Periferní proteiny jsou vázány na povrchu membrány, zatímco integrální proteiny prostupují jejím hydrofóbním



jádrem. Periferní proteiny mohou být k membráně vázány pomocí slabých interakcí nebo pomocí kovalentní lipidové modifikace, např. pomocí glykosylfosfatidylozitolové (GPI) kotvy nebo acylace, která se vyskytuje také u některých transmembránových proteinů.

Integrální proteiny se podle způsobu orientace a uspořádání polypeptidového řetězce v membráně dělí do čtyř skupin (Singer *et al.*, 1987). Přibližně dvě třetiny integrálních proteinů patří do první skupiny označované jako typ I. Jejich N-konec je orientován extracelulárně a membránou prochází jeden  $\alpha$ -helix. Pro proteiny druhé skupiny (typ II) je naopak charakteristický extracelulární C-konec a krátká intracelulární doména. Proteiny třetí skupiny (typ III) procházejí plazmatickou membránou vícekrát, jako např. tetraspaniny (TM4), které mají čtyři transmembránové helixy. Konečně proteiny čtvrté skupiny (typ IV) tvoří transportní kanály v membráně, které jsou složené z několika podjednotek.

### 2.2.1.3. Modely biologické membrány

Pro biologickou membránu bylo navrženo několik modelů. Za revoluční lze považovat model tekuté mozaiky, který poprvé představil membránu jako dynamický útvar, a dále model membránových mikrodomén, který ukázal na specifické shlukování určitých lipidů a proteinů do mikrodomén (tzv. raftů).

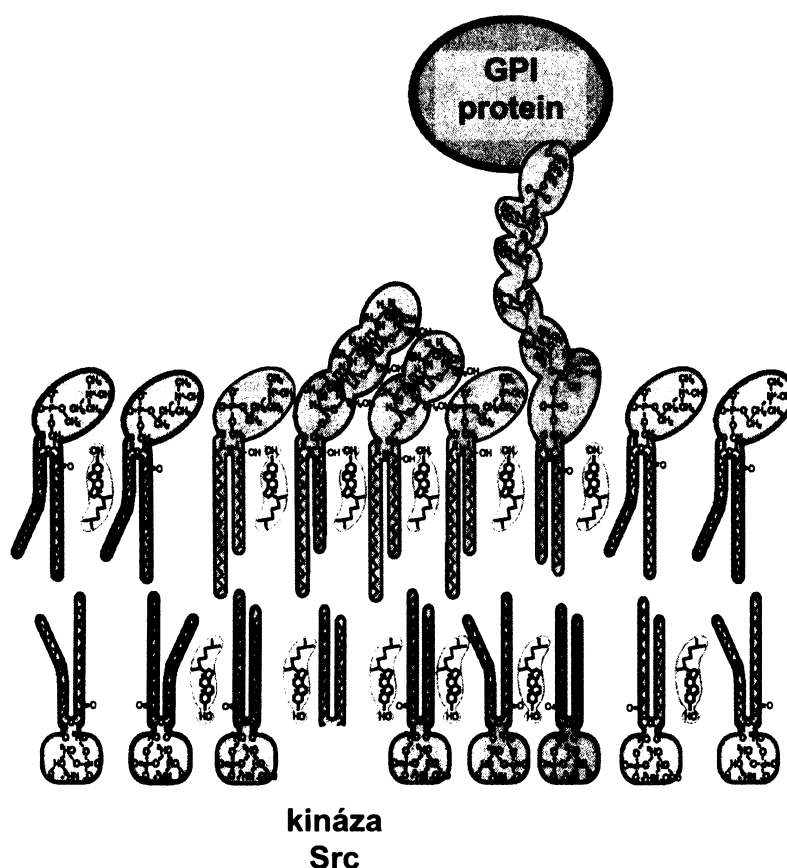
#### 2.2.1.3.1. Model tekuté mozaiky

Model tekuté mozaiky byl navržen Jonathanem Singerem a Garthem Nicolsonem v roce 1972 (Singer *et Nicolson*, 1972). Představuje biologickou membránu jako dvojvrstvu lipidových molekul, do které jsou zanořeny různé membránové proteiny. Lipidická dvojvrstva je tekutá a jednotlivé lipidy a některé proteiny jsou schopny laterální difúze.

#### 2.2.1.3.2. Membránové mikrodomény (rafty)

V současné době je velmi diskutována nová koncepce uspořádání biologické membrány, která počítá s přítomností tzv. membránových mikrodomén neboli membránových raftů (Simons *et Ikonen*, 1997). Membránové mikrodomény vznikají díky dynamickému shlukování sfingolipidů a cholesterolu v membráně a představují „ostrůvky“

(Obr. 4), které se v lipidické dvojvrstvě volně pohybují. Membránové mikrodomény jsou obohaceny o určité typy proteinů (např. GPI proteiny) a s jejich existencí je spojována řada důležitých buněčných procesů a funkcí, jako je např. přenos signálu (Golub *et al.*, 2004; Horejsi, 2003; Horejsi *et al.*, 1999; Horejsi *et al.*, 2004), transport proteinů (Schuck *et al.*, 2004; van Meer *et al.*, 2004) či endocytóza (Parton *et al.*, 2003).



**Obr. 4: Model membránových mikrodomén (raftů) se dvěma asociovanými proteiny.** GPI-protein je vázaný z vnější strany membrány a kináza skupiny Src je vázána pomocí dvou mastných kyselin z vnitřní strany membrány. Červeně jsou vyznačeny lipidy (glykosfingolipidy a sfingomyelin) v tzv. uspořádané fázi (liquid-ordered phase), jež odpovídá membránovým mikrodoménám, a modře lipidy v neuspořádané fázi (liquid-disorderd phase). Cholesterol, který je přednostně přítomný v membránových mikrodoménách, je vyznačený oranžově. Upraveno podle Simons *et al.* a Ikonen, 2000.

**Tabulka 1: Srovnání zástupců různých skupin toxinů tvořících póry, které produkují gramnegativní bakterie.**

NÁZEV	PRODUKUJÍCÍ ORGANIZMUS	TYP KANÁLU	MOLEKULOVÁ HMOTNOST, pI	STECHIOMETRIE KANÁLU	POZNÁMKA	CITACE
<b>RTX toxiny</b> <b>ACT</b> (adenylácyklázový toxin)	<i>Bordetella pertussis</i>	nestabilní póry (>0.6 nm v průměru)	177 kDa pI = 4,59	pravděpodobně <b>oligomer</b>	pro biologickou aktivitu je nezbytná acylace toxinu mastnou kyselinou a přítomnost Ca <sup>2+</sup>	Benz <i>et al.</i> , 1994 Iwaki <i>et al.</i> , 1995 Bejerano <i>et al.</i> , 1999
<b>Hemolyziny typu Sh1A</b>	<i>Serratia marcescens</i>	dynamický hydrofilní kanál - různý průměr (1-3 nm) v závislosti na fluiditě membrány	165 kDa pI = 8,21	<b>monomer</b> pravděpodobně tvoří malé kanály a <b>oligomer</b> větší kanály (chybí ale přímý důkaz existence oligomerů)	fosfatidyletanolamin funguje jako kofaktor	Schonherr <i>et al.</i> , 1994 Hertle, 2000 Hertle, 2002 Walker <i>et al.</i> , 2004
<b>Cytolyziny</b> <i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	stabilní kanál o průměru 1,5 nm	65 kDa (monomer) pI = 5,72	<b>heptamer</b>	-	Zitzer <i>et al.</i> , 2001 Harris <i>et al.</i> , 2002 Olson <i>et Gouaux</i> , 2003
<b>Aerolyzin</b>	<i>Aeromonas sp.</i>	stabilní kanál o průměru 2 nm	52 kDa (monomer) pI = 5,49	<b>heptamer</b>	-	Parker <i>et al.</i> , 1994 Abrami <i>et Goot</i> , 1999 Tsitirin <i>et al.</i> , 2002
<b>Koliciny (kolicin A)</b>	<i>Escherichia coli</i>	napětově řízený kanál	63 kDa pI = 7,78	pravděpodobně <b>monomer</b> (do tvorby kanálu jsou pravděpodobně zapojené lipidy)	otevření kanálu je spojené s přenosem velké části kanálové domény přes membránu	Slatin <i>et al.</i> , 1994 Slatin <i>et al.</i> , 2002 Sobko <i>et al.</i> , 2004

## 2.2.2. RTX toxiny

RTX toxiny jsou důležité faktory virulence rozšířené u lidských i zvířecích bakteriálních patogenů. Označení RTX (Repeats in ToXin) vyplývá ze zjištění, že všechny toxiny této skupiny obsahují v C-koncové části proteinu opakující se nonapeptidové sekvence bohaté na glycin a asparagovou kyselinu. Do skupiny RTX toxinů patří např.  $\alpha$ -hemolyzin *Escherichia coli*, leukotoxiny *Pasteurella haemolytica*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a *Fusobacterium necrophorum* (Narayanan *et al.*, 2002), tři různé toxiny bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*, hemolyziny bakterií *Proteus vulgaris*, *Morganella morganii*, *Moraxella bovis*, *Enterobacter cloacae* a *Actinobacillus suis* a adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* (Alouf, 2003).

V cytoplazmatické membráně cílových buněk tvoří RTX toxiny póry, které jsou selektivně propustné pro kationty (Benz *et al.*, 1994a; Benz *et al.*, 1989; Menestrina *et al.*, 1987; Ropele *et Menestrina*, 1989). V následujících kapitolách je jako příklad RTX toxinu detailněji popsán adenylátcyklázový toxin (ACT) bakterie *Bordetella pertussis*, který je předmětem studia této dizertační práce. Vlastnosti jeho kanálu jsou porovnány s  $\alpha$ -hemolyzinem *Escherichia coli*, jež patří mezi nejlépe prostudované RTX toxiny.

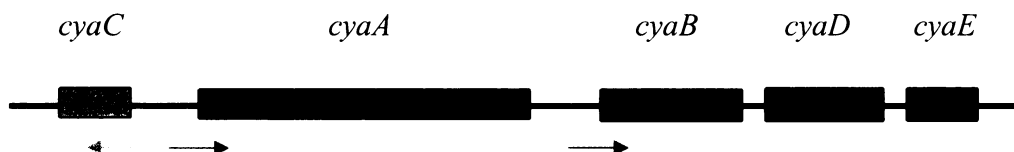
### 2.2.2.1. Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*

Adenylátcyklázový toxin (ACT) produkovaný bakterií *Bordetella pertussis* je neobvyklý RTX toxin. Od ostatních RTX toxinů se liší přítomností enzymatické adenylátcyklázové domény, která je kovalentně připojena k N-konci RTX podjednotky, jež je společná pro všechny RTX toxiny.

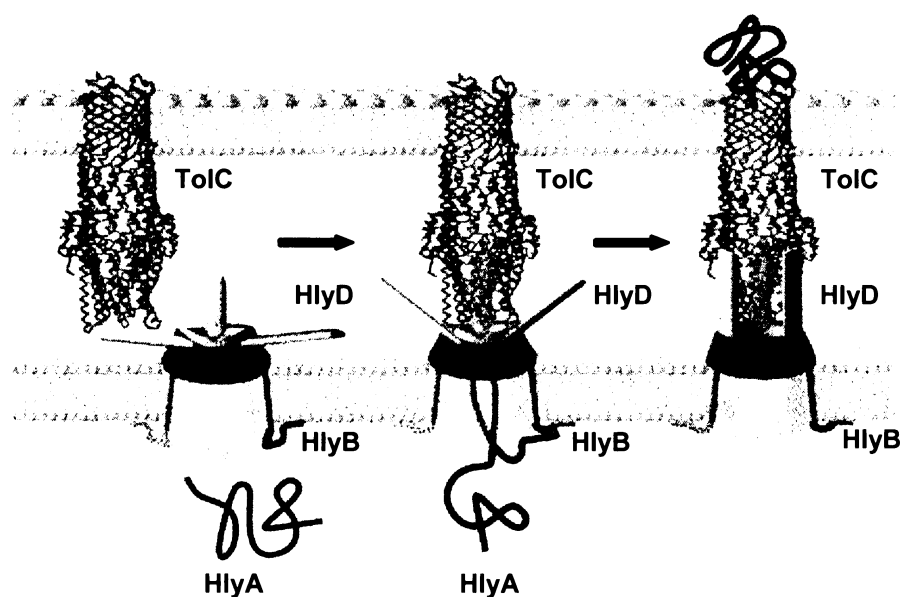
#### 2.2.2.1.1. Syntéza, sekrece a struktura ACT

Adenylátcyklázový toxin je exprimován z lokusu *cyaCABDE* (Mock *et Ullmann*, 1993; Obr. 5), který je pod kontrolou dvousložkového transdukčního systému BvgA/S (viz kapitola 2.1.3.3.). Gen *cyaA* kóduje vlastní protoxin (proACT), který je aktivován navázáním mastné kyseliny, které zajišťuje acyltransferáza CyaC, jež je produktem genu *cyaC* (Barry *et al.*, 1991). Produkty genů *cyaBDE* proteiny CyaB, CyaD a CyaE jsou nezbytné pro sekreci ACT a pravděpodobně tvoří analogický transportní systém typu I

(Obr. 6), jenž byl popsán u  $\alpha$ -hemolyzinu *E. coli* (Koronakis *et al.*, 2001; Koronakis *et al.*, 2004). Po sekreci ACT dochází jednak k jeho uvolnění do okolního prostředí jako v případě ostatních RTX toxinů, ale také k jeho navázání na povrch bordetely (Hewlett *et al.*, 1976), a to pravděpodobně v důsledku jeho interakce s vláknitým hemaglutininem (Zaretzky *et al.*, 2002). Navázaný ACT nemá schopnost pronikat do cílových buněk (makrofágů) (Gray *et al.*, 2004), ale pravděpodobně funguje jako adhezín (Edwards *et al.*, 2005).

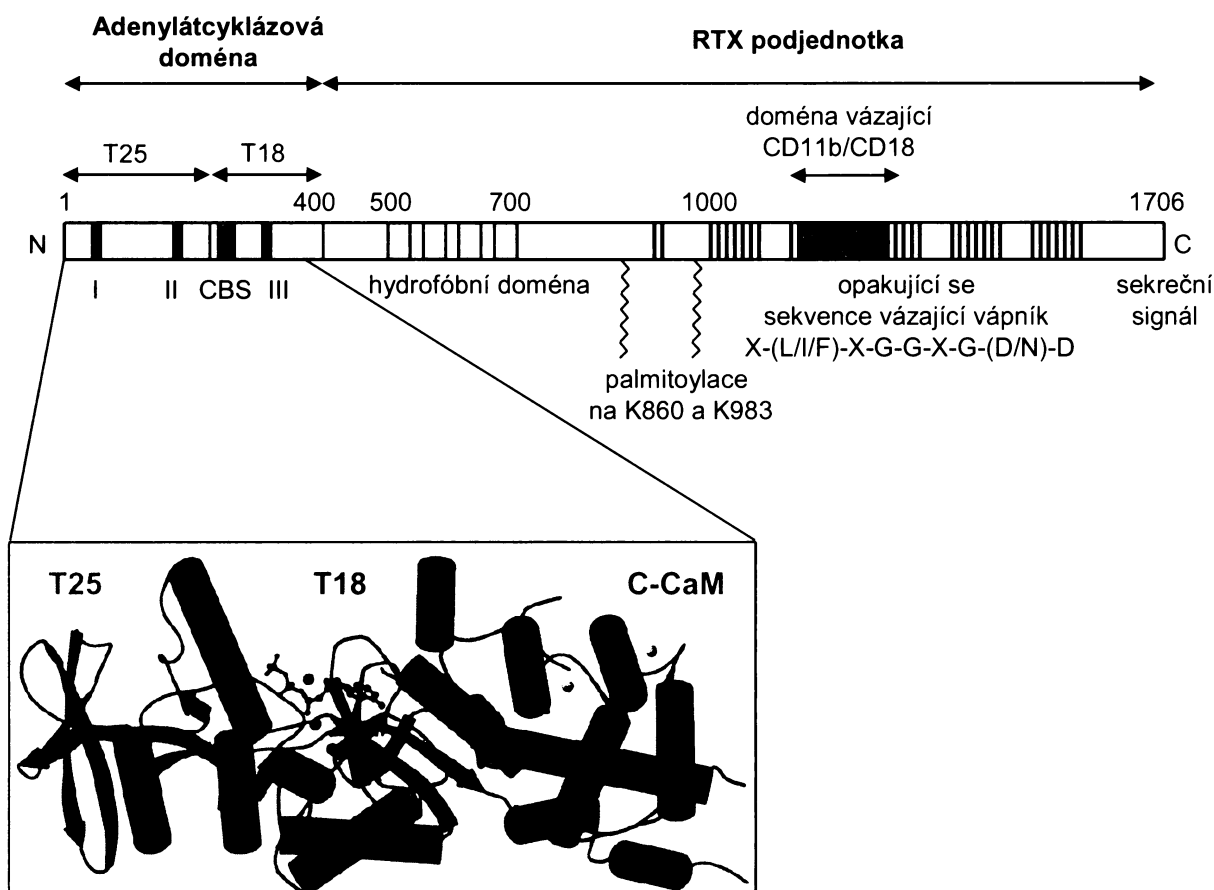


**Obr. 5: Schématické znázornění lokusu *cyaCABDE*.** Směr transkripce jednotlivých genů je označený šipkami. Gen *cyaA* kóduje protoxin ACT (proACT). Produkty genů *cyaBDE* jsou nezbytné pro sekreci ACT (Glaser *et al.*, 1988b) a gen *cyaC* kóduje acyltransferázu, jež aktivuje proACT. Geny *cyaABDE* jsou přepisovány ze společného promotoru umístěného před genem *cyaA*. Geny *cyaBDE* jsou také přepisovány z konstitutivního promotoru, který leží mezi geny *cyaA* a *cyaB* (Laoide *et al.*, 1990). Gen *cyaC* je přepisován v opačném směru z vlastního promotoru (Barry *et al.*, 1991).



**Obr. 6: Model mechanismu sekrece  $\alpha$ -hemolyzinu (HlyA) *E. coli* pomocí HlyBD/TolC aparátu.** Kanálotvorný protein TolC je zanořený ve vnější membráně a v klidovém stavu neinteraguje s proteiny HlyD a HlyB, jež tvoří stabilní komplex ve vnitřní membráně. Navázání sekretovaného proteinu HlyA pomocí HlyB indukuje konformační změny v periplazmatické doméně HlyD, a tak asociaci s kanálotvorným proteinem TolC. Tímto způsobem dojde k vytvoření trans-periplazmatického kanálu, který umožní vstup HlyA. Po ukončení procesu sekrece se proteiny HlyBD/TolC vrací do odděleného klidového stavu. Upraveno podle Koronakis *et al.*, 2001.

Adenylátcyklázový toxin se skládá ze 1706 aminokyselinových zbytků a jeho molekulová hmotnost odpovídá 177 kDa. Skládá se ze dvou strukturálně nezávislých částí: N-koncové adenylátcyklázové domény a C-koncové RTX podjednotky (Obr. 7).



**Obr. 7: Schématické znázornění adenylátcyklázového toxinu (ACT) bakterie *Bordetella pertussis*.** Adenylátcyklázový toxin obsahuje na svém N-konci adenylátcyklázovou (AC) doménu, která po vazbě kalmodulinu katalyzuje tvorbu cAMP. AC doména se skládá ze dvou subdomén: T25 a T18. Zkratka CBS označuje místo zodpovědné za vazbu kalmodulinu a černě vyznačené úseky I, II a III oblasti, jež se podílejí na vazbě ATP. Ve zvětšeném obrázku AC domény je ukázána její trojrozměrná struktura, kterou se podařilo v nedávné době vykrytalizovat v komplexu s C-koncovou částí kalmodulinu (C-CaM) a antivirotikem adenovir difosfátem, jež zastoupilo vazbu ATP (Guo *et al.*, 2005).

Zbývající část toxinu tvoří RTX podjednotka, která zprostředkovává vazbu na povrch cílových buněk, translokaci AC domény do cytozolu a je zodpovědná za tvorbu pórů v membráně. RTX podjednotka obsahuje hydrofóbní doménu, acylační doménu, v rámci které je aminokyselina lyzín v pozici 983 (K983) a 860 (K860) posttranslačně modifikována navázáním mastné kyseliny (Hackett *et al.*, 1994), oblast opakujících se sekvencí vázajících vápník a C-koncový sekreční signál. V hydrofóbní doméně bylo předpokládáno několik hydrofóbních a amfifilních  $\alpha$ -helixů (Osičková *et al.*, 1999) a v oblasti opakujících se sekvencí byla identifikována doména zodpovědná za vazbu na receptorovou molekulu CD11b/CD18 (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003). Upraveno podle Vojtová *et al.*, 2006a.

**Adenylátcyklázová (AC) doména** má enzymatickou aktivitu a po přenesení do cytozolu a vazbě kalmodulinu katalyzuje neregulovanou syntézu cAMP (Wolff *et al.*, 1980). Obsahuje dvě subdomény: T25 a T18, které lze získat *in vitro* limitovanou proteolýzou trypsinem (Ladant, 1988). Subdoména T25 váže ATP a subdoména T18 obsahuje vazebné místo pro kalmodulin, který aktivuje přeměnu ATP na cAMP. Zatímco izolované subdomény T25 a T28 jsou neaktivní, s kalmodulinem tvoří aktivní komplex. Skutečnost, že subdomény T25 a T28 mohou funkčně komplementovat, byla využita při konstrukci bakteriálního dvojhybridního systému, který umožňuje hledat funkční interakce mezi dvěma proteiny (Dautin *et al.*, 2002; Karimova *et al.*, 2000). V nedávné době se podařilo vykristalizovat AC doménu v komplexu s C-koncovým fragmentem kalmodulinu (Guo *et al.*, 2005; Obr. 7). Guo a kolegové ukázali, že vazbu s kalmodulinem zprostředkovávají čtyři oddělené oblasti AC domény a za hlavní interakci s hydrofóbní kapsou (hydrophobic pocket) v kalmodulinu je zodpovědný tryptofan v pozici 242 v AC doméně (Guo *et al.*, 2005).

**RTX podjednotka** obsahuje všechny oblasti typické pro RTX toxiny a je zodpovědná za navázání na povrch cílových buněk, tvorbu pórů v membráně (hemolytická aktivita) a zprostředkovává translokaci adenylátcyklázové domény do cytozolu (tzv. invazivní aktivita). Na N-konci RTX podjednotky je hydrofóbní doména, v rámci které byla předpovězena existence několika hydrofóbních a amfifilních transmembránových  $\alpha$ -helixů (Osičková *et al.*, 1999), jež pravděpodobně tvoří transmembránový pór v membráně cílových buněk. Za hydrofóbní doménou se nachází místo, kde dochází k posttranslační modifikaci mastnou kyselinou, jejíž přítomnost je nezbytná pro účinnou vazbu na buňky (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003) a hemolytickou a invazivní aktivitu toxinu (Bellalou *et al.*, 1990b). Za oblastí posttranslační modifikace mastnou kyselinou se nachází oblast opakujících se nonapeptidových sekvencí bohatých na glycin a kyselinu asparagovou (L/I/F-X-G-G-G-X-(N/D)-D-X). V rámci RTX toxinů obsahuje adenylátcyklázový toxin největší počet (45) repetitivních sekvencí (Glaser *et al.*, 1988). Pravděpodobně každá z těchto sekvencí váže s nízkou afinitou  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_D=0,5-0,8$  mM), který indukuje konformační změnu toxinu, jež je nezbytná pro biologickou aktivitu toxinu (Hewlett *et al.*, 1991; Rose *et al.*, 1995). Kromě míst s nízkou afinitou k  $\text{Ca}^{2+}$  byla u ACT předpovězena existence několika míst s vyšší afinitou pro  $\text{Ca}^{2+}$ , jejichž obsazení je dostatečné pro zachování hemolytické aktivity, ale nedostatečné pro zachování invazivní aktivity (Rogel *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1995). Oblast repetitivních sekvencí obsahuje také vazebnou doménu pro receptorovou molekulu CD11b/CD18 (El-Azami-El-Idrissi *et*

*al.*, 2003), která se nachází na povrchu buněk myeloidní linie, jako jsou např. makrofágy, neutrofilny a dendritické buňky. Na C-konci polypeptidu se nachází sekreční signál, který je rozpoznáván specifickým transportním systémem typu I a během sekrece toxinu není odštěpen (Šebo *et Ladant*, 1993).

#### 2.2.2.1.2. Model interakce ACT s membránou

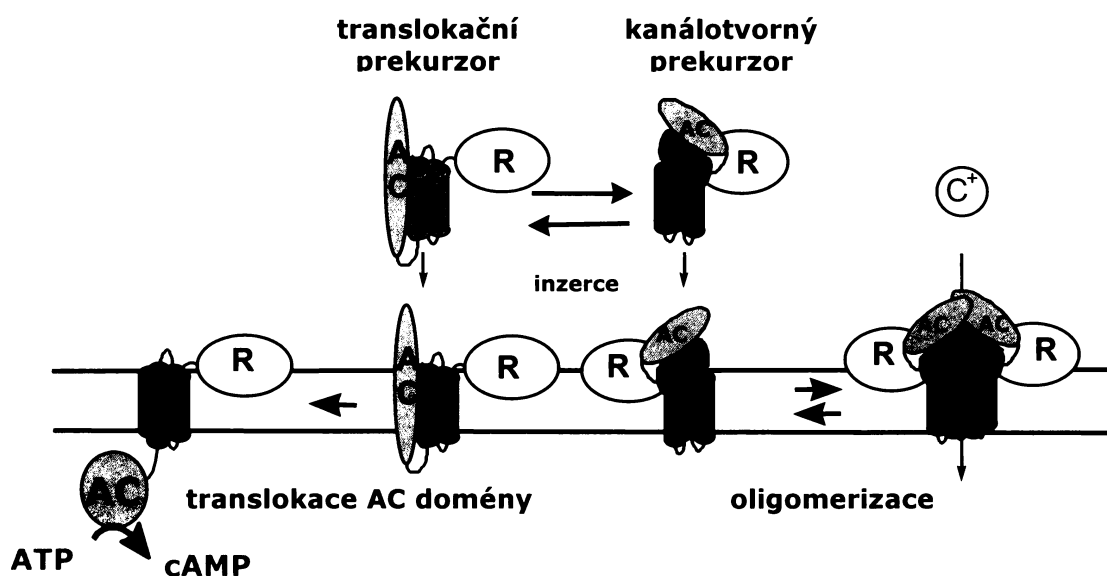
Adenylátcyklázový toxin má dvě aktivity: invazivní adenylátcyklázovou aktivitu a hemolytickou (kanálotvornou) aktivitu. Invazivní adenylátcyklázová aktivita toxinu spočívá v translokaci adenylátcyklázové (AC) domény pravděpodobně přímo přes plazmatickou membránu cílové buňky do cytozolu (Bellalou *et al.*, 1990b; Gordon *et al.*, 1989; Rogel *et Hanski*, 1992), kde po vazbě kalmodulinu spouští AC doména neregulovanou přeměnu ATP na cAMP (Wolff *et al.*, 1980). Naproti tomu za hemolytickou aktivitu jsou zodpovědné póry (kanály), které tvoří ACT v membráně cílových buněk.

Zatímco invazivní aktivita ACT, respektive tvorba cAMP, se projeví téměř okamžitě po přidání toxinu k buňkám (erytrocytům), hemolytická aktivita se projeví po mnohem delší době (40-80 minut) (Rogel *et al.*, 1991). Dále, řada výsledků ukazuje, že invazivní a hemolytickou aktivitu lze oddělit a nezávisle na sobě manipulovat změnou fyzikálních podmínek. Invazivní aktivita toxinu je inhibována např. za nízké teploty (Rogel *et Hanski*, 1992) nebo v případě omezené vazby  $\text{Ca}^{2+}$  na molekulu toxinu (Rose *et al.*, 1995), za stejných podmínek ale dochází k lyzi erytrocytů. Naproti tomu ke snížení hemolytické aktivity toxinu dochází po acylaci rekombinatního ACT nenasycenými mastnými kyselinami (C16:1), zatímco jeho invazivní aktivita zůstává zachována (Basar *et al.*, 1999; Hackett *et al.*, 1995; Havlicek *et al.*, 2001). Dohromady tyto výsledky naznačují, že obě aktivity jsou oddělené a vzájemně nezávislé. Tento závěr podporuje také skutečnost, že translokace AC domény v závislosti na koncentraci toxinu vykazuje lineární závislost (Betsou *et al.*, 1993; Rogel *et al.*, 1991) a jedná se tedy pravděpodobně o mechanismus zprostředkovaný jednotlivými molekulami toxinu (Mock *et Ullmann*, 1993), zatímco hemolytická aktivita je vysoce kooperativní, sigmoidní funkcí koncentrace toxinu (Betsou *et al.*, 1993; Szabo *et al.*, 1994), což naznačuje tvorbu oligomerů.

I když jsou invazivní a hemolytická aktivita velmi pravděpodobně dvě vzájemně nezávislé aktivity ACT, může inhibice jedné aktivity posílit aktivitu druhou. V případě inhibice nebo snížení invazivní aktivity, např. pomocí kalmodulinu, protilátky proti AC



doméně nebo díky bodové mutaci v hydrofóbní doméně (ACTE509K; ACT-E516K a ACTE509K+E516K) bylo pozorováno výrazné zvýšení hemolytické aktivity toxinu (Gray *et al.*, 2001; Osičková *et al.*, 1999; Rogel *et al.*, 1991). Tyto výsledky naznačují, že inhibice translokace AC domény vede k takové konformaci toxinu, jež podporuje tvorbu kanálů, a tak zvyšuje hemolytickou aktivitu toxinu. Tyto závěry společně s výsledky studia mutantních forem ACT s ovlivněnou schopností translokovat AC doménu (invazivní aktivita) anebo tvořit kanály (hemolytická aktivita) vedly k návržení modelu, který předpokládá existenci tzv. translokačního prekursoru ACT a kanálotvorného prekursoru ACT (Obr. 8). Po inzerci translokačního prekursoru do membrány dochází k translokaci AC domény do cytozolu, zatímco po inzerci kanálotvorného prekursoru dochází pravděpodobně nejdříve k úniku  $K^+$  z buňky, a pak k oligomerizaci několika molekul toxinu a tvorbě iontových kanálů (Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999). Předpokládá se, že translokační a kanálotvorný prekursor jsou ve vzájemné rovnováze, ale mutace v molekule nebo nějaký vnější faktor, jako je např. teplota nebo snížená koncentrace vápenatých iontů, může posunout tuto rovnováhu ve prospěch tvorby kanálového prekursoru (Osičková *et al.*, 1999).



**Obr. 8: Model interakce ACT s membránou.** Předpokládá se, že existují dva různé prekursory ACT: tzv. translokační prekursor a kanálotvorný prekursor. Po inzerci translokačního prekursoru do membrány dochází k translokaci AC domény do cytozolu (levá část obrázku). Zatímco po zanoření kanálotvorného prekursoru do membrány dochází k oligomerizaci a tvorbě kanálů, jež jsou selektivní pro kationty (pravá část obrázku). (AC) adenylátcyklázová doména, (R) opakující se sekvence, ( $C^+$ ) kationty. Upraveno podle Osičková *et al.*, 1999.

### 2.2.2.1.3. Mechanismus tvorby pórů u ACT

ACT tvoří v cytoplazmatické membráně póry, které mohou způsobit koloidně-osmotickou lyzi ovčích, králičích nebo myších erytrocytů (Bellalou *et al.*, 1990b; Ehrmann *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1991). V porovnání s  $\alpha$ -hemolyzinem *E. coli*, který patří mezi nejlépe prostudované RTX toxiny, je hemolytická aktivita ACT mnohem nižší (Ehrmann *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1991). Důvodem pro nižší hemolytickou aktivitu je skutečnost, že ACT tvoří v membráně erytrocytů póry, jež mají 0,6-0,8 nm v průměru (Ehrmann *et al.*, 1991), zatímco  $\alpha$ -hemolyzin *E. coli* tvoří póry, jejichž velikost byla odhadnuta na 2-3 nm v průměru (Bhakdi *et al.*, 1986).

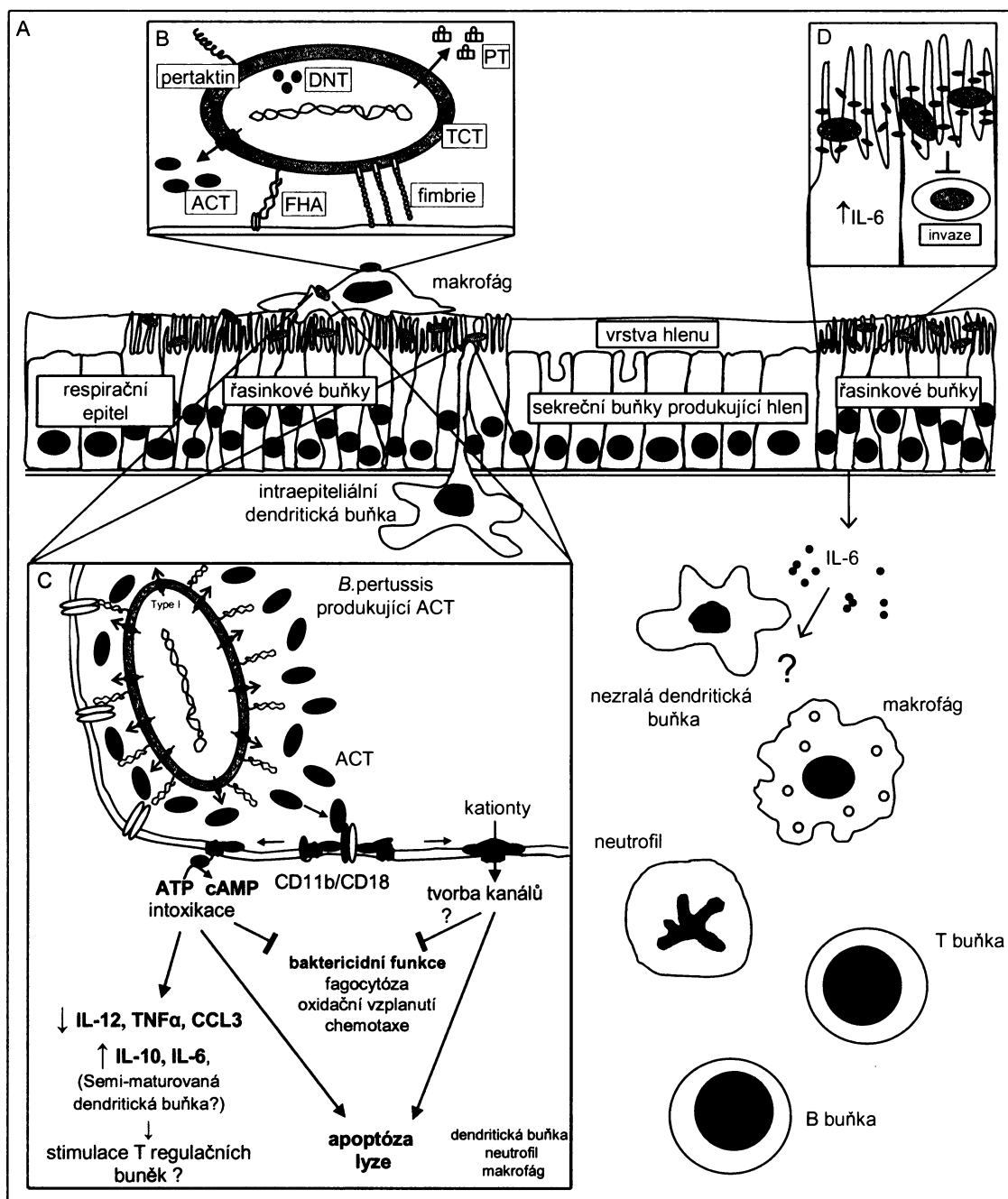
Měření vlastností pórů ACT v uměle připravených lipidových membránách s membránovým potenciálem nastaveným na -50 mV ukázala, že ACT tvoří v membráně kanály, které jsou selektivní pro kationty, a to jak pro vápenaté ionty, tak pro monovalentní ionty (např.  $K^+$ ) (Benz *et al.*, 1994a; Szabo *et al.*, 1994). Vytvořené kanály byly otevřené po velmi krátkou dobu (cca 2s) a měly malý průměr (< 0,8 nm) (Benz *et al.*, 1994a), s čímž souvisela jejich nízká vodivost (27 pS v 1 M KCl, pH 6.0) v porovnání s  $\alpha$ -hemolyzinem *E. coli*, který tvořil za stejných podmínek kanály s mnohem vyšší vodivostí (~1500 pS) (Benz *et al.*, 1994a). Tvorbu kanálů ACT v membráně ovlivňovala přítomnost vápenatých iontů (Knapp *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 1994), polarita a velikost membránového potenciálu (Szabo *et al.*, 1994), složení membrány (Benz *et al.*, 1994a; Szabo *et al.*, 1994) a také typ mastné kyseliny (Benz *et al.*, 1994a), jež byla navázána na toxin v rámci jeho posttranslační modifikace (Basar *et al.*, 1999; Hackett *et al.*, 1995; Havlicek *et al.*, 2001).

Sporným zůstává mechanismus, jakým tvoří ACT či ostatní RTX toxiny póry (kanály) v membráně. Zejména se jedná o otázku, zda je pro tvorbu kanálu nezbytná oligomerizace několika molekul toxinu nebo zda kanál tvoří jedna molekula toxinu. Zatímco v případě  $\alpha$ -hemolyzinu *E. coli* existují výsledky, které podporují první ale i druhou možnost (Benz *et al.*, 1989; Bhakdi *et al.*, 1986; Jorgensen *et al.*, 1980; Ludwig *et al.*, 1993; Menestrina *et al.*, 1987), v případě ACT řada výsledků naznačuje, že ke tvorbě pórů dochází až po oligomerizaci ACT. Jednak koncentrační závislost hemolytické aktivity nebo tvorby kanálů v uměle vytvořené membráně má sigmoidní charakter s Hillovým číslem kooperativity > 3 (Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994), který nepřímo naznačuje, že kanály tvoří trimery nebo vyšší oligomery ACT. Oligomerizaci ACT podporují také výsledky Iwakiho a kolegů, kteří ukázali, že po

smíchání dvojic neaktivních forem toxinu, které obsahovaly vzájemně se nepřekrývající delece, došlo k částečnému obnovení invazivní a hemolytické aktivity (Iwaki *et al.*, 1995). Bejerano a kolegové dále rozšířili předchozí studii Iwakiho o pozorování, že k funkční komplementaci a tedy obnovení biologické aktivity původně neaktivního toxinu je nezbytná přítomnost posledních osmi opakujících se RTX sekvencí a následujících 15 aminokyselin (blok A) na C-konci toxinu (Bejerano *et al.*, 1999). V nedávné době byla navíc popsána tvorba oligomerů adenylátcyklázového toxinu v roztoku s vysokou koncentrací detergentu (1% NP-40), která byla závislá na přítomnosti postranlační modifikace toxinu mastnou kyselinou, ale nebyla závislá na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  v roztoku (Lee *et al.*, 2005). Avšak v uvedené studii je hlavním problémem skutečnost, že u detekovaných oligomerů nebyla přímo otestována jejich biologická aktivita, a nelze tedy jednoznačně prokázat jejich účast při tvorbě pórů v membráně. Rovněž dosud chyběl přímý důkaz přítomnosti oligomerů ACT v membráně, protože se doposud nepodařilo oligomery v membráně detekovat nebo je z membrány izolovat (Ehrmann *et al.*, 1992). Hlavním námětem této dizertační práce byla právě detekce oligomerů v membráně, jejich izolace a studium jejich vztahu k hemolytické aktivitě toxinu.

#### 2.2.2.1.4. Účinky ACT na cílové buňky

ACT patří mezi RTX toxiny, které lze zjednodušeně rozdělit na leukotoxiny, které jsou toxické pro úzké spektrum buněk imunitního systému, a hemolyziny, které jsou toxické pro široké spektrum buněk (Lally *et al.*, 1999). ACT působí jako leukotoxin, protože rozeznává specifický proteinový receptor CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001) na povrchu makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk, i jako hemolyzin, protože se váže, i když s nižší účinností, na široké spektrum buněk, které nemají specifický proteinový receptor (např. erytrocyty a epiteliální buňky). ACT může způsobit koloidně osmotickou lyzi erytrocytů (Benz *et al.*, 1994a; Szabo *et al.*, 1994), podobně jako  $\alpha$ -hemolyzin *E. coli*, jehož účinek na erytrocyty se projevil rychlým únikem  $\text{K}^+$  a vstupem  $\text{Ca}^{2+}$  (Bhakdi *et al.*, 1986; Jorgensen *et al.*, 1983) a morfologickou změnou buněk (Jorgensen *et al.*, 1980). Po působení ACT na tracheální epiteliální buňky dochází k produkci prozánětlivého cytokinu IL-6 (Bassinat *et al.*, 2004; Obr. 9), a to prozatím neznámým mechanismem.



Obr. 9: Schématické znázornění důležitých interakcí ACT s cílovými buňkami po kolonizaci respiračního epitelu bakterií *Bordetella pertussis*. (A) Bordetely kolonizují řasinkové buňky ve vzdušnici a bronších a váží se také na buňky imunitního systému, jako jsou makrofágy, neutrofilové nebo intraepiteliální dendritické buňky. (B) Hlavní faktory virulence *B. pertussis*. Mezi adheziny patří vláknitý hemaglutinin (FHA), fimbrie a pertaktin. Mezi toxiny patří pertusový toxin (PT), adenylátcyklázový toxin (ACT), dermonekrotický toxin (DNT) a tracheální cytotoxin (TCT). (C) Zvětšený obrázek znázorňující interakce ACT s buňkami imunitního systému (makrofágy, neutrofilové nebo dendritickými buňkami). Po sekreci ACT pomocí sekrečního systému typu I dochází kolem bakterie k vytvoření „obálky“ z molekul ACT. Většina molekul ACT je pravděpodobně zachycena na povrchu bakterie (růžově označená vrstva), některé molekuly jsou ale schopné vazby na cílové buňky. Specifickým proteinovým receptorem na povrchu buněk imunitního

systému je intergrin CD11b/CD18. Po vazbě na receptor a inzerci do membrány ACT přenáší svou AC doménu do cytozolu, kde katalyzuje neregulovanou přeměnu ATP na cAMP. Kromě toho ACT tvoří pravděpodobně po oligomerizaci několika molekul póry v plazmatické membráně, které jsou selektivní pro kationty. Jak tvorba cAMP, tak tvorba pórů mohou v součinnosti nebo individuálně ovlivnit nebo inhibovat baktericidní funce makrofágů a neutrofilů nebo indukovat jejich apoptózu či lyzi. U dentritických buněk ovlivňuje zvýšená tvorba cAMP po působení ACT jejich zrání, a vede ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů (IL-12, TNF $\alpha$ ) a naopak ke zvýšení produkce protizánětlivého cytokinu IL-10. Takovéto dentritické buňky potom mohou stimulovat T regulační buňky, jež mohou navodit toleranci vůči infekci *B. pertussis*. (D) Zvětšený obrázek interakce ACT s řasinkovými buňkami respiračního epitelu. ACT indukuje sekreci prozánětlivého cytokinu IL-6 z řasinkových buněk a inhibuje vstup (invazi) bakterií do řasinkových buněk. Upraveno podle Vojtová *et al.*, 2006a.

V případě buněk imunitního systému se účinek ACT projevuje celou řadou efektů. U neutrofilů a makrofágů ACT inhibuje chemotaxi, fagocytózu a oxidační vzplanutí (Confer *et Eaton*, 1982; Friedman *et al.*, 1987; Pearson *et al.*, 1987; Weingart *et al.*, 2000; Weingart *et Weiss*, 2000; Obr. 9), a to především díky své invazivní adenylátcyklázové aktivitě. Ta je zodpovědná za extrémní zvýšení cAMP ve fagocytech (až 10 000 $\times$  oproti původní hladině, Marek Basler, osobní sdělení), přitom již dvojnásobné zvýšení hladiny cAMP účinně inhibuje fagocytózu (Bourne *et al.*, 1974; Roch-Arveiller *et al.*, 1979). Dále ACT způsobuje maturaci dendritických buněk, jež je rovněž závislá na adenylátcyklázové aktivitě toxinu a projevuje se zvýšenou expresí MHC gp II a kostimulačních molekul na buněčném povrchu a snížením produkce prozánětlivých cytokinů IL-12 a TNF- $\alpha$  a naopak zvýšenou produkcí protizánětlivého cytokinu IL-10 (Bagley *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2004; Obr. 9). ACT může také způsobit apoptózu nebo lyzi makrofágů (Basler *et al.*, 2006; Boyd *et al.*, 2005; Hewlett *et al.*, 2006; Khelef *et al.*, 1993; Obr. 9). V tomto případě k zabíjení buněk přispívá vedle adenylátcyklázové aktivity také hemolytická (kanálotvorná) aktivita toxinu (Basler *et al.*, 2006; Boyd *et al.*, 2005; Hewlett *et al.*, 2006).

Výsledný efekt působení ACT na buňky imunitního systému velmi pravděpodobně souvisí s množstvím aktivního toxinu, který je navázán na buňky. V případě jiných typů RTX leukotoxinů bylo totiž pozorováno, že ve velmi nízkých koncentracích aktivovaly leukocyty (neutrofilů) a způsobily respirační vzplanutí a degranulaci (Johansson *et al.*, 2000; Narayanan *et al.*, 2002; Ortiz-Carranza *et Czuprynski*, 1992). Po přidání vyšší koncentrace toxinu buňky podlely apoptóze (Lally *et al.*, 1999) a velmi vysoká koncentrace toxinu indukovala únik K<sup>+</sup>, zvětšování buněk (Clinkenbeard *et al.*, 1989), poškození membrány a nekrózu (Lally *et al.*, 1999). V případě ACT, který

naopak v nízkých koncentracích inhibuje respirační vzplanutí a degranulaci neutrofilů a makrofágů (Confer *et Eaton*, 1982), velmi pravděpodobně tvorba cAMP převáží nad kanálotvornou aktivitou toxinu, jež je velmi nízká a závislá na koncentraci toxinu (Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994) a projeví se až po navázání většího množství ACT na buňku.

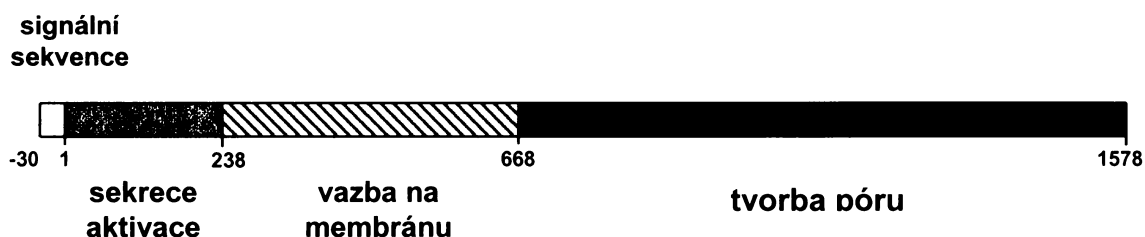
### 2.2.3. Hemolyziny typu ShlA bakterie *Serratia marcescens*

Do skupiny hemolyzinů typu ShlA patří hemolyzin ShlA bakterie *Serratia marcescens*, která způsobuje infekce dýchacího a urogenitálního traktu, bakteriémie, endokarditidu, artritidu a meningitidu (Maki *et al.*, 1973), a jemu podobné hemolyziny, jež produkují bakterie *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Haemophilus ducreyi*, *Edwadsia tarda* (Alouf, 2003), *Erwinia chrysanthemi* (Kim *et al.*, 1998), *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Photobacterium luminescens* a *Xylella fastidiosa* (Hertle, 2005).

#### 2.2.3.1. Syntéza, sekrece a struktura hemolyzinu ShlA

Hemolyzin ShA je kódován genem *shlA*, který je pod kontrolou železem řízeného promotoru. Ve stejném operonu jako gen *shlA* se nachází gen *shlB*, který kóduje protein ShlB, který je lokalizovaný ve vnější membráně bakterií a je nezbytný pro sekreci ShlA a podílí se také na jeho aktivaci (Hertle, 2000). Za aktivaci ShlA je zodpovědná konformační změna toxinu (Walker *et al.*, 2004), jež nastane po interakci s proteinem ShlB a navázání několika molekul fosfatidyletanolaminu (Hertle *et al.*, 1997).

Hemolyzin ShlA má molekulovou hmotnost 165 kDa a v rámci jeho primární struktury bylo identifikováno několik funkčních oblastí (Obr. 10). Na N-konci polypeptidu je signální sekvence (30 aminokyselin), která je zodpovědná za transport toxinu do periplazmatického prostoru. Za ní následuje oblast důležitá pro sekreci a aktivaci toxinu a dále oblast, která umožňuje navázání na membránu. Poslední C-koncová oblast polypeptidu je zodpovědná za tvorbu póru v plazmatické membráně cílových buněk.



**Obr. 10:** Schéma funkčních oblastí hemolyzinu ShlA bakterie *Serratia marcescens*. Pro sekreci a aktivaci toxinu je důležitá N-koncová oblast polypeptidu, za ní následuje oblast nutná k navázání na membránu. Zbývající C-koncová část polypeptidu je zodpovědná za tvorbu pórů v membráně. Vytvořený transmembránový pór je v membráně stabilizován pomocí interakcí s negativně nabitými molekulami fosfatidylserinu (Hertle, 2002). Upraveno podle Hertle, 2000.

#### 2.2.3.2. Mechanismus tvorby pórů u hemolyzinu ShlA

Hemolyzin ShlA lyzuje široké spektrum buněk a k navázání na membránu nepotřebuje proteinový receptor (Hertle, 2002). Účinnost navázání a zanoření ShlA do membrány ale zvyšuje přítomnost fosfatidylserinu (Hertle, 2002), který se nachází ve vnitřní vrstvě cytoplazmatické membrány eukaryotických buněk. Předpokládá se, že molekuly fosfatidylserinu pravděpodobně stabilizují vytvořený transmembránový pór v membráně (Hertle, 2002).

Hemolytická aktivita hemolyzinu ShlA je inhibována v přítomnosti oligosacharidů, např. dextranu 4 (Braun *et al.*, 1987), což ukazuje na omezenou velikost pórů. V umělých lipidických membránách tvoří hemolyzin ShlA hydrofilní póry o průměru 1-3 nm, které nejsou selektivní pro ionty a jejichž tvorba není závislá na membránovém potenciálu (Schonherr *et al.*, 1994). Velikost detekovaných pórů ale závisí na fluiditě membrány. V membránách s nízkou fluiditou tvoří ShlA malé póry o průměru 1-1,5 nm, zatímco v membránách s vyšší fluiditou tvoří ShlA větší póry o průměru 2,5-3 nm (Schonherr *et al.*, 1994). Tvorba větších pórů je pravděpodobně způsobena spojováním monomerů do oligomerů. Oligomerizace hemolyzinu ale pravděpodobně není pro tvorbu póru nutná (Hertle, 2000).

### 2.2.3.3. Účinky hemolyzinu Sh1A na cílové buňky

Hemolyzin Sh1A způsobuje lyzi lidských a zvířecích erytrocytů (Schiebel *et* Braun, 1989), uvolnění leukotrienů a histaminu z leukocytů (Konig *et al.*, 1987). Dále u epiteliálních buněk způsobuje únik  $K^+$ , vyčerpání zásob ATP a vakuolizaci (Hertle, 2002). Zatímco únik  $K^+$  a vyčerpání ATP bylo detekováno u různých typů eukaryotických buněk (např. u keratocytů, endoteliálních buněk, fibroblastů, monocytů a granulocytů), vznik vakuol byl pozorován pouze u epiteliálních buněk. Po vzniku vakuol následovala lyze nebo apoptóza buněk, a to v závislosti na množství přidaného toxinu (Hertle, 2002). Hemolyzin Sh1A rovněž spouští internalizaci bakterií *S. marcescens* do epiteliálních buněk, a přispívá tak k rozvoji infekce (Hertle *et* Schwarz, 2004).

### 2.2.4. Cytolyziny skupiny *Vibrionaceae*

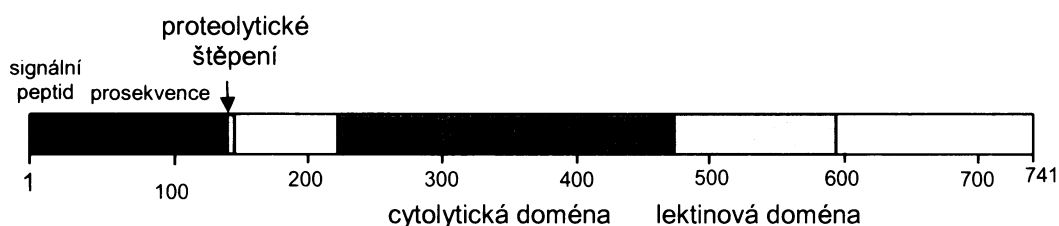
Do skupiny toxinů tvořících póry, zde označené jako cytolyziny skupiny *Vibrionaceae*, patří několik toxinů, které produkují různé kmeny vibrií. Modelovým příkladem je cytolyzin, který sekretují kmeny *Vibrio cholerae* O1 EL Tor a *Vibrio cholerae* non-O1. Cytolyzin bakterie *Vibrio cholerae* se podílí na patogenezi gastroenteritidy, a to zejména u těch kmenů *V. cholerae*, které neprodukují cholerový toxin (Pichel *et al.*, 2003).

#### 2.2.3.1. Syntéza, sekrece a struktura cytolyzinu bakterie *Vibrio cholerae*

Cytolyzin bakterie *Vibrio cholerae* (VCC) je termolabilní toxin, který je syntetizován jako preprotoxin (Obr. 11). Během sekrece cytolyzinu přes vnitřní cytoplazmatickou membránu dochází k odštěpení signálního peptidu na N-konci a vzniku protoxinu. Po přenosu přes vnější membránu je protoxin dále štěpen exogenními (extracelulárními) proteázami nebo endogenními metaloproteázami skupiny ADAM (Valeva *et al.*, 2004), které jsou přítomné na povrchu cílových buněk. Po proteolytickém štěpení protoxinu vzniká aktivní toxin (65 kDa), který po vazbě na membránu a oligomerizaci tvoří transmembránový pór.



Z teoretických analýz aminokyselinové sekvence a 3D modelování vyplynula skutečnost, že se cytolyzin podobá  $\alpha$ -toxinu *Staphylococcus aureus* (Olson *et al.*, 2003). V jeho primární struktuře byla identifikována tzv. cytolytická doména (Obr. 11), jež je zodpovědná za tvorbu transmembránového póru, který má strukturu antiparalelního beta-válce (Olson *et al.*, 2003; Valeva *et al.*, 2005). Za cytolytickou doménou byla dále nalezena lektinová doména (Olson *et al.*, 2003), která umožňuje vazbu na galaktosylové zbytky na povrchu glykoproteinů (Saha *et al.*, 1997).

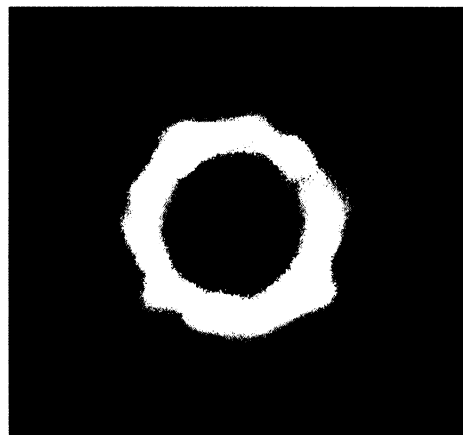


**Obr. 11: Schématické znázornění cytolyzinu bakterie *Vibrio cholerae*.** K aktivaci cytolyzinu je nezbytné odštěpení N-koncové části polypeptidu, ke kterému dochází po sekreci. Cytolytická doména je zodpovědná za tvorbu póru, která je podmíněná přítomností cholesterolu v membráně a oligomerizací sedmi molekul cytolyzinu (Zitzer *et al.*, 2000; Zitzer *et al.*, 2003). Lektinová doména obstarává vazbu na povrch glykoproteinů (Saha *et al.*, 1997). Upraveno podle Olson *et al.*, 2003.

#### 2.2.3.2. Mechanismus tvorby pórů u cytolyzinu bakterie *Vibrio cholerae*

Po navázání cytolyzinových monomerů na membránu eukaryontních buněk dochází k jejich oligomerizaci (Valeva *et al.*, 2004), jež vede k vytvoření transmembránového póru o průměru 1,5 nm (Zitzer *et al.*, 1995). Na modelu uměle připravených lipidových váčků (lipozómů) byl pozorován zvýšený nárůst oligomerizace cytolyzinu v případě, když byly lipozómy připraveny z cholesterolu a sfingolipidů (Zitzer *et al.*, 1999), což naznačilo možnost, že cytolyzin váže dva různé typy lipidů. Později bylo ale ukázáno, že zatímco přítomnost cholesterolu je pro oligomerizaci cytolyzinu nezbytná (Harris *et al.*, 2002; Zitzer *et al.*, 2000; Zitzer *et al.*, 2003), přítomnost sfingolipidů nebo i jiných lipidů s kuželovým tvarem molekuly (cone-shaped lipids) pravděpodobně pouze nepřímo usnadňuje interakci cytolyzinu s cholesterolem (Zitzer *et al.*, 2001). Dále, je k oligomerizaci cytolyzinu pravděpodobně nutná konformační změna cytolyzinu, jež je závislá na teplotě (Zitzer *et al.*, 2000). Tuto domněnku podporuje skutečnost, že rozvolnění terciární struktury toxinu indukuje jeho oligomerizaci (Chattopadhyay *et al.*, 2003).

Cytolyzinové oligomery jsou rezistentní k SDS a jejich zdánlivá molekulová hmotnost odečtená z SDS-PAGE odpovídá hmotnosti tetramerů (Saha *et al.*, 1997). Na základě tvorby hybridních oligomerů o různé molekulové hmotnosti byl ale navržen pentamerní model oligomerů (Zitzer *et al.*, 1999), který tuto skupinu odlišil od ostatních bakteriálních toxinů tvořících póry. Avšak výsledky pozdější elektronmikroskopické studie prokázaly sedmičetnou symetrii oligomerů (Harris *et al.*, 2002; Obr. 12) a naznačily podobnost s již známými heptamery s kroužkovou (prstencovou) strukturou, které tvoří např.  $\alpha$ -toxin *Staphylococcus aureus* (Fussle *et al.*, 1981) nebo aerolyzin bakterie *Aeromonas hydrophila* (viz kapitola 2.2.4).



**Obr. 12: Sedmičetná symetrie cytolyzinu *Vibrio cholerae*.** Symetrie cytolyzinu byla zjištěna na základě analýzy negativně barvených oligomerů. Převzato z Harris *et al.*, 2002.

#### 2.2.3.3. Účinky cytolyzinu *Vibrio cholerae* na cílové buňky

Cytolyzin bakterie *Vibrio cholerae* tvoří kanály selektivní pro anioty (Krasilnikov *et al.*, 1992), které mohou způsobit lyzi erytrocytů nebo dalších savčích buněk (Honda *et al.*, 1979). Cytolyzin je ale toxický především pro enterocyty, protože jeho vazba na membrány a interakci s cholesterolem (viz výše) usnadňují sfingolipidy (Zitzer *et al.*, 2001; Zitzer *et al.*, 1999), které se přednostně nacházejí v kartáčovém lemu střevních epiteliálních buněk. U enterocytů byla po přidání cytolyzinu pozorována tvorba vakuol (Coelho *et al.*, 2000), které bylo možné zabránit použitím specifických inhibitorů cytolyzinového kanálu (Moschioni *et al.*, 2002) a která připomínala účinek toxinu VacA bakterie *Helicobacter pylori* (Cover *et al.*, 1992).

#### 2.2.4. Aerolyzin

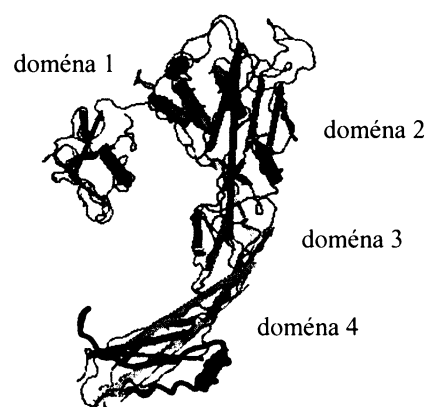
Aerolyzin produkují různé kmeny bakterie *Aeromonas sp.* Tyto bakterie jsou u lidí zodpovědné za některá průjemová onemocnění a jsou také spojovány se vznikem infekcí, které vznikají při hlubokém poranění tkání (Altwegg *et al.*, 1989). Aerolyzin se

podílí na rozvoji onemocnění a protilátky proti aerolyzinu mají ochranný účinek proti infekcím bakterií *Aeromonas*.

#### 2.2.4.1. Syntéza, sekrece a struktura aerolyzinu

Aerolyzin je syntetizován jako preprotoxin, který obsahuje N-koncový signální peptid a C-koncovou sekvenci, která je odštěpena při aktivaci toxinu (Howard *et Buckley*, 1985). Signální peptid je zodpovědný za transport protoxinu do periplazmatického prostoru mechanismem závislým na Sec proteinu. V periplazmatickém prostoru je aerolyzin svinut do trojrozměrné konformace (Hardie *et al.*, 1995), a poté transportován přes vnější plazmatickou membránu (Pugsley *et al.*, 1997).

Proaerolyzinový monomer (52 kDa) tvoří čtyři domény (Parker *et al.*, 1994; Obr. 13), které obsahují ze 40 %  $\beta$  listy a ze 17 %  $\alpha$  helixy. Po interakci protoxinu s exogenními proteázami (Abrami *et al.*, 1998; van der Goot *et al.*, 1992) nebo proteázami produkovanými bakterií *Aeromonas* (Howard *et Buckley*, 1985) dochází k odštěpení 40 aminokyselin z C konce čtvrté domény (Garlet *et Buckley*, 1988). Odštěpení polypeptidu vede ke konformační změně aerolyzinu, jež je nezbytná pro tvorbu póru a projevuje se zvýšeným podílem  $\beta$  listů ve struktuře (Cabiaux *et al.*, 1997).

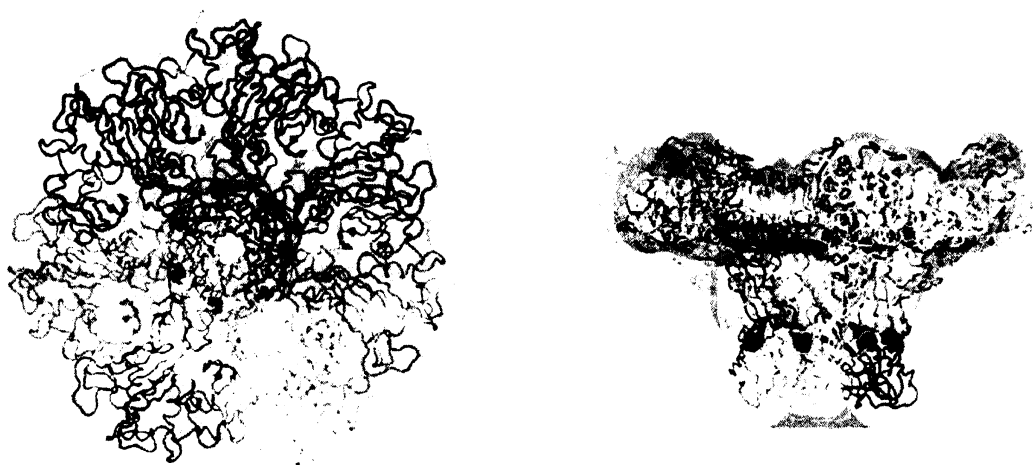


**Obr. 13: Struktura proaerolyzinového monomeru.** Červeně je označena C-koncová část toxinu, která je odštěpena při aktivaci toxinu. Upraveno podle Parker *et al.*, 1994.

#### 2.2.4.2. Mechanismus tvorby póru

Aerolyzin se váže ve formě aktivovaného toxinu nebo protoxinu na specifické receptory na povrchu cílových buněk (Abrami *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 1999), kterými jsou proteiny ukotvené v membráně pomocí glykofosfatidylozitolové (GPI) kotvy (Abrami *et al.*, 1998; Diep *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1996). Aerolyzin váže konzervovanou část GPI-kotvy (Diep *et al.*, 1998; Fukushima *et al.*, 2003), ale k účinné vazbě přispívají také cukry navázané N-glykosidickou vazbou k proteinu (Hong *et al.*, 2002).

Vzhledem ke skutečnosti, že se GPI proteiny nacházejí v membráně především v tzv. membránových mikrodoménách (kapitola 2.2.1.3.2), byla navržena hypotéza, že zvýšená koncentrace receptorů v těchto oblastech vede k nahloučení aerolyzinových molekul, a tak usnadnění oligomerizace (Abrami *et van Der Goot*, 1999). Aktivované monomery se na membráně spojují do heptameru, který je schopen inserce do membrány pravděpodobně přes  $\beta$  barel, tvořený C-koncovými doménami (Parker *et al.*, 1994; Tsitrin *et al.*, 2002). Aerolyzinový oligomer je v průměru 15 nm široký a 17,5 nm vysoký a jeho středem prochází kanál o průměru 2 nm (Tsitrin *et al.*, 2002; Obr. 14).



**Obr. 14: Model aerolyzinového oligomeru.** Oligomer je široký 15 nm a vysoký 17,5 nm a jeho středem prochází kanál o průměru 2 nm. Trojrozměrný model aerolyzinového oligomeru byl odvozen na základě analýzy oligomerů zobrazených technikou kryo-negativního barvení. Převzato z Tsitrin *et al.*, 2002.

#### 2.2.4.3. Účinky aerolyzinu na cílové buňky

Aerolyzin tvoří v membráně kanály, které jsou selektivně propustné pro malé ionty, jako je  $K^+$  nebo  $Ca^{2+}$  (Krause *et al.*, 1998). Zvýšená propustnost membrány pro ionty vyvolává v závislosti na typu cílové buňky různou odpověď. U granulocytů aerolyzin spouští uvolnění  $Ca^{2+}$  z endoplazmatického retikula (Krause *et al.*, 1998). U makrofágů aktivuje metabolismus kyseliny arachidónové a ovlivňuje produkci cytokinů TNF, IL-1 a IL-6 (Chopra *et al.*, 2000). U T lymfocytů aerolyzin indukuje apoptózu (Nelson *et al.*, 1999) a u epiteliálních buněk, které jsou jeho hlavním cílem (Abrami *et al.*, 2003), způsobuje vakuolizaci endoplazmatického retikula (Abrami *et al.*, 1998).

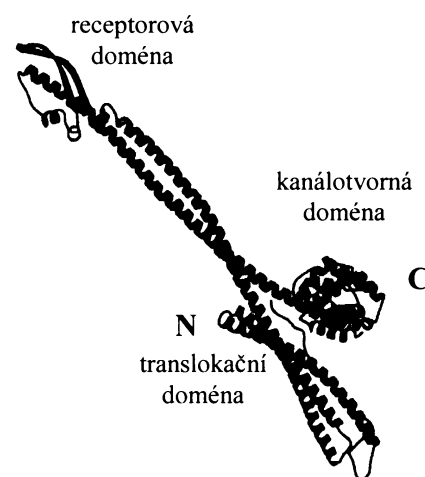
### 2.2.5. Koliciny

Koliciny jsou antimikrobiální toxiny, které produkuje *Escherichia coli* a příbuzné druhy bakterií (Lazdunski, 1995). Skupina kolicinů, do které patří např. kolicin A, B, E1, Ia, Ib a N, zabíjí citlivé bakterie tvorbou kanálů ve vnitřní cytoplazmatické membráně (Cramer *et al.*, 1995; Stroud, 1995).

#### 2.2.5.1. Syntéza, sekrece a struktura kolicinů

Koliciny jsou kódovány plazmidy (Lazdunski, 1995; Waleh *et Johnson*, 1985), jejichž součástí jsou rovněž geny pro tzv. imunitní proteiny, které hostitelským bakteriím zajišťují rezistenci vůči kolicinům (Kleanthous *et Walker*, 2001). Kolicinový operon je pod kontrolou SOS promotoru (Waleh *et Johnson*, 1985) a koliciny jsou syntetizovány ve velkém množství při stresu (Eraso *et Weinstock*, 1992; Nakazawa *et Tamada*, 1972; Tessman *et Peterson*, 1980). Způsob, jakým dochází k sekreci kolicinů z bakterie, není známý. K jejich uvolnění je ale nezbytný lipoprotein (Cavard, 2004), jehož gen je součástí kolicinového operonu (Kleanthous *et Walker*, 2001; Waleh *et Johnson*, 1985).

Molekulová hmotnost kolicinů je 40-60 kDa (Parker *et al.*, 1990) a jejich struktura obsahuje tři funkční domény spojené dvěma velmi dlouhými  $\alpha$ -helixy (Wiener *et al.*, 1997; Obr. 15). Na N-konci polypeptidu je tzv. translokační doména, která zajišťuje přenos kolicinu přes vnější membránu do periplazmatického prostoru. Uprostřed molekuly kolicinu se nachází receptorová doména, která rozeznává receptor ve vnější membráně (Nau *et Konisky*, 1989) a na C-konci polypeptidu je kanálotvorná doména, která tvoří iontový kanál v cytoplazmatické membráně cílových buněk.

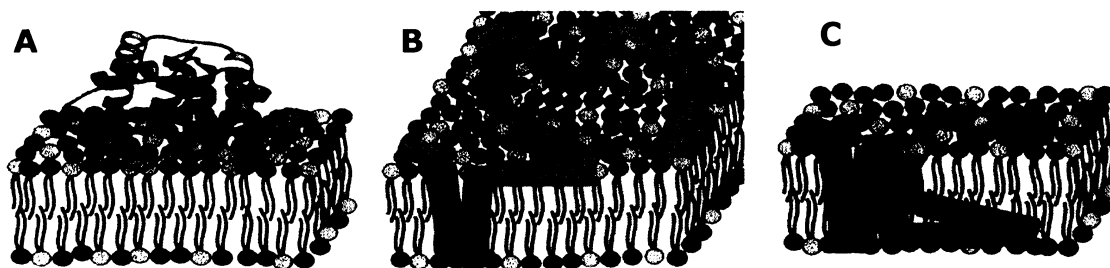


**Obr. 15: Struktura kolicinu Ia.** Struktura kolicinu byla určena pomocí rentgenové difrakce krystalů. Převzato z Wiener *et al.*, 1997.

Kanálotvornou doménu tvoří 10  $\alpha$ -helixů, které jsou uspořádané do trojvrstevné struktury, v jejímž centru je ukrytá velmi hydrofóbní vlásenka tvořená osmým a devátým  $\alpha$ -helixem (Hilsenbeck *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 1989; Zakharov *et Cramer*, 2002a; Obr. 16A).

## 2.2.5.2. Mechanismus tvorby póru

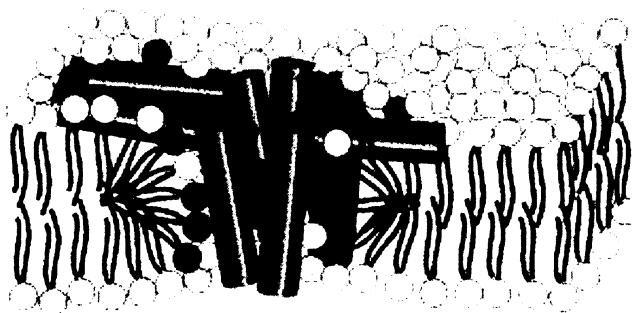
Po proniknutí kolicinu do periplazmatického prostoru dojde ke konformační změně kanálotvorné domény, která vede ke spontánnímu zanoření do membrány a tvorbě kanálu. Za prvotní interakce kanálotvorné domény s vnitřní membránou jsou nejspíše zodpovědné elektrostatické interakce mezi kladně nabitými aminokyselinami na povrchu kolicinu a negativně nabitými lipidy (Parker *et al.*, 1989). Dalším krokem je pravděpodobně tvorba tzv. rozvolněné globule (molten globule) vlivem nízkého pH (van der Goot *et al.*, 1991), pro kterou je charakterické zachování sekundární nikoli však terciární struktury proteinu. Důvodem pro tvorbu rozvolněné globule je snazší tvorba struktury s odkrytou hydrofóbní vlásenkou, která je schopná zanoření do membrány (van der Goot *et al.*, 1991). Po zanoření kanálotvorné domény do membrány dojde k vytvoření napětově řízeného iontového kanálu, jehož otevření je spojené s přenosem několika  $\alpha$ -helixů přes plazmatickou membránu (Slatin *et al.*, 2004; Slatin *et al.*, 1994; Zakharov *et al.*, 2002; Obr. 16). Je zajímavé, že hybridní kolicin, který nesl v translokovaném segmentu cizí protein, měl zachovanou schopnost translokace a přenesl vložený protein přes membránu (Slatin *et al.*, 2002).



**Obr.16: Model postupného zanořování kanálotvorné domény kolicinu do membrány. (A)** Kanálotvorná doména navázaná na povrchu membrány. **(B)** Prekurzor otevřeného kanálu. Hydrofóbní vlásenka je zanořena v membráně. **(C)** Stav otevřeného kanálu, který je spojený s translokací několika  $\alpha$ -helixů. Hydrofóbní vlásenka je vyznačena červeně a hydrofilní a amfifilní helixy modře. Upraveno podle Zakharov *et Cramer*, 2002a.

Přestože je známá struktura kanálotvorné domény u několika různých kolicinů, struktura transmembránového kanálu není zcela objasněna. Podle jedné z hypotéz tvoří kanál jediná molekula kolicinu (Peterson *et Cramer*, 1987; Slatin, 1988) a při jeho tvorbě se uplatňují čtyři  $\alpha$ -helixy. Avšak právě skutečnost, že nízký počet  $\alpha$ -helixů by měl být zodpovědný za tvorbu definovaného kanálu vedla k alternativní hypotéze, podle které

kanál tvoří spíše dimer nebo větší oligomer (Parker *et al.*, 1989; Pattus *et al.*, 1985; Zakharov *et al.*, 2002). Jiným možným vysvětlením by byla tvorba kanálů s účastí membránových lipidů (Zakharov *et al.*, 2002b), jako je tomu např. u antibiotika syringomycinu E (Malev *et al.*, 2002). Možnost, že se lipidy (resp. hydrofilní hlavičky lipidů) podílejí na tvorbě kanálu (Obr. 17) naznačila nedávná pozorování, jež ukázala, že přítomnost lipidu (lysofosfatidylcholinu) způsobujícího pozitivní zakřivení membrány zvýšila kanálotvornou aktivitu kolicinu E1 (Sobko *et al.*, 2004). Pokud se tedy lipidy podílejí na tvorbě kanálu, není oligomerizace kolicinu pravděpodobně nutná.



**Obr.17: Model kanálu kolicinu E1, na jehož tvorbě se pravděpodobně podílejí lipidy.** Modře jsou označeny  $\alpha$ -helixy I-VII a X a hnědě hydrofobní vlásenka (VIII. a IX.  $\alpha$ -helix). Neutrální lipidy jsou vyznačeny žlutě a negativně nabitě lipidy červeně. Převzato z Sobko *et al.*, 2004.

#### 2.2.5.3. Účinky kolicinů na cílové buňky

Koliciny tvoří kanály ve vnitřní membráně bakterií, což umožňuje únik monovalentních iontů ( $H^+$ ,  $K^+$  a  $Na^+$ ) z buněk a depolarizaci membrány. Reakcí buňky je kompenzace depolarizace zvýšenou činností  $Na^+/K^+$  ATPázy, která vede k vyčerpání zásob ATP a ke smrti buňky (Cramer *et al.*, 1995).

## 2.3. Využití ACT pro indukci antigenně specifické imunitní odpovědi

### 2.3.2. Indukce antigenně specifických imunitních mechanismů

Antigenně-specifické imunitní mechanismy reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátek a antigenně-specifických receptorů T lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem (Hořejší *et*

Bartůňková, 2002). Dělí se na mechanizmy humorální (založené na protilátkách) a buněčně zprostředkované (založené hlavně na T lymfocytech). Imunitní odpověď vyvolaná humorálními reakcemi působí především proti extracelulární fázi bakteriální a virové infekce a proti rozpustným antigenům. Buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď chrání organismus před buňkami infikovanými virem nebo intracelulárními parazity, cizími tkáněmi a také před některými typy nádorových buněk.

#### 2.3.2.1. Buněčně zprostředkovaná imunitní odpověď

Pro buněčně zprostředkovanou imunitní odpověď jsou nezbytné T lymfocyty, které se dají rozdělit do dvou skupin: 1) na lymfocyty nesoucí na svém povrchu molekuly CD8 a 2) lymfocyty nesoucí molekuly CD4.

Většina **CD8<sup>+</sup> T lymfocytů** jsou prekurzory cytotoxických T buněk (T<sub>c</sub>), které ničí buňky infikované virem nebo intracelulárními parazity a abnormální buňky mechanismy závislémi na bezprostředním kontaktu mezi T<sub>c</sub> a napadenou buňkou nebo prostřednictvím sekretovaných produktů (Hořejší *et* Bartůňková, 2002). Molekuly CD8 jsou koreceptory pro molekuly MHC glykoproteinů I. třídy (MHC gp I), které jsou přítomné na všech buňkách organismu. MHC gp I váží peptidové fragmenty endogenních proteinů (produkovaných buňkou) a vystavují je na buněčném povrchu tak, aby byly potenciálně rozeznatelné T lymfocyty. Peptidy navázané na MHC gp I pocházejí hlavně z proteinů, které jsou degradovány v cytoplazmě proteolytickým komplexem (proteazómem). Proteazómy štěpí jak normální buněčné proteiny, tak i proteiny pocházející z intracelulárních parazitů. Vytvořené peptidové fragmenty jsou transportovány z cytoplazmy prostřednictvím specifických membránových pump označovaných jako TAP do endoplazmatického retikula. V endoplazmatickém retikulu dochází k vazbě peptidu na MHC gp I, který je pak dále transportován do Golgiho aparátu a posléze na buněčný povrch.

Většina **CD4<sup>+</sup> T lymfocytů** jsou prekurzory pomocných T buněk (T<sub>H</sub>), které lze dále rozdělit na T<sub>H1</sub> a T<sub>H2</sub>. Základní funkcí T<sub>H1</sub> lymfocytů je stimulace makrofágů k přeměně na tzv. aktivované makrofágy, které jsou schopny zabít některé intracelulární parazity, např. mykobakterie. Funkcí T<sub>H2</sub> lymfocytů je spolupráce s B lymfocyty, která vede k jejich diferenciaci na plazmatické buňky produkující velká množství protilátek. Molekuly CD4 jsou koreceptory pro molekuly MHC glykoproteinů II. třídy (MHC gp II), které jsou přítomny na buňkách prezentujících antigen, jako jsou dendritické buňky,

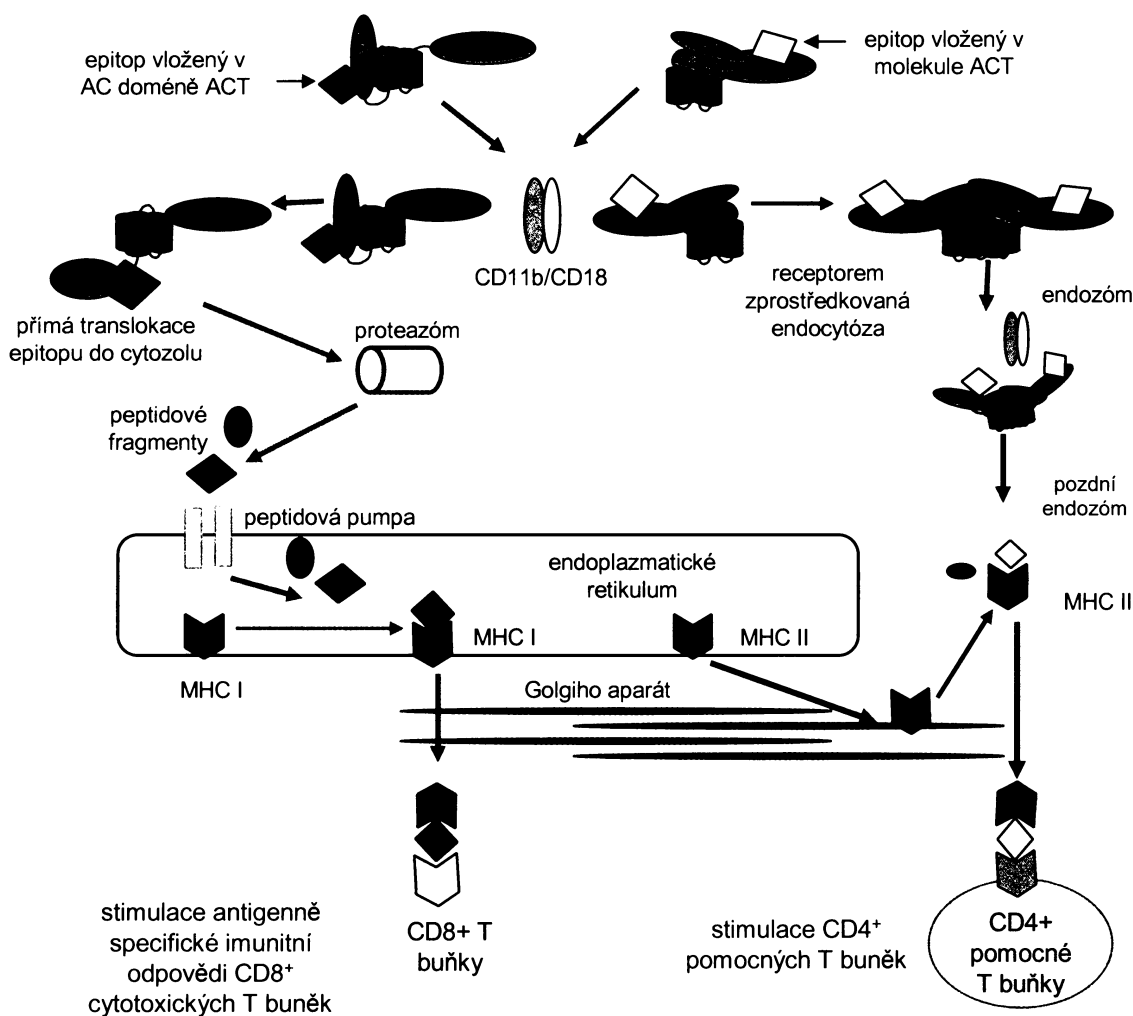


monocyty, makrofágy a B lymfocyty. MHC gp II váží peptidové fragmenty exogenních proteinů, které byly pohlceny buňkou prezentující antigen. Po zachycení exogenních proteinů na povrchu buněk prezentujících antigen dochází k jejich endocytóze. Vzniklé endocytické váčky (endozomy) fúzí s lysozomy, které obsahují hydrolázy, jež štěpí pohlcené proteiny. Po fúzi s lysozomy dochází k fúzi s transportním váčkem z Golgiho aparátu, který obsahuje prekurzorové komplexy MHC gp II, a po navázání peptidů na MHC gp II dochází k fúzi váčku s plazmatickou membránou.

V případě očkování proti virovým infekcím nebo intracelulárním mikrobiálním parazitům je důležité navození buněčně-zprostředkované imunitní odpovědi, kterou zajišťují  $CD8^+$  T lymfocyty. Navození tohoto typu imunitní odpovědi je však mnohem obtížnější než indukce protilátkové imunitní odpovědi vzhledem k rozdílnému způsobu prezentace exogenních a endogenních antigenů. K indukci imunitní odpovědi pomocí  $CD8^+$  cytotoxických T lymfocytů je nezbytné dopravit příslušný antigen do cytozolu APC, kde dojde k jeho degradaci v proteazómu a prezentaci na MHC gp I. Pro tyto účely jsou využívány DNA vakcíny (Peng *et al.*, 2006) nebo živé vektory, jako např. poxviry (Mastrangelo *et al.*, 2000; Pincus *et al.*, 1995) či oslabené bakterie, např. *Salmonella typhimurium* (Wedemeyer *et al.*, 2001) či *Listeria monocytogenes* (Rayevskaya *et al.*, 2001). Atraktivní možností je využití bakteriálních proteinů, jako např. antraxového toxoidu, Shiga toxoidu nebo adenylátcyklázového toxoidu *B. pertussis*, které jsou schopné přenést peptidy nebo proteiny do cytozolu buněk prezentujících antigen a indukovat cytotoxické T lymfocyty (Ballard *et al.*, 1996; Fayolle *et al.*, 1996; Haicheur *et al.*, 2000; Simsova *et al.*, 2004).

#### 2.3.2.2. Využití ACT pro dopravu cizorodých epitopů do buněk prezentujících antigen a k indukci specifických buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí

Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* je vhodným nástrojem pro dopravu cizorodých epitopů do buněk prezentujících antigen, protože na jejich povrchu rozeznává specifický proteinový receptor integrin  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18) (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2001) a je schopen přenést svou adenylátcyklázovou doménu přes plazmatickou membránu do cytozolu cílové buňky (Guermonprez *et al.*, 1999). Cizorodé epitopy vložené do adenylátcyklázové domény tak mohou být prezentovány na MHC gp I a *in vivo* indukovat specifickou  $CD8^+$  cytotoxickou odpověď (Obr. 18).



**Obr. 18: Dva různé způsoby prezentace cizorodých epitopů vložených do ACT na povrchu antigen prezentujících buněk a indukce buněčně zprostředkovaných imunitních odpovědí.**

Zeleně označené šipky znázorňují dráhu, která vede k vystavení vloženého epitopu v ACT na molekulách MHC gp I a k aktivaci cytotoxických  $CD8^+$  T lymfocytů. Cizorodý epitop (červený kosočtverec), jež byl vložen do adenylacyklázové (AC) domény toxinu, je společně s AC doménou přenesen do cytozolu. V cytozolu dochází k štěpení AC domény v proteazómu a k uvolnění epitopu, který je transportován do endoplazmatického retikula a navázán na MHC gp I. Komplex MHC gp I a epitopu je vystaven na povrchu antigen prezentujících buněk a stimuluje antigenně specifickou imunitní odpověď cytotoxických  $CD8^+$  T lymfocytů.

Červeně označené šipky znázorňují dráhu, která vede k vystavení vloženého epitopu (žlutý kosočtverec) v molekule ACT na MHC gp II a k aktivaci pomocných  $CD4^+$  T lymfocytů. ACT s vloženým epitopem vstupuje do endocytické dráhy (závislé na klatrinu) a dostává se do endozómu. Po fúzi endozómu s lyzozómem dochází k tvorbě tzv. pozdního endozómu, ve kterém je ACT rozštěpen. Poté dochází ke spojení pozdního endozómu a transportního váčku z Golgiho aparátu, který obsahuje molekuly MHC gp II, jež naváží uvolněný epitop. Komplexy MHC gp II s epitopem jsou vystaveny na povrchu antigen prezentujících buněk, kde aktivují pomocné  $CD4^+$  T lymfocyty. Upraveno podle Simsova *et al.*, 2004.

V rámci adenylátcyklázové domény bylo identifikováno několik míst, do nichž lze vložit cizorodé epitopy bez ztráty biologické aktivity vzniklého rekombinantního toxinu (Šebo *et al.*, 1995). Velikost vloženého inzertu může dosahovat až 206 aminokyselin (Gmira *et al.*, 2001; Simsova *et al.*, 2004). Rekombinantní toxiny nesoucí virový CD8<sup>+</sup> T buněčný epitop z LCMV (Lymphocytic ChorioMeningitis Virus) nebo virový CD8<sup>+</sup> epitop z oblasti V3 gp 120 viru HIV byly *in vitro* i *in vivo* úspěšně použity k indukci specifické odpovědi cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Fayolle *et al.*, 1996; Šebo *et al.*, 1995). Rovněž vložení modelového CD8<sup>+</sup> T buněčného epitopu z ovalbuminu vedlo k indukci silné odpovědi cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Osicka *et al.*, 2000). Podobné výsledky byly dosaženy s geneticky detoxifikovanými molekulami ACT, které obsahovaly modelový polyepitop složený ze tří různých CD8<sup>+</sup> T buněčných epitopů odvozených z LCMV, HIV a ovalbuminu (Fayolle *et al.*, 2001). Po imunizaci myši těmito toxoidy došlo k indukci specifické odpovědi cytotoxických CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů proti každému z epitopů (Fayolle *et al.*, 2001). Navíc imunizované myši byly chráněny proti infekci virulentním kmenem LCMV, který zabil neimunizované myši během sedmi dnů (Fayolle *et al.*, 2001). Imunizace pomocí ACT může rovněž chránit proti nádorům, protože ACT s vloženým CD8<sup>+</sup> T buněčným epitopem z ovalbuminu ochránil myši proti letálním dávkám transplantovaných nádorových buněk exprimujících ovalbumin a také vedl k potlačení již vzniklých nádorů (Fayolle *et al.*, 1999). Možnost využít ACT v terapii nádorových onemocnění podporují také výsledky dalších studií. ACT s vloženým epitopem z melanomu stimuloval indukci specifické odpovědi cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Dadaglio *et al.*, 2003) a použití ACT s vloženým epitopem lidského papilomaviru HPV 16 vedlo jak k potlačení, tak k zabránění tvorby nádorů indukovaných papilomavirem HPV 16 (Mackova *et al.*, 2006; Preville *et al.*, 2005).

Kromě stimulace specifické CD8<sup>+</sup> cytotoxické odpovědi, která je závislá na prezentaci epitopů na MHC gp I, mohou být epitopy vložené do ACT prezentovány také na MHC gp II a následně stimulovat specifickou CD4<sup>+</sup> T buněčnou odpověď (Obr. 18). Součástí této dizertační práce byla konstrukce a purifikace toxoidů ACT nesoucích modelový CD4<sup>+</sup> T buněčný epitop z bakteriálního proteinu *E. coli* MalE (protein vážící maltózu). Ve spolupracující laboratoři Dr. Claude Leclerc (Institut Pasteur, Francie) byla u připravených konstruktů studována jejich schopnost stimulovat specifickou CD4<sup>+</sup> T buněčnou odpověď. V rámci molekuly ACT tak bylo nalezeno šest různých míst, ve kterých vložený modelový CD4<sup>+</sup> epitop indukoval *in vitro* silnou CD4<sup>+</sup> T buněčnou odpověď (Loucka *et al.*, 2002).

ACT je rovněž možné využít pro stimulaci CD8<sup>+</sup> cytotoxické odpovědi a CD4<sup>+</sup> T buněčné odpovědi zároveň. ACT toxoid obsahující CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T buněčný epitop indukoval *in vitro* jak specifickou CD4<sup>+</sup> Th1 buněčnou odpověď, tak i specifickou CD8<sup>+</sup> cytotoxickou T buněčnou odpověď (Schlecht *et al.*, 2004). Indukce obou typů buněčně zprostředkované imunitní odpovědi zároveň představuje důležitý předpoklad pro terapii některých nádorových a infekčních onemocnění. V nedávné době bylo skutečně potvrzeno, že ACT může indukovat *in vivo* (u myši) jak CD4<sup>+</sup> Th1 buněčnou odpověď tak odpověď cytotoxických CD8<sup>+</sup> T lymfocytů namířenou proti nádorům a virům (Mascarell *et al.*, 2005; Preville *et al.*, 2005), což ukazuje, že ACT je velmi slibný kandidát pro přípravu preventivních i terapeutických vakcín. Kromě toho byl ACT úspěšně využit pro specifickou stimulaci T buněk *in vitro*, a tak zvýšení citlivosti diagnostického testu na přítomnost bakterie *Mycobacterium bovis* u hovězího dobytka (Vordermeier *et al.*, 2004) nebo bakterie *Mycobacterium tuberculosis* u lidí (Wilkinson *et al.*, 2005), jež mají latentní tuberkulózu.

### 3. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

#### **3.1. Studium oligomerizace adenylátcyklázového toxinu v membráně erytrocytů**

Existuje řada nepřímých důkazů, jež naznačují, že adenylátcyklázový toxin (ACT) tvoří póry v membráně cílových buněk až po oligomerizaci několika molekul toxinu.

Cílem této části dizertační práce bylo:

- 1) Testovat existenci oligomerů ACT v membráně jejich přímou detekcí.
- 2) Izolovat oligomery ACT z membrány.
- 3) Zjistit, zda tvorba oligomerů hraje roli v hemolytické aktivitě ACT.

#### **3.2. Příprava sady rekombinantních ACT nesoucích specifický CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop**

Cílem této části dizertační práce bylo zjistit, zda ACT může přenášet CD4<sup>+</sup> T-buněčné epitopy na MHC gp II a indukovat příslušnou imunitní odpověď pomocných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů. K tomu bylo zapotřebí zkonstruovat, purifikovat a provést biochemickou charakterizaci sady rekombinantních ACT nesoucích specifický CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop.

Připravené toxoidy ACT byly poté testovány ve spolupracující laboratoři Dr. Claude Leclerc (Institut Pasteur, Francie).

## 4. MATERIÁLY A METODY

### 4.1. Seznam použitých chemikálií a materiálů

Adenozin-3',5'-(cyklický) monofosfát (cAMP), Amersham, USA; adenozin-5'-trifosfát (ATP), Amersham, USA; avidin-agaróza, Boeringher-Mannheim, SRN; [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, Amersham, USA; [2,8- $^3$ H]cAMP, Amersham, USA; Coomassie Brilliant blue G250, Serva, SRN; Coomassie Brilliant blue R250, Serva, SRN; D-biotin, Sigma; DEAE-sepharóza, Sigma, USA; DNA Lego Kit o složení: vazebný pufr, DNA-vazebné částice, promývací pufr, Top Bio, Česká republika; dNTP mix, MBI Fermentas, Litva; dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN; ethidiumbromid, Serva, SRN; fosfatidylcholin (PC) z vaječného žloutku, Sigma, USA; formvar, Serva, SRN; glutaraldehyd, Merck, SRN; hovězí sérový albumin (BSA), Sigma, USA; chlorid sodný, Lachema, Brno; chlorid vápenatý, Lachema, Brno; cholesterol, Sigma, USA; polyvinyliden fluorid (PVDF) membrána, Amersham, USA; izopropyl  $\beta$ -D-thiogalaktopyranozid (IPTG), Sigma, USA; jodacetamid, Sigma, USA; kalmodulin (CaM), Sigma, USA; kapalný scintilátor, Amersham, USA; Kodak Electron Microscope film 4489; kolony PD-10, Pharmacia, Švédsko; kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Lachema, Brno; kyselina chlorovodíková, Lachema, Brno; kyselina N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethansulfonová (HEPES), Sigma, USA; 2-merkaptoetylamin-1,4-diazabicyklo-2,2,2-oktan (DABCO), Sigma, USA; methyl- $\beta$ -cyclodextrin, Sigma, USA; močovina, Lachema, Brno; n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Merck, SRN; nosné síťky SPI-grids, West-Chester, PA, USA, oxid hlinitý, Merck, SRN; phenyl-sepharóza, Sigma, USA; poly-L-lysin, Sigma, USA; sfingomyelin (SM) z vaječného žloutku, Sigma, USA; Sulfo-NSH-LC-biotin, Pierce, USA; tris(hydroximetyl)aminomethan (Tris), Serva, SRN; tris(hydroxymetyl)aminometanhydrochlorid (Tris-HCl) Serva, SRN; triton X-100, Amersham, USA; trypsin inhibitor, Sigma, USA; tween 20, Sigma, USA; uranylacetát (UA), BDH Chemicals Ltd Poole, England.

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

#### 4.1.1. Použité protilátky

- monoklonální protilátka anti-FLAG M2, Sigma, USA
- monoklonální protilátky 9D4, 3D1 a 10A8 proti adenylátcyklázovému toxinu (Lee *et al.*, 1999) laskavě poskytl Dr. Erik Hewlett, Charlottesville, USA



- anti-myší IgG konjugovaný s křenovou peroxidázou (IgG/HRP), Bio-Rad Laboratories, USA
- anti-myší IgG konjugovaný s fluoresceinizothiokyanátem (IgG/FITC), Sigma, USA
- anti-myší IgG konjugovaný s Cy3 (IgG/Cy3), Sigma, USA
- streptavidin konjugovaný s křenovou peroxidázou (STR/HRP), Sigma, USA
- anti-myší IgG s navázanou partikulí kolidního zlata (5 nm), Sigma, USA
- protein A s navázanou partikulí kolidního zlata (5 nm) laskavě poskytl Dr. Jan Slot, University Medical Center Utrecht, Holandsko
- anti-cAMP králičí polyklonální protilátku laskavě poskytla Dr. Agnes Ullmann, Institut Pasteur, Francie
- anti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou, Amersham, USA

#### 4.1.2. Použité restriční endonukleázy a ostatní enzymy

Seznam použitých restričních endonukleáz je uveden v Tabulce II.

Enzym	Zásahové místo	Výrobce	Typ pufru NEB <sup>a</sup>	Reakční teplota (°C)	0,01% BSA	0,01% Triton X-100
<i>Age</i> I	A ACGGT	NEB, USA	1, 2, 3,	25	ne	ne
<i>Bsr</i> G I	T GTACA	NEB, USA	2, 4	37	ano	ne
<i>Bsa</i> A I	YAC GTR	NEB, USA	3	37	ne	ne
<i>Cla</i> I	AT CGAT	Amersham, USA	4	37	ano	ne
<i>Eco</i> R V	GAT ATC	Amersham, USA	2, 3	37	ano	ne
<i>Hind</i> III	A AGCTT	Amersham, USA	2	37	ne	ne
<i>Nco</i> I	C CATGG	NEB, USA	1, 2, 3, 4	37	ne	ne
<i>Nde</i> I	CA TATG	Amersham, USA	2, 4	37	ne	ne
<i>Nsp</i> I	RCATG Y	NEB, USA	4	37	ano	ano
<i>Pst</i> I	CTGCA G	Amersham, USA	2, 4	37	ne	ne
<i>Xho</i> I	C TCGAG	Amersham, USA	2, 3, 4	37	ano	ne

<sup>a</sup>Složení NEB pufru (New Englet BioLabs, USA) použitých pro štěpení restričními endonuleázami je uvedené v kapitole 4.3.1.

Ostatní enzymy:

- T4 DNA-polymeráza, Amersham Pharmacia Biotech, USA;
- T4 DNA-ligáza, MBI Fermentas, Litva;
- trypsin, Sigma, USA

#### 4.1.3. Použité bakteriální toxiny

- V této dizertační práci byl používán rekombinantní adenylátcyklázový toxin (ACT) bakterie *Bordetella pertussis*. Jeho exprese a purifikace je popsána v kapitole 4.5.
- $\alpha$ -toxin bakterie *Staphylococcus aureus* laskavě poskytl prof. Sucharit Bhakdi, University Mainz, SRN.

#### 4.1.4. Použité standardy molekulových hmotností proteinů

- Standard pro určení relativní molekulové hmotnosti proteinů analyzovaných na SDS-PAGE o složení: myozin (200 kDa),  $\beta$ -galaktosidáza (116 kDa), fosforyláza b (97 kDa), BSA (66 kDa) a ovalbumin (45 kDa). Bio-Rad Laboratories Inc., USA.
- Biotinylovaný standard pro určení molekulové hmotnosti proteinů (do 200 kDa) analyzovaných na SDS-PAGE a detekovaných metodou Western blot složený z proteinů o velikostech: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 140, 200 kDa. Cell Signaling Technology, USA.
- Standard pro určení molekulové hmotnosti velkých proteinů analyzovaných za nativních podmínek o složení: thyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), kataláza (232 kDa), laktát dehydrogenáza (140 kDa) a albumin (66 kDa). Amersham, USA.



## 4.2. Přístrojové vybavení

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad Laboratories; Elektroforéza Hoeffer Mighty Small II SE 260, Amersham, USA; Elektronový mikroskop Philips CM 100 vybavený širokouhlou CCD kamerou Gatan-673 a COMPUSTAGE, Holandsko; Elektronový mikroskop Philips CM 12/STEM, Holandsko; konfokální mikroskop Leica TCS NT; LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System), Fuji, Japonsko; Optický mikroskop ZEISS NfpK, NDR; odstředivka Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN; odstředivka Sorvall RT6000B, Du Pont Instruments, USA; odstředivka Sorvall RC5C, Du Pont Instruments, USA; odstředivka Sorvall OTD Combi, Du Pont Instruments, USA; Scintilační kapalinový počítač WALLAC 1410, Pharmacia, Švédsko; Spektrofotometr SECOMAM S.2501+, ALC-SECOMAM, Francie; systém pro vizualizaci, analýzu a dokumentaci gelů, Ultra-Lum, Kanada; Ultrasonikátor 3000, MISONIX Inc., USA; Vysokovakuové napařovací zařízení Balzers-BAF 301 s freeze etching doplňkem; Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., USA; Zařízení pro DNA elektroforézu, Bio Rad, Inc. USA; Zařízení pro Western blot Semiphor, Hoefler, USA.

## 4.3. Roztoky a kultivační média

### 4.3.1. Roztoky a pufry

◆ **Alsever:** pH 7,4

glukóza.....	2,05% (w/v)
kyselina citrónová.....	0,055% (w/v)
dihydrogencitronan sodný .....	0,683% (w/v)
NaCl.....	0,42% (w/v)

Sterilizace roztoku byla provedena filtrací přes filtry s velikostí pórů 0,45 µm (Millipore).

◆ **Blotovací pufr:** pH 8,3

glycin.....	39 mM
Tris.....	48 mM
SDS.....	0,0375 % (w/v)
methanol.....	20% (w/v)

◆ **Bradfordovo činidlo**

Coomassie Brilliant blue R250.....	0,01% (w/v)
ethanol .....	47% (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	8,7% (v/v)

◆ **Chemiluminiscenční roztoky:**

Roztok A (pH 8,8) byl připraven smícháním 10 ml roztoku 1 a 44 µl roztoku 2.

Roztok 1

luminol (rozpustit v DMSO).....	2,5 mM
Tris-HCl.....	100 mM

Roztok 2

kyselina p-kumarová (rozpustit v DMSO).....	90 mM
---	-------

roztok B (pH 8,5):

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	5,4 mM
Tris-HCl.....	100 mM

Roztoky A a B byly uchovávány při teplotě -20 °C a před detekcí smíchány v poměru 1:1.

◆ **HN pufr:** pH 7,4

HEPES.....	10 mM
NaCl.....	140 mM

◆ **HNE pufr:** pH 7,4

HEPES.....	10 mM
NaCl.....	140 mM
EDTA.....	5 mM

◆ **Kakodylátový pufr:** pH 7,2

kakodylát sodný.....	100 mM
----------------------	--------

Hodnota pH byla upravena pomocí NaOH.

◆ **NEB pufř 1** (10× koncentrovaný): pH 7,0

Tris-HCl.....100 mM  
MgCl<sub>2</sub>.....100 mM  
dithiothreitol .....10 mM

◆ **NEB pufř 2** (10× koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl.....100 mM  
MgCl<sub>2</sub>.....100 mM  
NaCl.....500 mM  
dithiothreitol .....10 mM

◆ **NEB pufř 3** (10× koncentrovaný): pH 7,9

Tris-HCl.....500 mM  
MgCl<sub>2</sub>.....100 mM  
NaCl.....1000 mM  
dithiothreitol .....10 mM

◆ **NEB pufř 4** (10× koncentrovaný): pH 7,9

Tris-acetát .....200 mM  
acetát hořečnatý .....100 mM  
acetát draselný .....500 mM  
dithiothreitol.....10 mM

◆ **PBST**: pH 7,4

NaCl.....138 mM  
KCl.....3 mM  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....12 mM  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2 mM  
tween.....0,05%

◆ **Reakční mix pro stanovení adenylátcyklázové aktivity:**

Tris-HCl (pH 8,0)..... 60 mM  
MgCl<sub>2</sub>..... 7 mM

CaCl <sub>2</sub> .....	0,1 mM
triton X-100.....	0,1 % (v/v)
BSA.....	1 mg/ml
CaM.....	1 μM
cAMP.....	0,1 mM
[2,8- <sup>3</sup> H]cAMP.....	~ 200 CPM/μl
ATP.....	20 mM
[α- <sup>32</sup> P]ATP.....	~ 10 000 – 20 000 CPM/μl

Reakční mix byl uchováván při teplotě – 20 °C.

◆ **Roztok I:** pH 8,0

glukóza.....	50 mM
Tris-HCl.....	25 mM
EDTA.....	10 mM

Sterilizace autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

◆ **Roztok II:**

NaOH.....	0,2 mM
SDS.....	1% (w/v)

◆ **Roztok III:**

5 M octan draselný .....	60 ml
ledová kyselina octová.....	11,5 ml
H <sub>2</sub> O .....	28,5 ml

Roztok III byl uchováván při teplotě 4 °C.

◆ **TB pufr:** pH 6,7

HEPES .....	10 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	15 mM
KCl.....	250 mM

Po upravení pH pomocí 1 M KOH byl do roztoku přidán MnCl<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 55 mM. Sterilizace roztoku byla provedena filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,45 μm.

- ◆ **TBE pufr:** pH 8,3
  - Tris-HCl.....90 mM
  - kyselina boritá.....90 mM
  - EDTA.....2 mM
  
- ◆ **TC pufr:** pH 8,0
  - Tris-HCl..... 50 mM
  - CaCl<sub>2</sub>.....0,2 mM
  
- ◆ **TCT pufr:** pH 8,0
  - Tris-HCl.....50 mM
  - CaCl<sub>2</sub>.....0,2 mM
  - Triton X-100.....0,1% (v/v)
  
- ◆ **TE pufr:** pH 8.0
  - Tris-HCl.....10 mM
  - EDTA.....1 mM
  
- ◆ **TN pufr:** pH 8,0
  - Tris-HCl.....50 mM
  - NaCl.....150 mM
  
- ◆ **TNC pufr:** pH 8.0
  - Tris-HCl.....20 mM
  - NaCl.....150 mM
  - CaCl<sub>2</sub>.....2 mM
  
- ◆ **TNE pufr:** pH 8.0
  - Tris-HCl.....20 mM
  - NaCl.....150 mM
  - EDTA.....2 mM

◆ **UTCT pufr:** pH 8,0

Močovina.....	8 M
Tris-HCl.....	50 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	0,2 mM
Triton X-100.....	0,1% (v/v)

◆ **UTE pufr:** pH 8,0

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

◆ **UTE-A pufr:** pH 8,0

Močovina.....	4 M
Tris-HCl.....	50 mM
EDTA.....	2 mM

◆ **UTN-A pufr:** pH 8,0

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

◆ **UTN-B pufr:** pH 8,0

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

◆ **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:**

Tris-HCl.....	50 mM
DTT .....	100 mM
SDS.....	2 % (w/v)
Bromfenolová modř.....	0,1 % (w/v)
Glycerol .....	10 % (v/v)

Roztok byl uchováván zamražený při teplotě -20 °C. Před použitím byl přidán 2-merkптоethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

### 4.3.2. Kultivační média

#### 4.3.2.1. Tekutá kultivační média

♦ **LB médium (Luria-Bertani medium):**

bakto-trypton .....	10 g
kvasničný extrakt .....	5 g
NaCl .....	10 g
deionizovaná voda .....	ad 1000 ml

Sterilizace autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

♦ **MDO médium: pH 7,0**

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

Sterilizace autoklávováním při teplotě 121 °C po dobu 20 minut.

♦ **SOB médium:**

bakto-trypton .....	20 g
kvasničný extrakt .....	5 g
NaCl .....	0,6 g
KCl .....	0,2 g
deionizovaná voda .....	ad 990 ml

Sterilizace autoklávováním (121 °C, 20 minut). Poté byl přidán k 10 ml sterilního roztoku MgCl<sub>2</sub> a MgSO<sub>4</sub> do výsledné koncentrace 1 mM.

#### 4.3.2.2. Pevná kultivační média

##### **LB médium s ampicilinem nebo tetracyklinem:**

K LB médiu (4.3.2.) byl před sterilizací přidán bakteriologický agar (18 g/l). Po sterilizaci bylo do vychlazeného média přidáno antibiotikum ampicilin (150 µg/ml) nebo tetracyklin (12,5µg/ml) a médium bylo nalito na Petriho misky. Připravené agarové plotny s LB mediem byly uchovávány při teplotě 4 °C.

## **4.4. Genetické metody**

### 4.4.1. Použité plazmidy

Plazmid pT7CACT1 (Osicka *et al.*, 2000) o velikosti 8,8 kb nese gen *cyaA* kódující ACT a gen *cyaC* kódující protein nezbytný pro posttranslační modifikaci ACT mastnou kyselinou. Oba geny jsou pod kontrolou inducibilního *lac* promotoru. Tento plazmid nese gen pro rezistenci k ampicilinu. Plazmid byl používán pro produkci nemutované verze ACT a pro přípravu mutantních proteinů ACT/MalE v *E. coli*.

Plazmid pT7CACT1-447FLAG (Osicka *et al.*, 2000) je odvozen od plazmidu pT7CACT1. Do genu *cyaA* tohoto plazmidu byl vložen za 233. aminokyselinu oligonukleotid kódující epitop FLAG o aminokyselinovém složení DYKDDDDK. Plazmid byl používán pro produkci ACT/233FLAG v *E. coli*.

Plazmid pCACT3 (Betsou *et al.*, 1993) o velikosti 8,8 kb nese gen *cyaA* kódující ACT pod kontrolou inducibilního *lac* promotoru a gen *cyaC* kódující protein nezbytný pro posttranslační modifikaci ACT mastnou kyselinou, který je rovněž pod kontrolou *lac* promotoru. Plazmid nese gen pro rezistenci k ampicilinu a byl používán pro produkci nemutované verze ACT a mutant ACT-E581K a ACT-E570K+E581P v *E. coli*.

Plazmid pK7Km<sup>R</sup> o délce 4,1 kb je derivát plazmidu pTZ19R-BamH I (Institut Pasteur, Francie), do kterého byla vložena mutagenizační kazeta z plazmidu pUC4K (Pharmacia, USA). Plazmid pK7Km<sup>R</sup> byl sestaven v naší laboratoři a nese gen pro ampicilinovou a kanamycinovou rezistenci. Mutagenizační kazeta tohoto plazmidu byla používána pro inzerci unikátního zásahového místa pro restriční endonukleázu BsrG I do genu *cyaA* (Osicka *et al.*, 2000).



#### 4.4.2. Použité bakteriální kmeny

Pro expresi ACT byl používán bakteriální kmen *Escherichia coli* XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup> ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>)]*) nesoucí rezistenci k tetracyklinu (Stratagene, USA).

#### 4.4.3. Uchovávání bakteriálních kmenů

Kmen *Escherichia coli* XL1-Blue byl krátkodobě uchováván na Petriho miskách s pevným LB médiem s tetracyklinem. Dlouhodobě byl uchováván v glycerolu při teplotě -80 °C (40% glycerol byl smíchán s kulturou narostlou do stacionární fáze v příslušném tekutém médiu v poměru 1:1). Bakteriální kmen vzniklý transformací příslušné plazmidové DNA do kompetentních buněk *Escherichia coli* byl krátkodobě uchováván na Petriho miskách s pevným médiem při teplotě 4 °C s příslušnými antibiotiky.

#### 4.4.4. Příprava kompetentních buněk *Escherichia coli*

Z čerstvě narostlých kolonií *E. coli* XL-1 Blue na tuhém LB médiu s tetracyklinem byly přeneseny 2-3 kolonie do SOB média (4.3.2.). Kultivace bakterií probíhala při teplotě 19 °C, po dosažení optické hustoty  $OD_{600} = 0,6$  byla bakteriální kultura prudce ochlazená v lázni voda - led a centrifugována (6000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk *E. coli* resuspendován v 16 ml ledového TB pufru (4.3.1.). Následovala inkubace buněčné suspenze v lázni voda - led po dobu 10 minut a opětovná centrifugace buněk (6000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru. K buněčné suspenzi bylo přidáno DMSO do koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v lázni voda - led (10 minut) byla buněčná suspenze rozdělena po 200  $\mu$ l do mikrozkušavek a zamražena v tekutém dusíku. Takto připravené superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -80 °C.

#### 4.4.5. Izolace plazmidové DNA metodou alkalické lýze

Celkový objem 2 ml LB média (4.3.2.) s příslušným antibiotikem byl zaočkován jednou čerstvě narostlou bakteriální kolonií. Po 12 až 14 hodinové kultivaci, která probíhala za intenzivního třepání při teplotě 37 °C, byly bakteriální buňky odděleny centrifugací (12 000 g, 30 vteřin, 25 °C) a resuspendovány ve 100 µl roztoku I (4.3.1.). Poté byly bakterie lyzovány přidavkem 200 µl roztoku II (4.3.1.), šetrně zamíchány a umístěny na 5 minut do ledu. K lyzovaným buňkám bylo přidáno 150 µl roztoku III (4.3.1.), jenž byl předem vytemperován na 4 °C, celý obsah byl promíchán a umístěn na 15 minut do ledu. Centrifugací (12 000 g, 15 minut, 4 °C) byly odstraněny zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromozomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a k supernatantu byl přidán stejný objem izopropanolu. Srážení plazmidové DNA probíhalo při teplotě 4 °C po dobu 10 minut. Po centrifugaci (12 000 g, 15 minut, 4 °C) byl pelet sražené DNA promyt 1 ml 70% ethanolu. Mikrozkušavka s peletem byla sušena na vzduchu po dobu 10 minut. Poté byl pelet rozpuštěn ve 40 µl TE pufru pH 8 (4.3.1.) s termostabilní pankreatickou RNázou (20 µg/ml) a směs byla inkubována 30 minut při teplotě 70 °C. Plazmidová DNA byla uchovávána při teplotě -20 °C.

#### 4.4.6. Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

K plazmidové DNA (1 µl, přibližně 0,4 µg DNA) byla na ledu přidána suspenze kompetentních buněk *E. coli* (100 µl) (4.4.4.). V případě manipulace s DNA získanou ligací (4.4.7.4.) bylo použito 100 µl kompetentních buněk přidaných k 10 µl směsi DNA. Směs byla šetrně zamíchána a umístěna na 30 minut do ledu, poté byla po dobu 5 minut inkubována při teplotě 37 °C a znovu umístěna do ledu na 2 minuty. Nakonec bylo ke směsi přidáno 0,9 ml tekutého LB média (4.3.2.) předem vytemperovaného na 37 °C a kultura byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C. Na tuhé LB médium s ampicilinem (4.3.2.2.) bylo vyseto 50 µl bakteriální kultury a buňky *E. coli* byly kultivovány do druhého dne (37 °C, 16 až 20 hodin).

#### 4.4.7. Manipulace s plazmidovou DNA

##### 4.4.7.1. Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami

K objemu 5  $\mu$ l plazmidové DNA (přibližně 2  $\mu$ g DNA) byly přidány 2  $\mu$ l příslušného 10 $\times$  koncentrovaného pufru NEB a požadovaných doplňků (4.1.2), tj. 2  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného BSA a/nebo 2  $\mu$ l 0,1% Triton X-100. Směs byla doplněna do objemu 20  $\mu$ l deionizovanou vodou. K promíchané směsi byla přidána 1 jednotka (U) požadované restrikční endonukleázy a směs byla inkubována 2 hodiny v lázni o teplotě vhodné pro danou restrikční endonukleázu (4.1.2.).

##### 4.4.7.2. Parciální štěpení plazmidové DNA restrikční endonukleázou

Nejdříve byla připravena směs obsahující 12  $\mu$ l plazmidu, 5  $\mu$ l příslušného 10 $\times$  koncentrovaného pufru NEB, 5  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného BSA a 28  $\mu$ l deionizované vody. Z této směsi bylo celkem 4 $\times$  odebráno vždy po 12  $\mu$ l do samostatné mikrozkušavky. Dále byla připravena směs obsahující 100  $\mu$ l příslušného 10 $\times$  koncentrovaného pufru NEB, 100  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného BSA, 799  $\mu$ l deionizované vody a 1  $\mu$ l restrikční endonukleázy. Do první mikrozkušavky s plazmidovou DNA bylo přidáno 20  $\mu$ l směsi s restrikční endonukleázou, do druhé 15  $\mu$ l, do třetí 8  $\mu$ l a do poslední 3  $\mu$ l a obsah všech mikrozkušavek byl promíchán. Reakční směsi byly inkubovány 30 minut při teplotě 37  $^{\circ}$ C a poté byla reakce v každé z nich zastavena inaktivací restrikční endonukleázy inkubací při teplotě 70  $^{\circ}$ C po dobu 20 minut. Vzniklé fragmenty byly analyzovány elektroforézou v agarózovém gelu (4.4.8).

##### 4.4.7.3. Zatupení kohezních konců fragmentů plazmidové DNA

K objemu 20  $\mu$ l směsi plazmidové DNA, která byla štěpena restrikčními endonukleázami (4.4.7.1), byl přidán 1  $\mu$ l 10 $\times$  koncentrovaného pufru NEB 4, 0,5  $\mu$ l 4 mM dNTP, 7,5  $\mu$ l deionizované vody a 1  $\mu$ l T4 DNA polymerázy. Po promíchání byla směs inkubována po dobu 30 minut při teplotě 12  $^{\circ}$ C.

#### 4.4.7.4. Ligace fragmentů DNA

K 5  $\mu\text{l}$  plazmidové DNA, která byla získána štěpením restriční endonukleázou (4.4.7.1) byly přidány 3  $\mu\text{l}$  10 $\times$  koncentrovaného ligačního pufru a 2  $\mu\text{l}$  roztoku rozpuštěných syntetických oligonukleotidů (4.4.10.), případně 5  $\mu\text{l}$  jiné plazmidové DNA, která byla také získána štěpením restriční endonukleázou. Směs byla doplněna do 29  $\mu\text{l}$  deionizovanou vodou, zamíchána a poté byl přidán 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA ligázy (5 U). Směs byla inkubována po dobu 12 hodin při laboratorní teplotě.

#### 4.4.8. Elektroforéza v agarózovém gelu

Nejprve byl připraven agarózový gel, jehož koncentrace byla zvolena podle velikosti rozdělovaných fragmentů DNA. Standardně byl používán 0,6% agarózový gel. Pro rozdělení fragmentů DNA o velikosti zhruba 200 až 1 000 bp byl používán 1% agarózový gel a pro fragmenty DNA o velikosti zhruba 8 000 bp byl používán 0,4% agarózový gel. Příslušné množství agarózy bylo smícháno s 1 l TBE pufru a suspenze byla povařena až do úplného rozpuštění agarózy. Poté byl k agaróze přidán ethidiumbromid do výsledné koncentrace 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a agarózový roztok byl nalit do nosné aparatury. Na každý gel byly nanесeny kromě vzorků s DNA také standardy o známých hodnotách velikostí fragmentů. V našem případě byla použita  $\lambda$  DNA štěpená restriční endonukleázou *Pst I*. Dělení vzorků probíhalo 2 hodiny při vloženém napětí 5 V/cm v TBE pufru. Rozdělené fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV lampou a obraz gelu byl zaznamenán pomocí dokumentačního systému Ultra-Lum.

#### 4.4.9. Izolace fragmentu plazmidové DNA z agarózového gelu pomocí Legu kitu

Příslušná část agarózového gelu s požadovaným fragmentem plazmidové DNA (4.4.8.) byla vyříznuta a smíchána s trojnásobným objemem vazebného pufru pro DNA. Poté byl gel s DNA-vazebným pufrem inkubován při teplotě 55  $^{\circ}\text{C}$  do té doby, než došlo k rozpuštění gelu. Mezitím byla připravena minikolonka s partikulemi vážícími DNA. Pomocí vakuové pumpy byl z minikolonky odstraněn roztok, ve kterém byly partikule uchovávány. Na minikolonku byl nanесen vzorek s fragmentem DNA a vazebný pufr

s agarózou byl odstraněn. Partikule s navázaným fragmentem DNA byly dvakrát promyty 1 ml promývacího roztoku a minikolonky byly přeneseny do zkumavek a centrifugovány (12 000 g, 2 min, 23 °C). Tímto způsobem došlo k úplnému odstranění promývacího roztoku z minikolonky. Na minikolonku bylo nanášeno 50 µl TE pufru o teplotě 50 °C a fragment DNA byl eluován odstředěním minikolonky při 12 000 g po dobu 1 minuty.

#### 4.4.10. Konstrukce mutantních proteinů ACT/MalE

Jednotlivé deriváty plazmidů pT7CACT1, které nesly v genu *cyaA* oligonukleotid kódující unikátní restrikční místo *BsrG I* byly pomocí této restrikční endonukleázy linearizovány (4.4.7.1) a následně pomocí T4 DNA ligázy recirkularizovány s příslušným vybraným dvouvláknovým oligonukleotidem, který kódoval epitop MalE (viz Tabulka III). Vkládané oligonukleotidy byly navrženy tak, aby po inzerci oligonukleotidu bylo zrušeno původní *BsrG I* restrikční místo a vzniklo nové restrikční místo *HindIII*. Ligace linearizovaného plazmidu s oligonukleotidem probíhala v přítomnosti *BsrG I* restrikčního enzymu (2 U/µl), čímž bylo zajištěno to, že během ligace nedocházelo ke zpětné recirkularizaci původního plazmidu bez inzertu.

<b>Tabulka III</b>	
<b>Seznam použitých oligonukleotidů pro vložení sekvence kódující epitop MalE do <i>cyaA</i> genu</b>	
Sekvence vkládaného oligonukleotidu <sup>a</sup>	
1.	5'-GTACCA <b>ACGGCAAGCTT</b> ATCGCCTACCCCATCGCCGTGGAGGCCCTAAGCG-3' 5'-GTACCGCTTAGGGCCTCCACGGCGATGGGGTAGGCGATAAGCTTGCCGTTG-3'
2.	5'-GTA <b>CTGAACGGCAAGCTT</b> ATCGCCTACCCCATCGCCGTGGAGGCCCTGAGC-3' 5'-GTACGCTCAGGGCCTCCACGGCGATGGGGTAGGCGATAAGCTTGCCGTTCA-3'
3.	5'-GTACGGCA <b>ACGGCAAGCTT</b> ATCGCCTACCCCATCGCCGTGGAGGCCCTGTC-3' 5'-GTACG <b>ACAGGGCCTCCACGGCGATGGGGTAGGCGATAAGCTTGCCGTTGCC</b> -3'
<sup>a</sup> Sekvence kódující epitop MalE je vyznačena tučným písmem, sekvence vloženého nového restrikčního místa je zvýrazněna šedě.	

Po ligaci byla směs transformována (4.4.6.) do kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.4.4.) a transformanty byly selektovány na agarových LB plotnách s tetracyklinem a ampicilinem (4.3.2.2.). Z mnoha vyrostlých kolonií bylo vybráno několik, které pak byly

podrobeny minipreparaci plazmidové DNA (4.4.5.). Inzerce oligonukleotidu byla ověřena restriční analýzou (4.4.7.1) izolované plazmidové DNA. Po následné elektroforéze v 0,6 % agarózovém gelu (4.4.8.) byly vybrány pouze ty plazmidy, u kterých došlo k vložení oligonukleotidu. Inzerce epitopu MalE byla ověřena DNA sekvenováním příslušné části genu *cyaA* (4.4.12).

#### 4.4.11. Detoxifikace ACT/MalE proteinů

Zrušení enzymatické aktivity jednotlivých ACT/MalE proteinů bylo provedeno vložím dipeptidu CysThr do ATP vazebného místa v AC doméně mezi aminokyselinové zbytky 188 a 189. V genu *cyaA* na plazmidu pT7CACT1 je právě za 188. aminokyselinou restriční místo pro *EcoR V*. Vzhledem k tomu, že toto restriční místo se na plazmidu nachází ve dvou kopiích, byly ověřené deriváty plazmidů pT7CACT1, které nesly gen *cyaA* s vloženým oligonukleotidem kódující epitop MalE, parciálně štěpeny restriční endonukleázou *EcoR V* (4.4.7.2). Směs štěpených plazmidů byla elektroforeticky rozdělena v 0,4% agarózovém gelu (4.4.8.), ze kterého byl následně izolován linearizovaný plazmid (4.4.9.). Restričním štěpením endonukleázou *EcoR V* vznikly po stranách štěpeného plazmidu tupé konce. V druhém kroku byla z vektoru pK7KmR pomocí *Nsp I* restričního enzymu vyštěpena mutagenizační kazeta, která obsahovala gen pro rezistenci ke kanamycinu. Ke směsi štěpené DNA byla přidána T4 DNA polymeráza spolu s dNTP a vzniklé kohezní konce vektoru pK7KmR byly zatupeny (4.4.7.3.). Fragmenty vektoru pK7Km<sup>R</sup> byly elektroforeticky rozděleny na 0,6% agarózovém gelu (4.4.8.) a mutagenizační kazeta se zatupenými konci byla izolována (4.4.9.). Po izolaci byl za přítomnosti T4 DNA ligázy linearizovaný plazmid pT7CACT1/*cyaA*-MalE spojen s mutagenizační kazetou (4.4.7.4.). Ligační směs byla transformována (4.4.6.) do kompetentních buněk *E.coli* XL-1 Blue (4.4.4.) a transformanty byly selektovány na agarové plotně s tetracyklinem, ampicilinem a kanamycinem (4.3.2.2.). Z narostlých transformant byla izolována plazmidová DNA (4.4.5.). Protože po obou stranách vkládané kanamycinové kazety bylo jedno zásahové místo pro restriční enzym *BsrG I*, mohla být pomocí tohoto enzymu kanamycinová kazeta z plazmidu vyštěpena (4.4.7.1). Tím vznikly dva fragmenty DNA, které byly odděleny elektroforézou v 0,6% agarózovém gelu (4.4.8.). Z gelu byl izolován linearizovaný plazmid (4.4.9.), který byl za přítomnosti T4 DNA ligázy recirkularizován (4.4.7.4) spojením svých komplementárních konců, které vznikly

štěpením restrikčním enzymem *BsrG I*. Ligační směs byla transformována (4.4.6.) do kompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.4.4.) a bakterie byly selektovány na agarových plotnách s ampicilinem. Z narostlých transformant byla izolována plazmidová DNA (4.4.5.). Byly vybrány takové klony, u kterých zůstalo po vyštěpení mutagenizační kazety zabudováno restrikční místo pro enzym *BsrG I*. Vzhledem k tomu, že původní plazmid pT7CACT1 obsahoval dvě restrikční místa *EcoR V*, do kterých byla vkládána mutagenizační kazeta, mohlo být nové restrikční místo *BsrG I* vloženo do dvou různých pozic. Pomocí restrikční analýzy byly proto vybrány pouze ty konstrukty, u kterých došlo k vložení *BsrG I* místa pouze mezi kodony 188 a 189.

#### 4.4.12. Sekvence plazmidové DNA

Plazmidová DNA určená k sekvenaci byla izolována pomocí kitu NucleoSpin (Macherey-Nagel GmbH, SRN) nebo pomocí kitu QIAprep (QIAGEN GmbH, SRN). Sekvence byla provedena Sangerovou metodou kombinovanou s technikou cyklického sekvenování. Tato část práce byla provedena v servisní laboratoři MBÚ AV ČR Dr. J. Felsberga.

Pro ověření inserce epitopu MalE byla do příslušné části genu *cyaA* byly použity primery uvedené v Tabulce IV.

<b>Tabulka IV: Sekvence oligonukleotidů použitých pro ověření inserce epitopu MalE do genu <i>cyaA</i></b>	Pozice vložení epitopu MalE
5'-CAGGCTTTACACTTTATGCTT-3'	108
5'-GTCCAACCTCCGCGACTCGGC-3'	233
5'-TGGCACTGAGCAGAACAATCC-3'	336
5'-CCAGGATTCCGGCTATGACAG-3'	424
5'-CGAGATCGCGCTGCAGTTGAC-3'	594 a 607
5'-ACTTCCTTGCTGCTGACCGGGGCTCTC-3'	751
5'- ATCTGGCCAAGGTGGTGTCTGC-3'	983
5'-GACGGCAACGACATGCTGTAT-3'	1334
5'-CGCGGCGGAGATGGGGTGGATAC-3'	1387
5'-ATGACACCATCCGCATCAACG-3'	1648

## 4.5. Purifikace ACT

### 4.5.1. Příprava močovinného extraktu

Do 50 ml tekutého MDO média s ampicilinem (150  $\mu\text{g/ml}$ ) byly přeneseny 2 - 3 bakteriální kolonie, které nesly plazmid s genem pro ACT (4.4.1.) a bakterie *E. coli* byly kultivovány za stálého třepání po dobu 12-14 hodin při teplotě 37 °C. Narostlou kulturou bylo zaočkováno 500 ml MDO média s ampicilinem (150  $\mu\text{g/ml}$ ) a kultivace bakterií pokračovala za stálého třepání při teplotě 37 °C. Po dosažení požadované optické hustoty bakteriální kultury ( $\text{OD}_{600} = 0,6$ ) byla provedena indukce syntézy toxinu roztokem IPTG (1 mM) vzhledem k tomu, že geny kódující ACT a protein CyaC jsou pod kontrolou inducibilního lac promotoru (4.4.1.). Bakterie byly poté kultivovány za stálého třepání ještě další 3 až 4 hodiny. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v lázni voda – led. Narostlá bakteriální kultura byla centrifugována (6000 g, 4 °C, 20 minut) a po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v TC pufru (20 ml) (4.3.1.). Poté byly stěny bakteriálních buněk dezintegrovány pomocí ultrazvuku (3 $\times$ , 50 W, 18 kHz, 4 °C, 30 vteřin s 30 vteřinovými přestávkami na chlazení).

Bakteriální buňky s rozrušenými buněčnými stěnami byly centrifugovány při 13 000 g po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Po odstranění supernatantu byl pelet omyt v UTE-A pufru (4.3.1.), čímž došlo k odstranění buněčných membrán. Pelet byl poté resuspendován v deionizované H<sub>2</sub>O a centrifugován (13000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu bylo k peletu bylo přidáno 2,4 g pevné močoviny a 2 ml TC pufru tak, aby výsledná koncentrace močoviny po rozpuštění byla 8 M. Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě za stálého míchání a poté centrifugována (13000 g, 4 °C, 30 minut). Supernatant obsahující extrahovaný ACT byl uchováván při teplotě -20 °C.

### 4.5.2. Purifikace ACT iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharóze

Postup purifikace na DEAE-Sepharóze vychází z protokolu popsánoho v publikaci Karimova *et al.*, 1998. Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml gelu DEAE-Sepharózy. DEAE-Sepharóza byla poté propláchnuta 100 ml vody, čímž došlo k odstranění ethanolu, ve kterém je DEAE-Sepharóza uchovávána, a ekvilibrována UTN-A puftrem. Ekvilibrace probíhala tak dlouho, dokud nebylo pH roztoku, který vytékal



z kolony, stejné jako pH ekvilibračního roztoku. K připravenému močovinovému extraktu toxinu (4.5.1.) byl přidán NaCl do výsledné koncentrace 50 mM. Takto upravený extrakt byl nanesen na kolonu, na jejíž náplni se zachytil ACT. Většina ostatních nenavázaných proteinů byla odstraněna 25 ml ekvilibračního pufru UTN-A. ACT byl poté eluován UTN-B pufrem, který obsahoval 2 M NaCl. Byly jímány frakce po 2 ml, u kterých byla zjištěna přítomnost ACT pomocí analýzy na SDS-PAGE (4.5.5.). Frakce, které obsahovaly ACT, byly spojeny a vzorek byl připraven k purifikaci toxinu pomocí hydrofóbní chromatografie na Phenyl-Sepharóze (4.5.5.).

#### 4.5.3. Purifikace ACT hydrofóbní chromatografií na Phenyl-Sepharóze

Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml Phenyl-Sepharózy, která byla propláchnuta deionizovanou vodou a ekvilibrována 20 ml TN-B pufrem. Vzorek s toxinem, který byl předtím purifikován na DEAE-Sepharóze (4.5.2.), byl zředěn 4× v ledovém TN-B pufrem a nanesen na kolonu s Phenyl-Sepharózou. Kolona s naneseným vzorkem byla propláchnuta 20 ml ledového pufru (50 mM Tris pH 8,0) a toxin byl eluován UTE pufrem (4.3.1). Přítomnost ACT v jednotlivých eluovaných frakcích byla zjištěna pomocí analýzy na SDS-PAGE (4.5.5.) a koncentrace ACT byla stanovena metodou podle Bradfordové (4.5.6.). Purifikovaný ACT byl uchováván při teplotě -20 °C.

#### 4.5.4. Biotinylace ACT

Biotinylace ACT byla provedena během purifikace toxinu na Phenyl-Sepharóze. Phenyl-Sepharóza s navázaným toxinem byla nejprve intenzivně promyta PBS a poté byla inkubována v roztoku Sulfo-NSH-LC-biotinu po dobu 40 minut při pokojové teplotě. Podle instrukcí výrobce (Pierce) byla použita taková koncentrace Sulfo-NSH-LC-biotinu, jež odpovídala 15 molekulám Sulfo-NSH-LC-biotinu na jednu molekulu toxinu. Reakce byla zastavena propláchnutím Phenyl-Sepharózy 50 mM Tris-HCl pH 8.0 a biotinylovaný toxin byl eluován UTE pufrem (4.3.1). K ověření biotinylace toxinu byla použita technika Western blot s využitím streptavidinu konjugovaného s křenovou peroxidázou.

#### 4.5.5. SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Sodiumdodecylsulfát-polyakrylamidový gel (SDS-PAGE) byl připraven podle protokolu popsaném v *Molecular Cloning: A laboratory manual* (Sambrook *et Russel*, 2001). Při analýze močovinového extraktu (4.5.1) nebo purifikovaného toxinu (4.5.2 a 4.5.3), bylo k 15  $\mu$ l analyzovaného vzorku přidáno 5  $\mu$ l 5x koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE a vzorek byl inkubován po dobu 5 minut při teplotě 100 °C. Po rozdělení vzorku na polyakrylamidovém gelu byly proteiny obarveny v barvicím roztoku s Coomassie Brilliant Blue R250.

#### 4.5.6. Stanovení koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinu vycházelo z metody popsané M. Bradfordovou v roce 1976 (Bradford, 1976). Nejprve byla připravena: 1) série ředění kalibračního standardu BSA v duplikátech v UTE pufru tak, aby byl rozsah koncentrací BSA v rozmezí 10 - 80  $\mu$ g BSA/ml, 2) ředění měřeného vzorku toxinu (1:20 a 1:50) v duplikátech a 3) samotný pufr UTE, který sloužil jako tzv. nulový vzorek pro měření pozadí. Připravené vzorky byly naředěny 10 $\times$  činidlem Bradfordové a směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté byla stanovena absorbance všech vzorků při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty absorbance ředěných standardů byly vyneseny do grafu proti koncentraci BSA ( $\mu$ g/ml) a ze sestrojené kalibrační křivky byla odvozena koncentrace ACT v jednotlivých vzorcích.

### 4.6. Stanovení adenylátcyklázové, vazebné, invazivní a hemolytické aktivity ACT

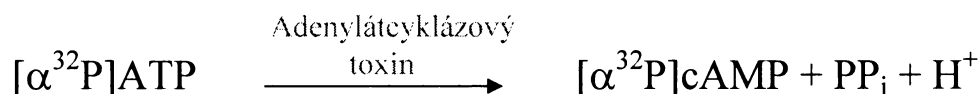
#### 4.6.1. Příprava erytrocytů

Z čerstvé ovčí krve, uchovávané v Alseveru při teplotě 4 °C, bylo sterilně odebráno 0,2 ml krve. K odebranému množství krve byl přidán 10 $\times$  větší objem promývacího HN pufru (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl), který byl předem vychlazený na 4 °C. Krvinky s HN puforem byly protřepány a centrifugovány po dobu 30 vteřin při 2000g. Po odstranění supernatantu, byl pelet erytrocytů resuspendován v HN

pufru a suspenze erytrocytů byla znovu centrifugována. Tento krok byl opakován ještě třikrát. Tímto způsobem bylo dosaženo odstranění proteinů, které byly přítomné v krevní plazmě. Z takto připravených erytrocytů bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$ , které byly přidány ke 900  $\mu\text{l}$  TCT pufru (4.3.1.). Krvinky účinkem tritonu v TCT pufru rychle zlyzovaly a množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno měřením absorbance při vlnové délce 541 nm ( $A_{541}$ ). Po změření  $A_{541}$  byla suspenze erytrocytů naředěna HN puforem na hodnotu  $A_{541} = 3.0$ , která odpovídá přibližně koncentraci  $5 \times 10^8$  erytrocytů/ml.

#### 4.6.2. Stanovení adenylátcyklázové (AC) aktivity ACT

Adenylátcyklázový toxin obsahuje enzymatickou doménu, která je po vazbě kalmodulinu zodpovědná za přeměnu molekul ATP na cAMP. Stanovení adenylátcyklázové aktivity toxinu spočívá v tom, že je ve vzorcích zjištěno množství přeměněného radioaktivně značeného substrátu  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$  na  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  (Ladant, 1988). Množství vytvořeného  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  podle reakce:



je počítáno v jednotkách U, kde 1 U odpovídá 1  $\mu\text{mol}$  vytvořeného cAMP za minutu při teplotě 30  $^\circ\text{C}$ .

##### 4.6.2.1. Vlastní postup při stanovení adenylátcyklázové aktivity

K 50  $\mu\text{l}$  reakční směsi (4.3.1.) bylo v mikrozkuhavce přidáno 5  $\mu\text{l}$  vzorku, u kterého měla být stanovena adenylátcyklázová (AC) aktivita. Po intenzivním promíchání byl vzorek vložen na 5 minut do vodní lázně o teplotě 30  $^\circ\text{C}$ . Během této doby probíhala výše popsaná reakce. Reakce byla zastavena přidáním 200  $\mu\text{l}$  0,5 M HCl a vzorek byl vložen na 5 minut do suchého bloku vyhřátého na teplotu 100  $^\circ\text{C}$ . Po inkubaci v suchém bloku byla hodnota pH vzorku upravena na 7,6 přidáním 200  $\mu\text{l}$  1,5 M imidazolu a vzorek byl nanesen na chromatografickou kolonu, která obsahovala 1 g oxidu hlinitého. Nezareagovaný  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a produkty jeho kyselá hydrolyzy se při hodnotě pH 7,6 navázaly na oxid hlinitý, zatímco  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  se na kolonu nenavázal. Vytvořený  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  byl eluován 3 ml 10 mM imidazolu pH 7,6 do scintilační lahvičky. K eluentu

bylo přidáno 10 ml kapalného scintilačního roztoku, obsah byl promíchán a radioaktivita ve vzorku byla proměřena na scintilačním počítači po dobu 1 minuty. Současně s proměřováním vzorků s ACT byla proměřována rovněž radioaktivita v tzv. nulovém vzorku, který neobsahoval ACT. Tímto způsobem byla zjištěna hodnota pozadí radioaktivity  $^{32}\text{P}$ , která byla poté od všech naměřených hodnot u jednotlivých vzorků odečtena. U všech vzorků byla také proměřena radioaktivita  $[2,8\text{-}^3\text{H}]\text{cAMP}$ , který byl obsažen v reakčním mixu, aby později mohly být provedeny korekce naměřených hodnot radioaktivity  $[^{32}\text{P}]\text{cAMP}$  s ohledem na výtěžnost kolony pro cAMP. Rovněž byla změřena radioaktivita celkového  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  a  $[2,8^3\text{H}]\text{cAMP}$  v reakčním mixu.

#### 4.6.2.2. Výpočet adenylátcyklázové aktivity

Nejprve byla spočítána upravená hodnota radioaktivity v nulovém vzorku podle vztahu:

$$A_{0K}[^{32}\text{P}] = \frac{A_{0M}[^{32}\text{P}] \times A_T[{}^3\text{H}]}{A_{0M}[{}^3\text{H}]},$$

kde  $A_{0M}[^{32}\text{P}]$  a  $A_{0M}[{}^3\text{H}]$  jsou naměřené hodnoty radioaktivity v nulovém vzorku v jednotkách dpm a  $A_T[{}^3\text{H}]$  je celková radioaktivita tritia v reakčním mixu rovněž v jednotkách dpm.

Upravená hodnota radioaktivity vzorků  $A_{VK}[^{32}\text{P}]$  se vypočítala z následujícího vztahu:

$$A_{VK}[^{32}\text{P}] = \frac{A_{VM}[^{32}\text{P}] \times A_T[{}^3\text{H}]}{A_{VM}[{}^3\text{H}]} - A_{0K}[^{32}\text{P}],$$

kde  $A_{VM}[^{32}\text{P}]$  a  $A_{VM}[{}^3\text{H}]$  představují naměřenou radioaktivitu u konkrétního vzorku v hodnotách dpm.

Výsledná hodnota adenylátcyklázové aktivity v mikromolech přeměněného ATP za minutu v 5  $\mu\text{l}$  vzorku ( $U/5 \mu\text{l}$ ) se vypočetla ze vztahu:

$$A(U/5\mu\text{l}) = \frac{A_{VK}[^{32}\text{P}] \times 0,1 \mu\text{mol} \times d}{A_T[^{32}\text{P}] \times t},$$

kde  $t$  je čas reakce v minutách,  $d$  je ředění ACT a  $A_T[^{32}\text{P}]$  je hodnota, která odpovídá celkové naměřené radioaktivitě fosforu v reakčním mixu v jednotkách dpm.

Adenylátcyklázová aktivita v 1 ml vzorku  $A$  (U/ml) se vypočítala podle vztahu:

$$A(\text{U/ml}) = \frac{A}{0,005} .$$

Množství navázaného ACT v % se vypočítalo podle vztahu:

$$\text{ACT}_V (\%) = \frac{A_V \times 100}{A_I} ,$$

kde  $A_V$  je adenylátcyklázová aktivita navázaného ACT (U/ml) a  $A_I$  je celková počáteční adenylátcyklázová aktivita ve vzorku (U/ml).

Ze zjištěné vazby  $\text{ACT}_V (\%)$  bylo spočítáno množství ( $m$ ) navázaného ACT na 1 ml erytrocytů (g/ml) podle následujícího vztahu:

$$m (\text{g/ml}) = \frac{\text{ACT}_V(\%) \times \text{ACT}(\text{g/ml})}{100} ,$$

kde ACT (g/ml) je koncentrace ACT ve vzorku.

Počet molekul navázaného ACT na erytrocyt se poté vypočítal podle vztahu:

$$N_{\text{ACT}} = \frac{m \times N_A}{M \times N_K} ,$$

kde  $N_A$  je Avogadrova konstanta,  $M$  molární hmotnost ACT (177000 g/mol) a  $N_K$  počet erytrocytů/ml.

#### 4.6.2.3. Stanovení specifické AC aktivity u purifikovaného toxinu

Purifikovaný toxin byl nejprve zředěn  $10\times$  v UTCT pufru (4.3.1.) a poté v  $100\times$  v TCT pufru. Ředění bylo provedeno při teplotě  $4^\circ\text{C}$  a naředěný toxin použit pro stanovení

adenylátcyklázové aktivity (4.6.5.). Specifická aktivita purifikovaných toxinů byla v rozmezí hodnot 250-300 U/mg proteinu.

#### 4.6.3. Stanovení vazebné a invazivní aktivity purifikovaného toxinu

Vazebná aktivita vyjadřuje schopnost ACT vázat se na buňky (erytrocyty) a je stanovena jako množství AC aktivity toxinu, který je navázaný na erythrocytech. Invazivní aktivita vyjadřuje schopnost ACT přenášet svou AC doménu přes cytoplazmatickou membránu a indukovat tvorbu cAMP v cytozolu erythrocytů. Invazivní aktivitu toxinu lze stanovit jako množství AC aktivity navázaného ACT, jehož AC doména zůstala chráněná proti extracelulárně přidanému trypsinu.

Ovčí erythrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT (1 U/ml, 30 minut, 37 °C) v TN pufru v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Po inkubaci s ACT byly erythrocyty promyty v TNE pufru (4.3.1.) a vzorek byl rozdělen na dvě poloviny. K jedné polovině vzorku, určeného na stanovení invazivní aktivity ACT, byl přidán trypsin do výsledné koncentrace 40  $\mu\text{g/ml}$  a vzorek byl inkubován 10 minut při teplotě 37 °C. Během této doby došlo k odstranění ACT z vnější strany membrány erythrocytů. Trypsin byl poté inhibován přidávkem inhibitoru trypsinu (80  $\mu\text{g/ml}$ ). Druhá polovina vzorku, určená na stanovení vazebné aktivity ACT, byla ponechána na ledu. Erythrocyty pak byly promyty v TNE pufru, pelet byl resuspendován v TCT pufru (4.3.1.) a ve vzorcích byla stanovena AC aktivita podle protokolu uvedeném v kapitole (4.6.2.).

#### 4.6.4. Stanovení invazivní aktivity ACT měřením hladiny cAMP

Invazivní aktivitu ACT lze rovněž stanovit jako množství cAMP vytvořeného v cytozolu erythrocytů. Ovčí erythrocyty byly inkubovány s ACT (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) v TNCa pufru po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 100  $\mu\text{l}$  0,2% Tweenu v 100  $\mu\text{M}$  HCl a vzorky byly inkubovány po dobu 15 minut při teplotě 100 °C. Poté bylo ke vzorkům přidáno 150  $\mu\text{l}$  150  $\mu\text{M}$  nepufrovaného imidazolu a koncentrace cAMP byla stanovena metodou ELISA podle protokolu popsáno v publikaci Karimova *et al.*, 1998. Mikrotitrační destičky (Nunc-Immuno, Maxisorp) byly pokryty konjugátem cAMP-BSA o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  v 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 9,5) a inkubovány přes noc při teplotě 4 °C. Po

odstranění nenavázaného konjugátu byly jamky blokovány 3 hodiny v roztoku 2% BSA v TBS (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,15 M NaCl a 0,1% Tween-20) při teplotě 23 °C a poté třikrát promyty TBS. Do jamek bylo přidáno 100 µl polyklonální králičí protilátky proti cAMP (1:3000) a 100 µl vzorku nebo naředěného *stetardu* cAMP. Po 12 hodinové inkubaci (přes noc) při teplotě 4 °C byly jamky čtyřikrát promyty TBS a inkubovány s anti-králičí protilátkou s peroxidázou (1:1000, 2 hodiny, 37 °C). Po odstranění nenavázané protilátky pomocí TBS byl přidán substrátový roztok pro peroxidázu (o-fenylendiamin). Reakce byla zastavena po 8 minutové inkubaci při pokojové teplotě v temnu přidávkem 50 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a byla změřena absorbance při vlnové délce 492 nm.

#### 4.6.5. Stanovení hemolytické aktivity purifikovaného toxinu

Ovčí erythrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s uvedenou koncentrací ACT v TN pufru v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> při teplotě 37 °C. Při stanovování závislosti hemolytické aktivity na koncentraci toxinu, byly erythrocyty inkubovány s ACT po dobu 270 minut. Poté byly nelyzované erythrocyty odstraněny centrifugací (2 000g, 1 min, 23 °C) a spektrofotometrickým měřením absorbance supernatantu při vlnové délce 541 nm bylo stanoveno množství uvolněného hemoglobinu. Při stanovování závislosti hemolytické aktivity na čase byl ze vzorku erythrocytů inkubovaných s ACT odebírán po časových intervalech (15 minut) alikvot, u kterého bylo stanoveno množství uvolněného hemoglobinu.

Hemolytická aktivita mutant ACT (ACT-E581K a ACT-E570K+E581P) byla vztažena k hemolytické aktivitě nemutovaného toxinu a spočtena podle vztahu:

$$A_H = \frac{A_M - A_B}{A_N - A_B} \times 100 \quad [\%]$$

A<sub>M</sub> .....absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erythrocytů s mutovaným typem ACT

A<sub>N</sub> .....absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erythrocytů s nemutovaným typem ACT

A<sub>B</sub> .....absorbance hemoglobinu v supernatantu po inkubaci erythrocytů bez ACT

## 4.7. Mikroskopické metody

### 4.7.1. Transmisní elektronová mikroskopie

#### 4.7.1.1. Negativní barvení ovčích erytrocytů po inkubaci s ACT

Ovčí erytrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C) v HN pufru pH 7,4 (4.3.1.) s 1% BSA a 2 mM Ca<sup>2+</sup> nebo 5 mM EDTA. Erytrocyty byly poté centrifugovány (1 minuta, 2000g, 23 °C), pelet byl resuspendován v příslušném pufru a inkubace byla opakována s novým přídatkem toxinu stejným způsobem ještě dvakrát. Opakovanou inkubací erytrocytů s ACT bylo docíleno vazby většího počtu molekul ACT na erytrocyt. Po skončení inkubace byly erytrocyty centrifugovány (1 minuta, 2000g, 23 °C) a nenavázaný ACT byl odstraněn opakovaným promytím erytrocytů v HNE pufru (pH 7,4) a v karbonátovém pufru o složení 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11,5 a 150 mM NaCl (Rogel *et* Hanski, 1992; Fujiki *et al.*, 1982). Polovina vzorku byla použita ke stanovení množství adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu (4.6.2.), jež bylo použito k výpočtu celkového počtu navázaných molekul na erytrocyt (4.6.2.). Druhá polovina vzorku byla použita pro přípravu ghostů. Erytrocyty byly lyzovány v hypotonickém pufru (10 mM Hepes pH 7,4; 5 mM EDTA, Pefabloc (1mg/ml) a 5 mM jódacetamid) a centrifugovány (15 minut, 12000g, 4 °C). Tento krok byl opakován ještě jednou. Erytrocytární ghosty byly resuspendovány v HN pufru a zkontrolovány v optickém mikroskopu s fázovým kontrastem. Ghosty byly poté nanášeny na nosnou síťku s formvarovým filmem zpevněným uhlíkem, který byl předem aktivován v doutnavém výboji (Benada *et* Pokorny, 1990). Vzorky byly negativně obarveny 2% roztokem uranyl acetátu a analyzovány v transmisním elektronovém mikroskopu CM 100 (Philips).

#### 4.7.1.2. Imunodetekce ACT

##### 4.7.1.2.1. Nepřímé imunoznačení ACT pomocí IgG s navázaným 5 nm zlatem

Ovčí erytrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT232/FLAG (80 µg/ml, 30 minut, 37 °C) v HN pufru (pH 7,4) s přídatkem 1% BSA a 75 mM sacharózy v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup> nebo 5 mM EDTA. Přítomnost BSA snížila agregaci toxinu v roztoku a přítomnost sacharózy zabránila lyzi erytrocytů účinkem ACT (Ehrmann *et al.*, 1991). Po inkubaci byl



nenavázaný toxin odstraněn opakovaným promytím erytrocytů v HN pufru s 1% BSA, 75 mM sacharózou a 5 mM EDTA a v karbonátovém pufru (viz výše). Promyté erytrocyty (o koncentraci  $2 \times 10^9$  erytrocytů/ml) byly inkubovány s monoklonální anti-FLAG protilátkou (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 hodina, 4 °C) za mírného míchání v HN pufru s 1% BSA a 75 mM sacharózou. Po inkubaci s primární protilátkou byly erytrocyty promyty ve stejném pufru a inkubovány za stejných podmínek se sekundární protilátkou s navázaným koloidním 5 nm zlatem (1:20, 1 hodina, 4 °C). Po odstranění sekundární protilátky byly erytrocyty lyzovány hypotonickým pufrem (10 mM HEPES pH 7,4; 5 mM EDTA, Pefabloc (1mg/ml) a 5 mM jódacetamid) a centrifugovány (15 minut, 12000g, 4 °C). Tento krok byl opakován ještě jednou. Polovina vzorku, určená pro negativní barvení, byla fixována po dobu 10 minut při teplotě 4 °C v roztoku 0,1% glutaraldehydu v HN pufru. Fixace erytrocytů po imunoznačení zabránila odštěpení protilátek během negativního barvení uranyl acetátem (Griffiths, 1993). Po fixaci byly nezreagované aldehydické skupiny glutaraldehydu redukovány  $\text{NaBH}_4$  (0,5 mg/ml, 15 minut, 4 °C). Fixované ghosty byly nanесeny na nosnou síťku s formvarovým filmem a negativně obarveny 2% roztokem uranyl acetátu (4.7.1.1). Nefixované membrány nebyly negativně barveny.

#### 4.7.1.2.2. Nepřímé imunoznačení ACT pomocí proteinu A s navázaným 5 nm zlatem

Ovčí erytrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT (48  $\mu\text{g/ml}$ , 30 minut, 37 °C) v HN pufru (pH 7,4) s přidavkem 1% BSA a 75 mM sacharózy v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Po inkubaci byly erytrocyty centrifugovány, resuspendovány v příslušném pufru a inkubace byla opakována s novým přidavkem toxinu. Po odstranění nenavázaného toxinu (viz výše) byly erytrocyty ( $2 \times 10^9$  erytrocytů/ml) inkubovány s monoklonální protilátkou 10A8 proti sekrečnímu signálu na C-konci molekuly ACT (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 hodina, 4 °C) za mírného míchání v HN pufru s 1% BSA a 75 mM sacharózou. Primární protilátka byla odstraněna centrifugací a erytrocyty byly inkubovány za stejných podmínek s proteinem A s navázaným 5 nm koloidním zlatem (1:50, 1 hodina, 4 °C). Po odstranění nenavázaného proteinu A byly erytrocyty lyzovány v hypotonickém pufru (10 mM HEPES pH 7,4; 5 mM EDTA, Pefabloc (1mg/ml) a 5 mM jódacetamid) a získané ghosty byly použity pro přípravu preparátů pro TEM viz (4.7.1.1). Ghosty nebyly negativně barveny z důvodu snadnější a přehlednější detekce partikulí koloidního zlata.

Distribuce zlatých partikulí na membráně ghostů byla testována pomocí párové korelační funkce PCF (Philimonenko *et al.*, 2001) u náhodně vybraných digitálně

zaznamenaných snímků membrány ( $n=35$ ,  $1267 \times 1014$  nm). Pomocí párové korelační funkce lze zjistit, zda je označený antigen (v tomto případě ACT) lokalizován ve shlucích nebo, zda je jeho distribuce náhodná. Princip metody spočívá v porovnávání hustoty částic v okolí testované částice(c) s celkovou hustotou částic odpovídající náhodné distribuci. Program, který využívá párovou korelační funkci k testování distribuce antigenů, je dostupný na adrese: <http://nucleus.biomed.cas.cz/gold>.

#### 4.7.2. Skenovací elektronová mikroskopie

Ovčí erythrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT nebo mutovanými formami ACT ( $25 \mu\text{g/ml}$ , 30 minut,  $37^\circ\text{C}$ ) v HN pufru (pH 7,4) s 1% BSA v přítomnosti  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$  nebo  $5 \text{ mM EDTA}$ . Po inkubaci byly erythrocyty centrifugovány, pelet byl resuspendován v příslušném pufru a inkubace byla opakována s čerstvým přídatkem toxinu ještě dvakrát. Po každé inkubaci byla část vzorku fixována v roztoku 3% glutaraldehydu v HN pufru (přes noc,  $4^\circ\text{C}$ ). Fixované erythrocyty byly promyty v kakodylátovém pufru a naneseny na polykarbonátové membrány pokryté vrstvou poly-L-lysinu. Sedimentace erythrocytů na polykarbonátové membrány probíhala ve vlhké komůrce při teplotě  $4^\circ\text{C}$  po dobu 48 hodin (Sanders *et al.*, 1975). Vzorky byly poté odvodněny alkoholovou řadou, vysušeny metodou kritického bodu a pokoveny zlatem. Takto připravené preparáty byly analyzovány v elektronovém mikroskopu Philips CM 12 STEM v rastrovacím modu.

#### 4.7.3. Fluorescenční a konfokální mikroskopie

Ovčí erythrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s ACT232/FLAG ( $25 \mu\text{g/ml}$ , 30 minut,  $37^\circ\text{C}$ ) v HN pufru (pH 7,4) s přídatkem 1% BSA a  $75 \text{ mM}$  sacharózy v přítomnosti  $2 \text{ mM Ca}^{2+}$  nebo  $5 \text{ mM EDTA}$ . Po inkubaci byl nenavázaný toxin odstraněn opakovaným promytím erythrocytů v HN pufru s 1% BSA,  $75 \text{ mM}$  sacharózou a  $5 \text{ mM EDTA}$  a v karbonátovém pufru o složení  $100 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$  pH 11,5 a  $150 \text{ mM NaCl}$  (Fujiki *et al.*, 1982; Rogel *et al.*, 1992). Polovina vzorku byla fixována 0,1% glutaraldehydem po dobu 10 minut při teplotě  $4^\circ\text{C}$ , druhá polovina vzorku zůstala nefixována. Nezareagované aldehydické skupiny glutaraldehydu u fixovaného vzorku byly redukovány  $\text{NaBH}_4$  ( $0,5 \text{ mg/ml}$ , 15 minut,  $4^\circ\text{C}$ ) (Weber *et al.*, 1978). Erythrocyty byly poté centrifugovány a resuspendovány v takovém objemu HN pufru s 1% BSA a  $75 \text{ mM}$  sacharózou, jež

odpovídal koncentraci  $2 \times 10^9$  erytrocytů/ml. K suspenzi erytrocytů byla přidána specifická monoklonální protilátka M2 proti FLAG epitopu (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 hodina, 4 °C). Nenavázaná primární protilátka byla odstraněna centrifugací a suspenze erytrocytů byla inkubována se sekundární protilátkou IgG-FITC (1:100, 1 hodina, 4 °C). Po odstranění sekundární protilátky byly připraveny preparáty, jež byly analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus BX60.

V případě přípravy vzorků pro konfokální mikroskopii byly ovčí erytrocyty (4.6.1) inkubovány s ACT232/FLAG (65  $\mu\text{g/ml}$ , 30 minut, 37 °C) v HN pufru (pH 7,4) s přídavkem 1% BSA a 75 mM sacharózy v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. V časových intervalech 10, 20 a 30 minut byl odebírán alikvot erytrocytů. Po odstranění nenavázaného toxinu (viz výše), bylo u poloviny vzorku stanoveno množství navázaného toxinu (4.6.2.2), druhá polovina vzorku byla použita pro imunodetekci. Erytrocyty (o koncentraci  $2 \times 10^9$  erytrocytů/ml) byly inkubovány s monoklonální anti-FLAG protilátkou (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 hodina, 4 °C) za mírného míchání v HN pufru s 1% BSA a 75 mM sacharózou. Po inkubaci byla primární protilátka odstraněna centrifugací a erytrocyty byly inkubovány s IgG-Cy3 (1:100, 1 hodina, 4 °C) za stejných podmínek. Po imunoznačení byly erytrocyty promyty a fixovány 0,1% glutaraldehydem v HN pufru (10 minut, 4 °C). Nezreagované aldehydicke skupiny glutaraldehydu byly redukovány  $\text{NaBH}_4$  (0,5 mg/ml, 15 minut, 4 °C) (Weber *et al.*, 1978) a fixované erytrocyty byly použity pro přípravu preparátů v mowiolu s DABCO, které byly analyzovány v konfokálním mikroskopu Leica.

## 4.8. Metody studia komplexů ACT

### 4.8.1. Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE)

Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE) byla provedena podle metody popsané Schaggerem *et von* Jagowem (Schagger *et von* Jagow, 1991). Ovčí erytrocyty (4.6.1) byly inkubovány s ACT (25  $\mu\text{g/ml}$ , 30 minut, 37 °C) v HN pufru s přídavkem 75 mM sacharózy a 1% BSA v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Po inkubaci byly erytrocyty centrifugovány a nespecificky navázaný toxin byl odstraněn promytím erytrocytů v HNE pufru a poté v karbonátovém pufru (4.7.1.1.). Erytrocyty byly lyzovány v hypotonickém pufru (10 mM HEPES pH 7,4; 5 mM EDTA, Pefabloc (1mg/ml) a 5 mM jódacetamid) a centrifugovány (15 minut, 12000g, 4 °C). Pelet erytrocytárních

ghostů byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l lyzačního roztoku (1% n-dodecyl- $\beta$ -D-maltosid, Pefabloc (1mg/ml), 5mM jódacetamid, 750 mM aminokapronová kyselina a 50 mM Bis-tris, pH 7.0) a ke vzorkům byla přidána barva Coomassie Brilliant Blue G do výsledné koncentrace 0,25%. Na gradientový polyakrylamidový gel (3-15%) bylo nanášeno 5  $\mu$ l z každého vzorku (pokud není uvedeno jinak) a dělení proteinů probíhalo po dobu 5 hodin za podmínek 5 mA/gel a chlazení (4 °C). Rozdělené proteinové komplexy byly poté v přítomnosti katodového pufru (15 mM Bis-tris, 50 mM Tricin pH 7,0) elektroforeticky přeneseny na PVDF membránu a detekovány protilátkami (4.8.2.).

#### 4.8.2. Western blot

K přenosu proteinů z modrého nativního polyakrylamidového gelu (BN-PAGE, kapitola 4.8.1) nebo sodiumdodecylsulfát-polyakrylamidového gelu (SDS-PAGE, kapitola 4.5.5) na PVDF membránu pomocí elektrického proudu byla použito zařízení Semiphor (Hofer). Přenos proteinů probíhal tzv. polosuchou metodou při konstantním proudu 0,8 mA na 1 cm<sup>2</sup> po dobu 2 hodin. Po přenesení proteinů byla PVDF membrána inkubována v roztoku 5% nízkotučného mléka v PBST (4.3.1.) po dobu 1 hodiny. Poté následovala inkubace s primární protilátkou (9D4, 1:10000 nebo 3D1, 10A8 nebo anti-FLAG 1:5000) v roztoku 1% mléka v PBST po dobu 1 hodiny při teplotě 23 °C. Membrána byla poté promyta (2  $\times$  15 minut) v PBST a inkubována se sekundární protilátkou s křenovou peroxidázou (1:5000, 1 hodina, 23 °C) v roztoku 1% mléka v PBST. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla PVDF membrána promyta (2  $\times$  15 minut v PBST) a k detekci označených proteinů byly použity chemiluminiscenční roztoky (4.3.1.). Luminiscence byla snímána na RTG filmy nebo pomocí zařízení LAS (Luminiscence Analyzing System).

#### 4.8.3. Kvantifikace tvorby komplexů ACT

Pro kvantifikaci izolovaných komplexů nemutovaného typu toxinu ACT a jeho mutant ACT-E581K a ACT-E570K+E581P byly výsledky vizualizace komplexů chemiluminiscenční metodou (4.8.2.) zaznamenány přístrojem LAS-1000 (Luminiscence Analyzing System) a kvantifikovány pomocí softwaru Aida (Advanced Image Data Analyzer), verze 3.28. V dráze rozdělených komplexů ACT byl vytvořen profil intenzity

signálu. Pozadí bylo určeno podle začátku a konce dráhy, který neobsahoval žádné komplexy. Hranice jednotlivých vrcholů v profilu, byly určeny podle minima intenzity signálu mezi sousedními vrcholy. Hodnota vrcholu byla poté stanovena numerickou integrací intenzit jednotlivých bodů plochy vrcholu s odečteným pozadím. Hodnoty vrcholů jednotlivých komplexů byly normalizovány pomocí součtu intenzit vrcholů v dané dráze rozdělených komplexů a vyjádřeny v %. Pro srovnání množství jednotlivých komplexů u nemutovaného typu toxinu a jeho mutant, byly hodnoty vyjádřeny v % nemutovaného typu ACT, jehož hodnoty byly stanoveny jako 100 %. Tyto hodnoty, jež byly získány z několika nezávislých opakování (n=9), byly testovány neparametrickým Wilcoxonovým testem. Hladina významnosti byla stanovena na  $p \leq 0,01$ .

#### 4.8.4. Analýza komplexů ACT ve druhém rozměru

Po rozdělení izolovaných proteinových komplexů z erytrocytární membrány na BN-PAGE (4.8.1.) byl proužek gelu vyříznut, inkubován v roztoku 1% SDS (1 minuta, 23 °C), přiložen na zaostřovací gel 5% SDS-PAGE (4.5.5) a zalit 5× koncentrovaným vzorkovým roztokem pro SDS-PAGE (4.3.1.). Elektroforéza poté probíhala při konstantním proudu 0,25 mA/cm<sup>2</sup> při pokojové teplotě.

#### 4.8.5. Imunoprecipitace ACT z membrány erytrocytů

Ovčí erytrocyty (4.6.1.) byly inkubovány s biotinylovaným ACT (25 µg/ml, kapitola 4.5.4), ACT232/FLAG (25 µg/ml) nebo směsí biotinylovaného toxinu (ACT-biotin) a ACT232/FLAG (12,5 µg/ml: 12,5 µg/ml) po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Po odstranění nenavázaného toxinu, byl připraven lyzát erytrocytárních membrán podle postupu popsáném v kapitole 4.8.1. Objem 1 ml lyzátu byl inkubován s partikulemi avidin-agarózy (30 µl) za mírného míchání po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C. Po inkubaci byly partikule avidin-agarózy opakovaně (třikrát) promyty v 1 ml lyzačního roztoku a navázané komplexy ACT byly eluovány 50 µl 2 mM biotinu v lyzačním roztoku (4.8.1.) a analyzovány na BN-PAGE (4.8.1.).

#### 4.9. Vazba ACT na erythrocyty po odstranění cholesterolu z membrány

Ovčí erythrocyty (4.6.1) byly inkubovány s methyl- $\beta$ -cyklodextrinem (1, 2 a 4 mM) v HN pufru za mírného míchání po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Poté byl methyl- $\beta$ -cyklodextrin odstraněn opakovaným promytím erythrocytů v HN pufru a erythrocyty byly inkubovány s ACT (65  $\mu$ g/ml, 30 minut, 37 °C) v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Množství navázaného ACT na erythrocyty bylo zjištěno stanovením adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu (4.6.2.).

#### 4.10. Vazba ACT na lipozómy

Lipozómy byly připraveny z čistých lipidů (2 mg/ml) ultrasonikací multilamelárních lipozómů (Stolz *et al.*, 1994), které byly připraveny vytřepáváním v lipidů napařených na stěnu skleněné zkumavky do TN pufru (20 mM Tris-HCl pH 8.0 a 150 mM NaCl). Lipozómy byly inkubovány s ACT (1  $\mu$ g/ml, 30 minut, 23 °C) v TN pufru v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Po inkubaci byly lipozómy naředěny přídatkem TN pufru s 5 mM EDTA a centrifugovány 40 minut (160000g, 4 °C). Pelet byl resuspendován v 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Fujiki *et al.*, 1982) a suspenze lipozómů byla znovu centrifugována. Tento krok byl opakován ještě dvakrát. Množství navázaného toxinu na lipozómech bylo stanoveno podle postupu uvedeném v kapitole 4.6.2.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Oligomerizace adenylátcyklázového toxinu v membráně ovčích erytrocytů

#### 5.1.1 Oligomery adenylátcyklázového toxinu netvoří v membráně pravidelné kompaktní struktury detekovatelné pomocí negativního barvení

Jednou z aktivit adenylátcyklázového toxinu (ACT) je tzv. hemolytická aktivita, za kterou jsou zodpovědné póry, jež vznikají v membráně pravděpodobně po oligomerizaci několika molekul toxinu (Benz *et al.*, 1994a; Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Iwaki *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994). Přímý důkaz existence oligomerů ACT v membráně ale doposud chyběl. Rozhodli jsme se proto prokázat přítomnost oligomerů ACT v membráně jejich přímou detekcí, a to technikou negativního barvení, která byla již dříve použita pro zobrazení izolovaných molekul ACT (Hewlett *et al.*, 1991). Za modelovou membránu k detekci oligomerů ACT jsme zvolili membránu ovčích erytrocytů. Ovčí erytrocyty představují vyzkoušený a stále používaný modelový systém pro studium ACT (Osičková *et al.*, 1999; Mašín *et al.*, 2005) a lze z nich snadno připravit hypotonickou lyzí tzv. ghosty<sup>2</sup>, jež lze dobře zobrazit v transmisním elektronovém mikroskopu (TEM).

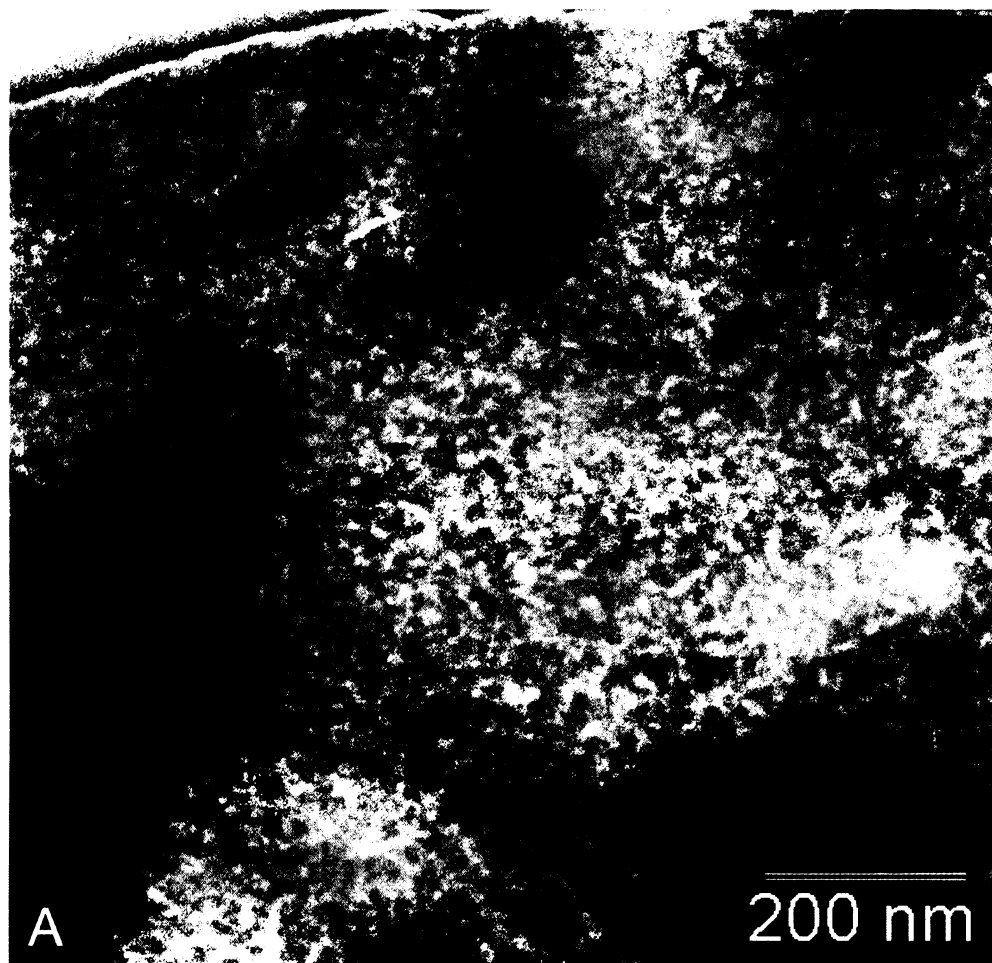
K docílení vyšší vazby ACT na membránu byly ovčí erytrocyty opakovaně inkubovány s ACT v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ . Kontrolní erytrocyty byly inkubovány s ACT za stejných podmínek v přítomnosti chelatačního činidla EDTA, jež odstranilo vápenaté ionty, které jsou nezbytné pro biologickou aktivitu toxinu. Množství navázaného toxinu bylo stanoveno podle adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu na erytrocytech (4.6.2.). Na základě známé specifické adenylátcyklázové aktivity toxinu (U/mg) byl rovněž spočítán počet navázaných molekul ACT na erytrocyt (4.6.2.), který odpovídal ~3000 molekulám na erytrocyt. Ze známé velikosti povrchu ovčího erytrocytu ( $66 \mu\text{m}^2$ ) (Cox *et al.*, 2000) a počtu molekul ACT navázaných na jeden erytrocyt jsme dále odvodili,

---

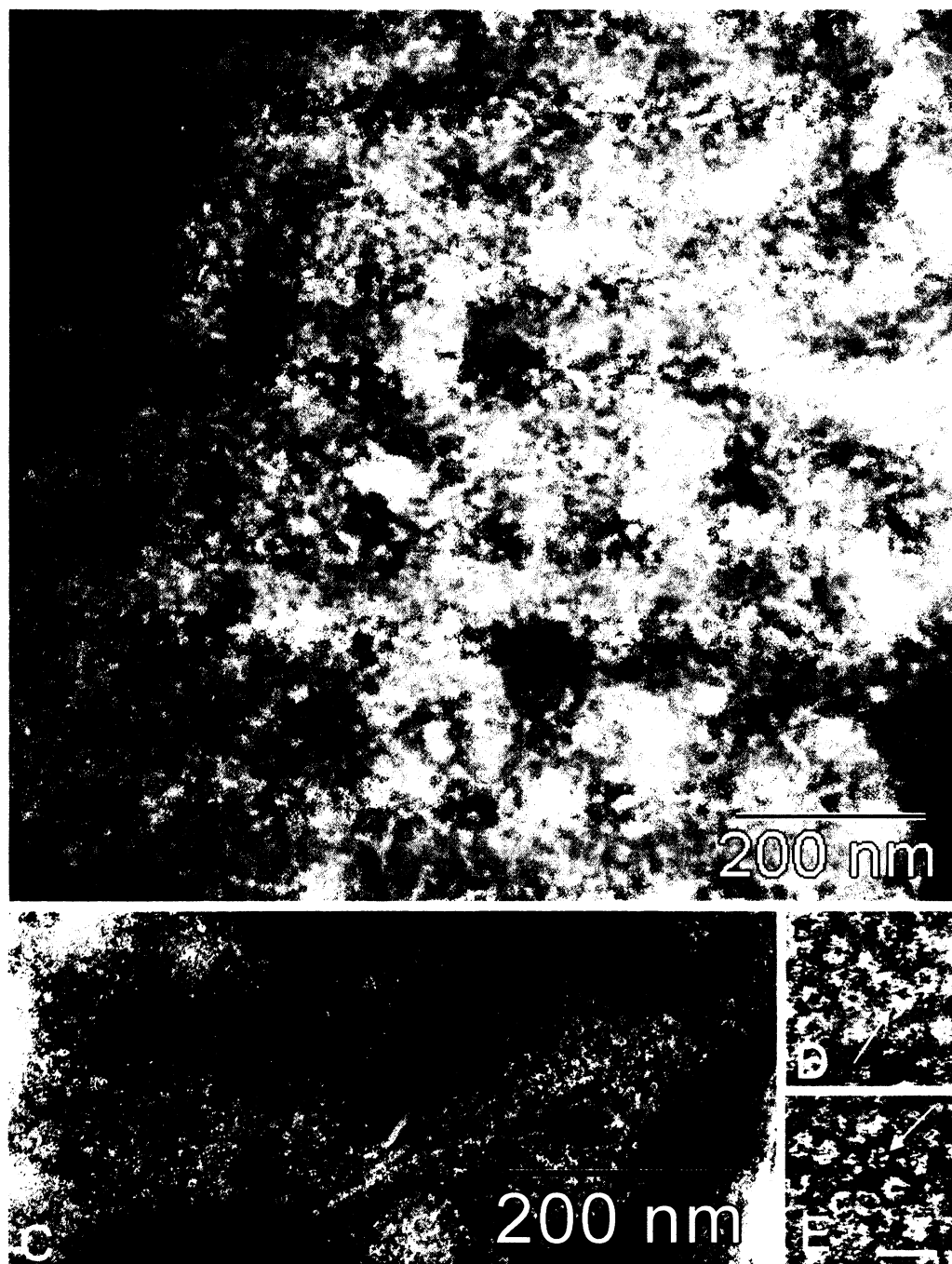
<sup>2</sup> Ghosty jsou kulaté útvary přibližně stejného průměru jako erytrocyty, které mají zachovanou membránu ale neobsahují hemoglobin.

že na jeden  $\mu\text{m}^2$  může připadat asi 20 dimerů ACT nebo 10 tetramerů ACT. Avšak, i když jsme analyzovali membránu u velkého množství negativně nabarvených ghostů ( $n=60$ ), nenalezli jsme žádné struktury, jež by bylo možné označit za oligomery ACT (Obr. 19A, B).

Pro kontrolu použité metody negativního barvení jsme provedli stejným způsobem detekci jiného oligomerního toxinu v membráně, a to  $\alpha$ -toxinu bakterie *Staphylococcus aureus*, jehož oligomerní struktura je známa (Fussle *et al.*, 1981). Jak je patrné z Obr. 19C-E, oligomery  $\alpha$ -toxinu, jejichž molekulová hmotnost (232 kDa) odpovídá přibližně molekulové hmotnosti monomeru ACT, jsme v membráně bez potíží detekovali. Lze tedy uzavřít, že použitá technika negativního barvení byla provedena správným způsobem. Dohromady tyto výsledky naznačují, že oligomery ACT netvoří v membráně pravidelné kompaktní struktury, jež jsou podobné oligomerům jiných typů bakteriálních toxinů tvořících póry (Bhakdi *et al.*, 1985; Fussle *et al.*, 1981; Morgan *et al.*, 1995; Sekiya *et Futaesaku*, 1998).







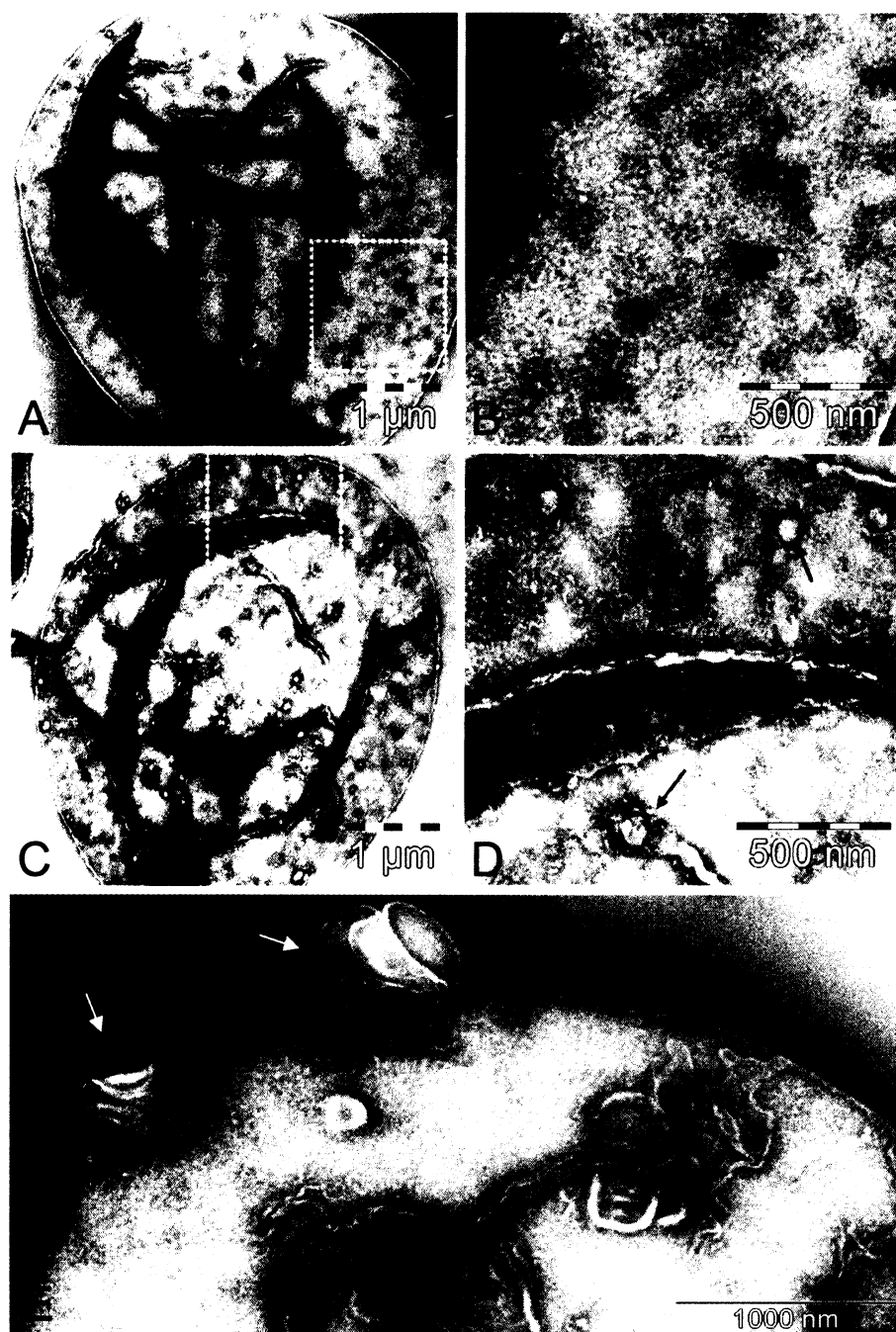
**Obr. 19: Oligomery adenylátcyklázového toxinu tvoří v membráně pravidelně kompaktní struktury.**

(A) Kontrolní membrána ghostu, který byl připravený po 3× opakované inkubaci ovčích erytrocytů s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C) v přítomnosti 5 mM EDTA. (B) Membrána ghostu po 3× opakované inkubaci ovčích erytrocytů s ACT v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Zobrazené membrány reprezentují jeden ze 60-ti analyzovaných ghostů. (C, D, E) Příklady membrány ghostů po inkubaci ovčích erytrocytů s  $\alpha$ -toxinem bakterie *Staphylococcus aureus* (100 µg/ml, 30 minut, 37 °C). Šipky označují typické oligomery  $\alpha$ -toxinu o průměru 10 nm s centrálním pórem o průměru 2-3 nm (Fussle *et al.*, 1981). Úsečka v obr. 1E odpovídá 20 nm. Membrány ghostů byly negativně nabarveny 2% roztokem uranyl acetátu. Transmisní elektronová mikroskopie. Zobrazené výsledky reprezentují nejméně dva nezávislé experimenty.

### 5.1.2. Hemolytická aktivita adenylátcyklázového toxinu je zodpovědná za morfologické změny erytrocytů

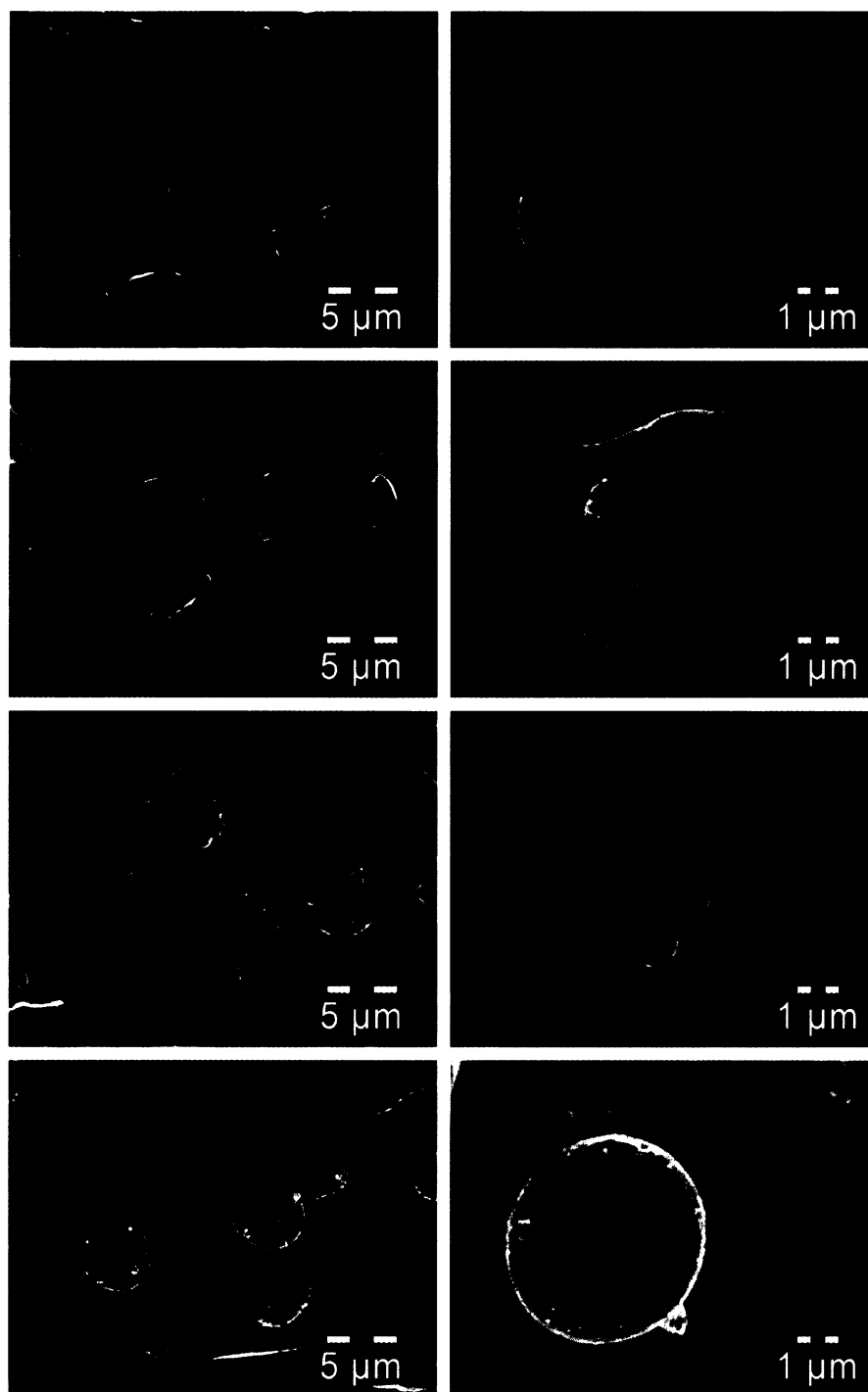
I když jsme pomocí negativního barvení nedetkovali oligomery ACT v membráně ovčích erytrocytů, pozorovali jsme výrazné morfologické změny na membráně erytrocytárních ghostů. Zatímco kontrolní ghosty, připravené z erytrocytů inkubovaných s ACT v přítomnosti EDTA, měly převážně hladký povrch (Obr. 20A, B), na ghostech, jež vznikly z erytrocytů inkubovaných s ACT v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , jsme detkovali přítomnost kulatých kompaktních útvarů (dále označované jako membránové výčnělky) (Obr. 20C, D) a membránových váčků (Obr. 20E), jež neměly kompaktní strukturu. Morfologické změny ovčích erytrocytů po působení ACT jsme pozorovali také po analýze erytrocytů ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM, Obr. 21). V závislosti na počtu inkubací ovčích erytrocytů s ACT jsme oproti kontrolním erytrocytům (Obr. 21A, B) pozorovali postupnou změnu morfologie erytrocytů, jež zahrnovala smrštění buněk a tvorbu echinocytů (Obr. 21C, D), bobtnání a tvorbu výběžků a váčků (Obr. 21E, F) a tvorbu ghostů (Obr. 21G, H). Změna morfologie ovčích erytrocytů po působení ACT je zvláště dobře patrná na stereo snímcích tzv. anaglyfech (Obr. 22), které byly vytvořeny spojením dvou obrazů, jež se od sebe lišily v náklonu preparátu. Kromě výše uvedených morfologických změn erytrocytů, jsme na koncích některých membránových výběžků pozorovali tvorbu malých váčků o průměru 150 nm (Obr. 23).

Jedním z faktorů, který může změnit morfologii erytrocytů je snížení obsahu ATP v cytozolu (Backman, 1986; Palek *et al.*, 1978). Vzhledem ke skutečnosti, že ACT má invazivní adenylátcyklázovou aktivitu, jež může způsobit snížení množství ATP v buňce (Bachelet *et al.*, 2002; Basler *et al.*, 2006), rozhodli jsme se testovat příspěvek invazivní adenylátcyklázové aktivity ke změně morfologie erytrocytů. Pro tento účel jsme použili toxoid ACT, který neměl enzymatickou adenylátcyklázovou aktivitu, ale měl plně zachovanou hemolytickou aktivitu. Dále jsme požili protein ACT-E581K, jež měl nižší invazivní ale vyšší hemolytickou aktivitu (Basler *et al.*, 2006). Jak je patrné z Obr. 24, k podobné změně morfologie erytrocytů jako po inkubaci s nemutovaným typem toxinu došlo také po inkubaci erytrocytů s toxoidem ACT. Naproti tomu erytrocyty inkubované s ACT-E581K vykazovaly vedle zvýšené tvorby membránových váčků také zvýšené bobtnání buněk. Lze tedy shrnout, že za změnu morfologie ovčích erytrocytů je zodpovědná hemolytická a nikoli invazivní aktivita toxinu.

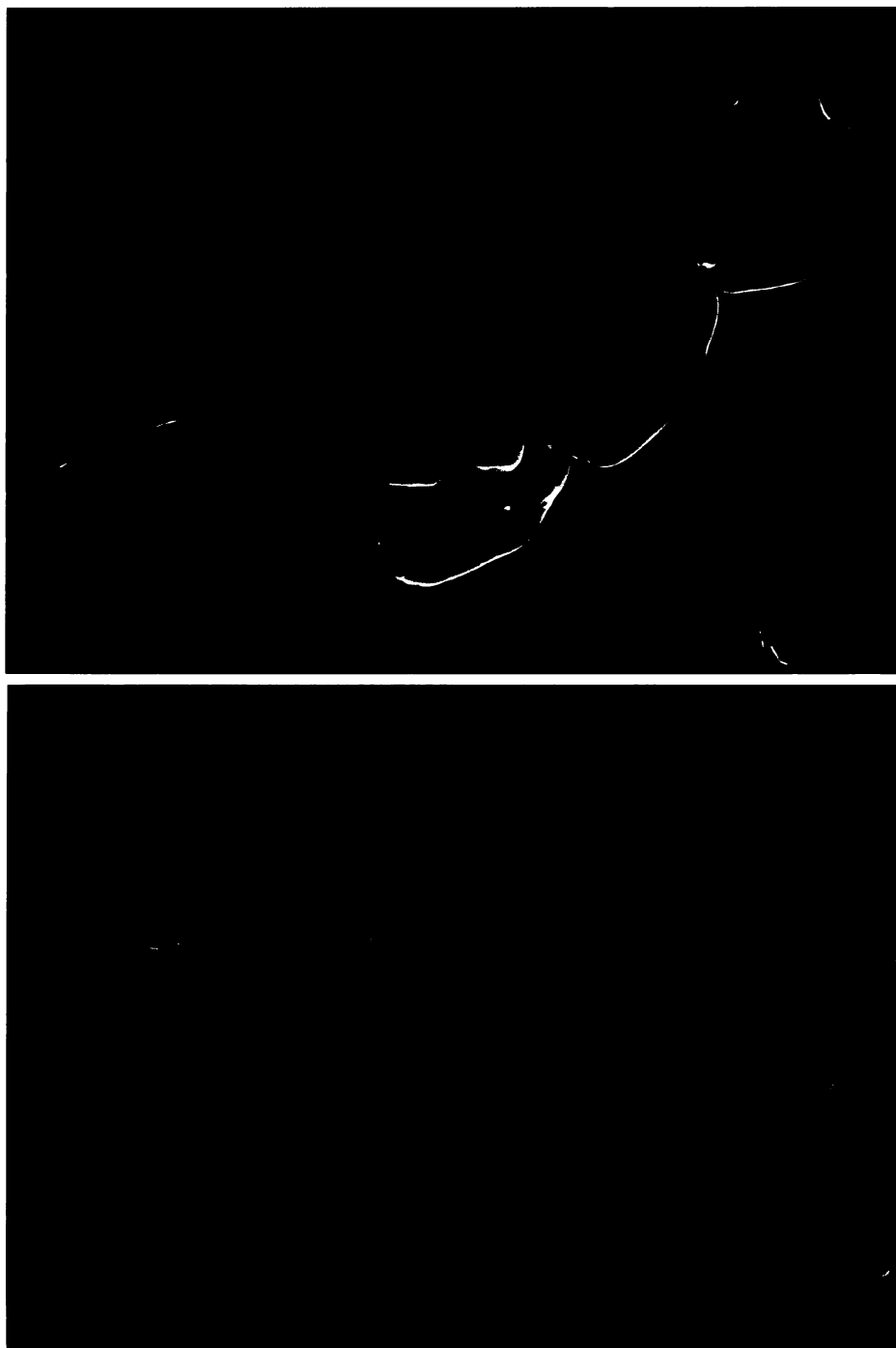


**Obr. 20: Adenylátcyklázový toxin způsobuje vznik výčnělků a váčků v membráně ovčích erytrocytů.**

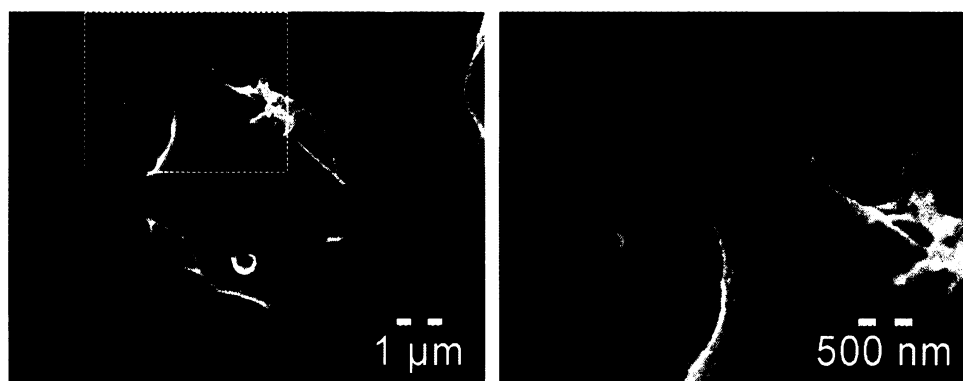
Ovčí erytrocyty byly 3× inkubovány s ACT (25 μg/ml, 30 min, 37 °C). (A) Příklad kontrolního ghostu připraveného po inkubaci erytrocytů s ACT v přítomnosti 5 mM EDTA. (B) Detail membrány označené bílým rámečkem v obr. 20A. (C) Příklad ghostu získaného po inkubaci erytrocytů s ACT v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. (D) Detail membrány označené bílým rámečkem v obr. 2C. Membránové výčnělky (kulaté kompaktní útvary) jsou označené šipkami. (E) Příklad membránových váčků (označených šipkami) na povrchu ghostu, jež byl získaný po inkubaci erytrocytů s ACT v přítomnosti Ca<sup>2+</sup>. Transmisní elektronová mikroskopie. Negativní barvení. Zobrazené výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty.



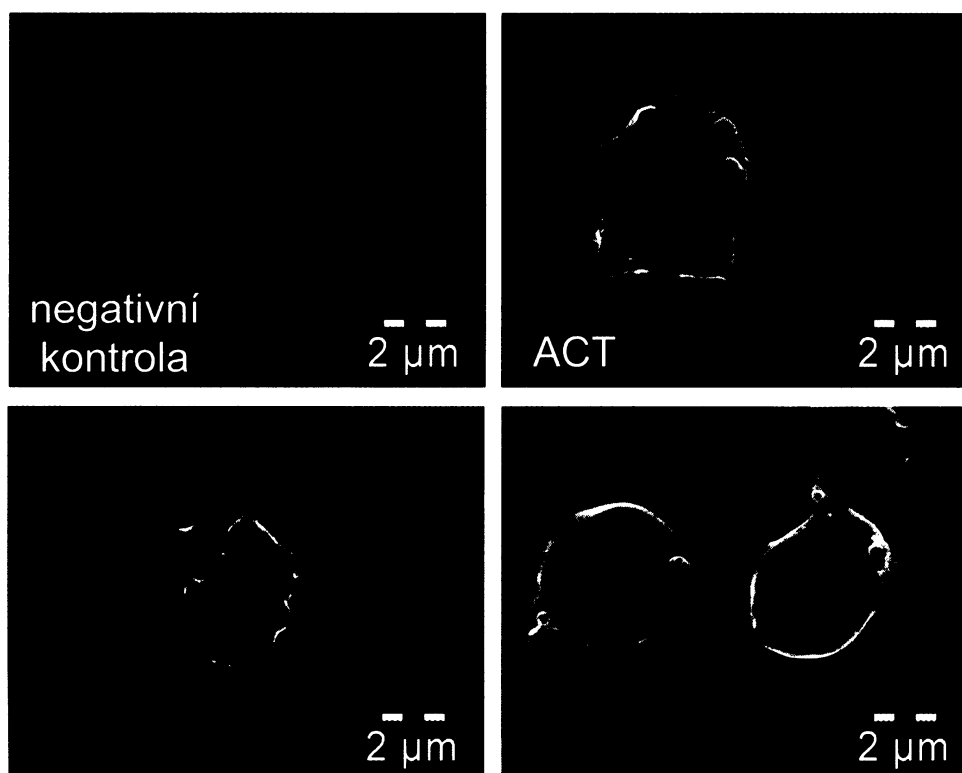
**Obr. 21: Adenylátcyklázový toxin způsobuje postupnou změnu morfologie ovčích erytrocytů.** Ovčí erytrocyty byly opakovaně inkubovány s ACT (25  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ). (A, B) Kontrolní erytrocyty po inkubaci s ACT v pufru s 5 mM EDTA. (C, D) Erytrocyty po první inkubaci s ACT a 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . (E, F) Erytrocyty po druhé inkubaci s ACT a  $\text{Ca}^{2+}$ . (G, H) Erytrocyty po třetí inkubaci s ACT a 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Skenovací elektronová mikroskopie. Digitálně zaznamenaný obraz. Zobrazené výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty.



**Obr. 22:** Stereo zobrazení morfologie ovčích erytrocytů po inkubaci s ACT. (A) Kontrolní erytrocyty po druhé inkubaci s ACT (25 µg/ml, 30 min, 37 °C) v přítomnosti 5 mM EDTA. (B) Erytrocyty po druhé inkubaci s ACT (25 µg/ml, 30 min, 37 °C) v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Skenovací elektronová mikroskopie. Stereo zobrazení digitálního záznamu. Pozn.: K prohlížení obrázků jsou nutné stereo brýle.



**Obr. 23: ACT pravděpodobně indukuje vznik váčků na koncích membránových výběžků.** (A) Příklad ovčího erythrocytu po druhé inkubaci s ACT (25 μg/ml, 30 min, 37 °C) v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. (B) Detail výřezu zobrazený v Obr. 5A. Skenovací elektronová mikroskopie. Digitálně zaznamenaný obraz.



**Obr. 24: Hemolytická aktivita ACT je zodpovědná za morfologické změny ovčích erythrocytů.** Ovčí erythrocyty byly inkubovány s nemutovaným typem ACT nebo jeho mutanty (25 μg/ml, 30 min, 37 °C) v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Negativní kontrola: ovčí erythrocyty inkubované v nepřítomnosti ACT, ACT (nemutovaný typ toxinu), ACT-AC: enzymaticky neaktivní toxoid ACT a ACT-E581K: toxin s vyšší hemolytickou ale nižší invazivní aktivitou než nemutovaný typ ACT. Skenovací elektronová mikroskopie. Digitálně zaznamenaný obraz. Zobrazené výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty.

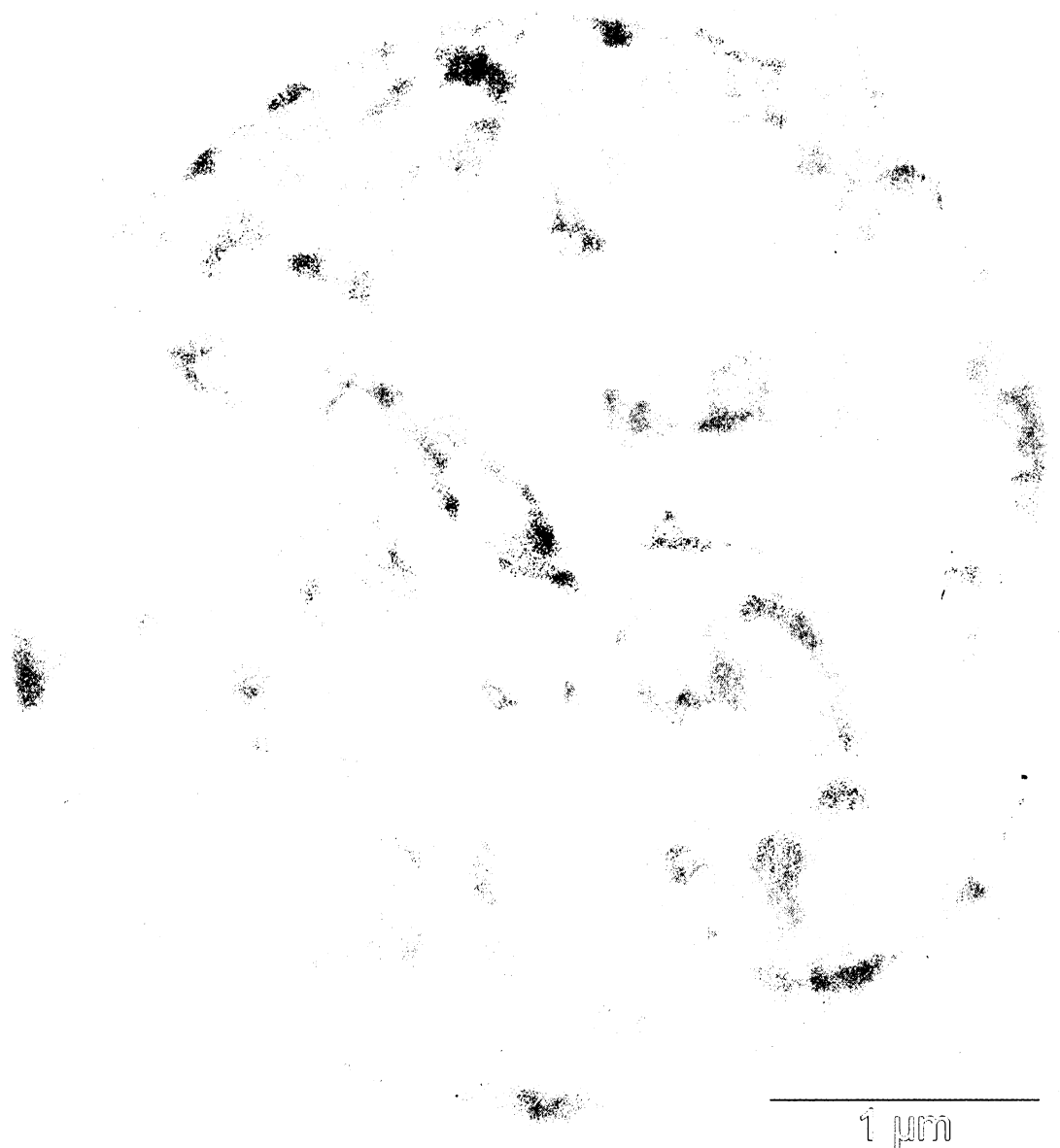
### 5.1.3. Adenylátcyklázový toxin tvoří v membráně ovčích erytrocytů pravděpodobně nejméně dimery

Pomocí negativního barvení se nepodařilo vizualizovat oligomery ACT v membráně ovčích erytrocytů. Avšak naše výsledky zároveň ukázaly, že kanálotvorná aktivita toxinu, jež je velmi pravděpodobně závislá na oligomerizaci několika molekul ACT (Benz *et al.*, 1994a; Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Iwaki *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994), způsobila změnu morfologie erytrocytů a jejich lyzi (viz výše). To znamená, že oligomery ACT byly pravděpodobně v membráně přítomny. K jejich průkazu v membráně jsme proto dále zvolili nepřímou imunodetekci, která umožňuje detekci proteinových komplexů v membráně (Kang *et al.*, 2004).

Nejprve jsme se rozhodli detekovat molekuly ACT v membráně pomocí protilátky s navázanou partikulí koloidního zlata. K tomuto účelu jsme využili protein ACT233/FLAG (El-Azami-El-Idrissi *et al.*, 2003), který nesl v adenylátcyklázové doméně FLAG epitop, jenž byl po vazbě toxinu na erytrocyty dobře rozpoznáván specifickou monoklonální anti-FLAG M2 protilátkou (Loucká, 2003). Po inkubaci erytrocytů s ACT233/FLAG v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA (negativní kontrola) byly erytrocyty promyty v karbonátovém pufru (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 150 mM NaCl, pH 11,5) (Fujiki *et al.*, 1982; Rogel *et al.*, 1992). Tímto způsobem byly odstraněny molekuly toxinu, jež nebyly zanořeny do membrány. Navázané molekuly ACT v membráně byly označeny anti-FLAG protilátkou a sekundární protilátkou s navázaným koloidním zlatem (5 nm). Jak ukazuje Obr. 25, ghosty připravené z kontrolních erytrocytů, které byly inkubovány s ACT233/FLAG v přítomnosti EDTA, měly hladký povrch bez zlatých partikulí. Naproti tomu na membráně ghostů, které byly připraveny z erytrocytů inkubovaných s ACT233/FLAG v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ , byly detekovány zlaté partikule (Obr. 26), a to převážně ve shlucích (Obr. 26B, C). Molekuly ACT233/FLAG jsme detekovali také v tmavých oblastech membrány nebarvených ghostů (Obr. 26). Tato místa pravděpodobně představovala poškozenou membránu erytrocytů tvorbou výčnělků a váčků po působení ACT.

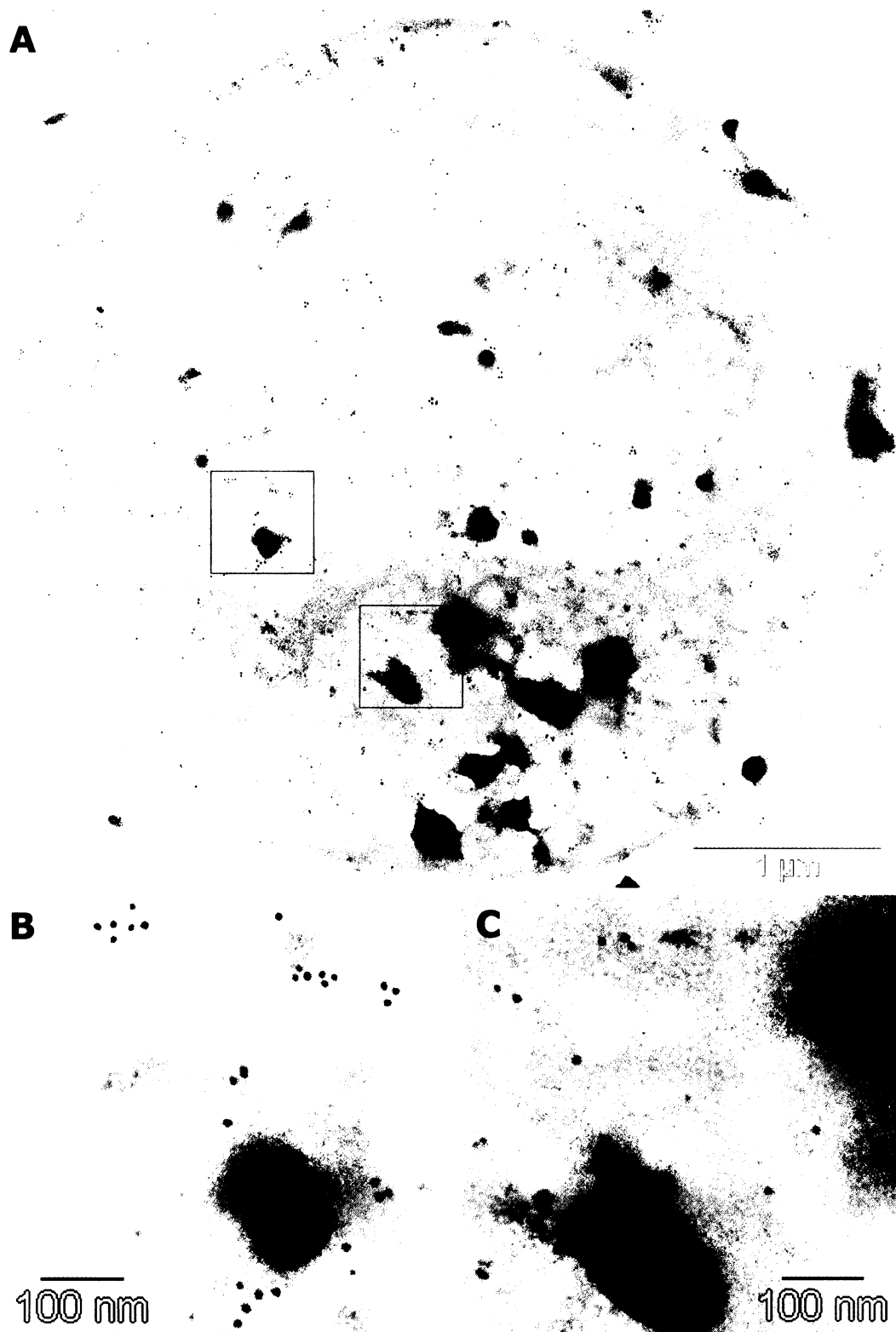
Detekce zlatých partikulí na membráně ghostů jednoznačně prokázala přítomnost molekul ACT v membráně a detekce shluků molekul ACT naznačila, že ACT tvoří oligomery. Pokud však byly ghosty obarveny pomocí negativního barvení nezjistili jsme

v okolí zlatých partikulí přítomnost žádných kompaktních útvarů, které by bylo možné označit za oligomery ACT (Obr. 27), a potvrdili jsme tak, že ACT netvoří v membráně pravidelné kompaktní struktury podobné jiným typům toxinů tvořících póry.

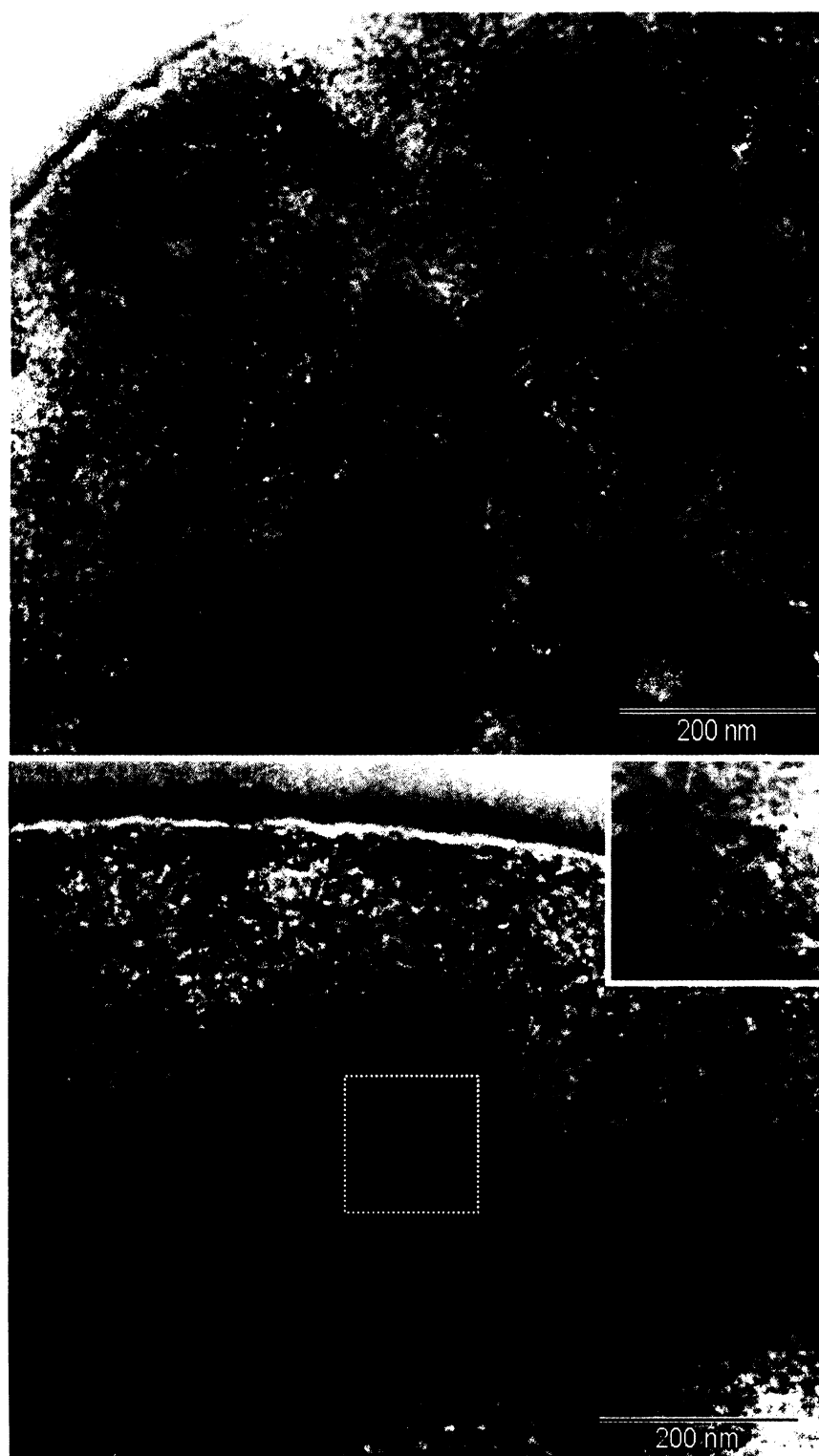


**Obr. 25: Kontrolní imunodetekce ACT233/FLAG v membráně ovčích erytrocytů.** Erythrocyty byly inkubovány s proteinem ACT233/FLAG (80 μg/ml, 30 minut, 37 °C) v přítomnosti 5 mM EDTA. Detekce navázaných molekul ACT byla provedena anti-FLAG protilátkou a sekundární protilátkou s navázaným koloidním zlatem (5 nm). Transmisní elektronová mikroskopie. Nebarvený preparát. Zobrazený ghost reprezentuje výsledek jednoho ze tří nezávislých experimentů.





**Obr. 26: Molekuly ACT se v membráně ovčích erytrocytů nacházejí ve shlucích.** (A) Imunodetekce toxinu v membráně po inkubaci erytrocytů s ACT332/FLAG (80  $\mu\text{g/ml}$ , 30 minut, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pomocí specifické anti-FLAG protilátky a IgG s navázaným koloidním zlatem (5 nm). (C, D) Detaily vybraných ploch membrány označené rámečky v obr. 8A. Transmisní elektronová mikroskopie. Nebarvený preparát. Zobrazený ghost reprezentuje výsledek jednoho ze tří nezávislých experimentů.



**Obr. 27: ACT netvoří v membráně oligomery detekovatelné pomocí negativního barvení. (A)** Příklad negativně obarvené membrány kontrolního ghostu po inkubaci ovčích erytrocytů s ACT233/FLAG (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 minut, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 mM EDTA) a imunodetekci pomocí anti-FLAG protilátky a IgG s navázanou partikulí koloidního zlata (5 nm). **(B)** Příklad negativně obarvené membrány ghostu připraveného po inkubaci erytrocytů s ACT233/FLAG (80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 minut, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) a imunodetekci. Výřez zobrazuje část membrány označenou bílým rámečkem v obr. 27B. Transmisní elektronová mikroskopie. Negativně barvené preparáty 2% roztokem uranyl acetátu. Digitální záznam televizní kamerou.

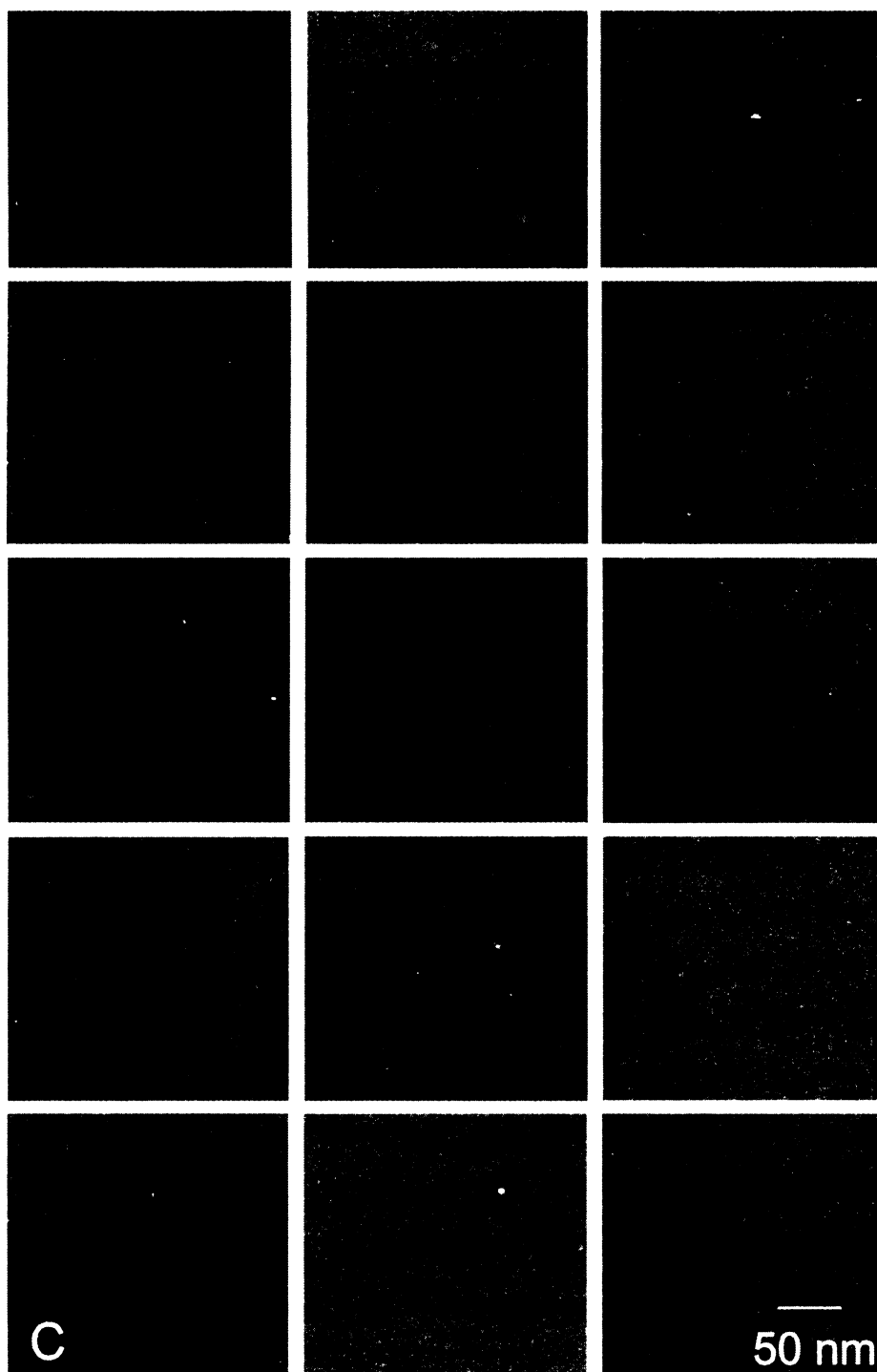
Je známa skutečnost, že při imunoznačení pomocí sekundární protilátky s koloidním zlatem dochází často k vazbě několika sekundárních protilátek na jednu primární protilátku (Griffiths, 1993). Navíc sekundární protilátka může způsobit umělé shlukování označených proteinů (Santoso *et al.*, 1986). Z těchto důvodů jsme se rozhodli ověřit nenáhodnost distribuce molekul ACT v membráně také pomocí proteinu A s navázaným koloidním zlatem. Protein A váže primární protilátku v poměru 1:1 a neindukuje shlukování antigenů. V případě detekce pomocí proteinu A tedy jedna zlatá partikule odpovídá jedné nebo maximálně dvěma označeným molekulám ACT v membráně (Roos *et Morgan*, 1990; Slot *et al.*, 1989).

Molekuly ACT navázané v membráně ovčích erytrocytů jsme označili specifickou myší antiACT protilátkou (IgG2b<sup>3</sup>, 10A8), jež váže sekreční signál ACT (Lee *et al.*, 1999), a proteinem A s navázaným 5 nm koloidním zlatem. Jak ukazuje Obr. 28, na rozdíl od kontrolních ghostů (Obr. 28A) jsme na membráně ghostů, které byly připravené z erytrocytů inkubovaných s ACT v přítomnosti 2 mM Ca<sup>2+</sup>, detekovali izolované zlaté partikule i shluky zlatých partikulí (Obr. 28B, C), a to přibližně ve stejném poměru. Velikost shluků zlatých partikulí v membráně jsme testovali párovou korelační funkcí (PCF), jež určí vzdálenost, do které dochází ke statisticky významnému shlukování zlatých partikulí (Philimonenko *et al.*, 2001). Výsledky PCF ukázaly, že v membráně byly nejčastěji detekovány shluky zlatých částic velké 20 nm v průměru a největší zjištěné shluky zlatých částic měly velikost 50 nm v průměru (Obr. 29A). Shluky tvořily nejčastěji dvě zlaté partikule, shluky většího počtu partikulí (>2) byly méně četné (Obr. 29B). Tyto výsledky naznačily, že se ACT nachází v membráně nejčastěji ve formě monomerů (izolované zlaté partikule) a dimerů (dvojice zlatých partikulí) a již méně ve formě vyšších oligomerů (> 2 zlaté partikule pohromadě). Avšak v případě detekce dvou zlatých částic nemůžeme vyloučit možnost, že některé zlaté partikule odpovídají díky dvěma vazebným místům primární protilátky dvěma molekulám toxinu, a tedy i oligomerům s vyšším počtem podjednotek (trimerům nebo tetramerům). Dále, na základě známého počtu navázaných molekul ACT na erytrocyt a množství zlatých partikulí bylo zjištěno, že účinnost značení byla pouze 25%. Vzhledem ke skutečnosti, že jsme přes nízkou účinnost značení detekovali ~50% zlatých partikulí ve shlucích (Obr. 29B), je vysoce pravděpodobné, že se molekuly ACT toxinu nacházely v membráně v ještě větších shlucích, a tedy tvořily buď větší oligomery nebo skupiny oligomerů.

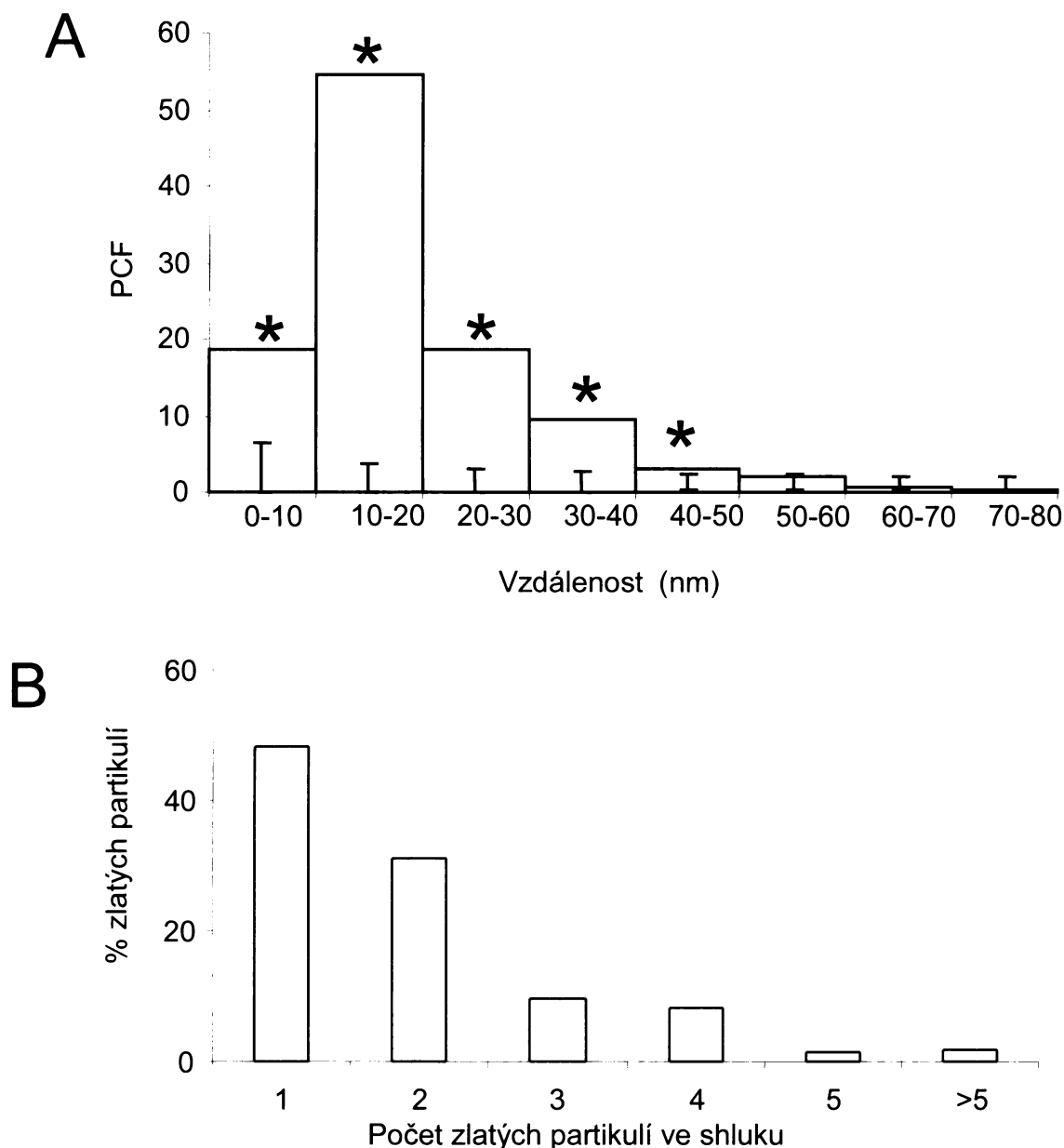
<sup>3</sup> protein A váže lépe myší IgG2b než myší IgG1 (tomuto typu odpovídá protilátka anti-FLAG a většina dostupných anti-ACT protilátek)







**Obr. 28: Molekuly ACT tvoří shluky v membráně ovčích erytrocytů.** Ovčí erytrocyty byly opakovaně inkubovány s ACT (48  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  nebo EDTA a navázaný ACT byl označen anti-ACT protilátkou (10A8) a proteinem A s navázanou partikulí koloidního zlata (5 nm). (A) Kontrolní imunodetekce ACT v membráně po inkubaci ovčích erytrocytů s ACT v přítomnosti 5mM EDTA. (B) Imunodetekce ACT v membráně po inkubaci ovčích erytrocytů s ACT v přítomnosti 2mM  $\text{Ca}^{2+}$ . (C) Ukázka shluků molekul ACT v membráně. Transmisní elektronová mikroskopie. Nebarvený preparát. Výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty, jež byly provedené s různými preparáty ACT.



**Obr. 29: Molekuly ACT tvoří shluky v membráně ovčích erytrocytů. (A)** Statistická analýza distribuce molekul ACT v membráně. Ovčí erytrocyty byly opakovaně inkubovány s ACT (48  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) a navázané molekuly ACT byly nepřímou označeny anti-ACT protilátkou a proteinem A s navázanou partikulí zlata (5 nm). Na ose y jsou vyneseny hodnoty PCF (párové korelační funkce) (Philimonenko *et al.*, 2001) a na ose x vzdálenosti mezi zlatými partikullemi. Hodnota PCF udává, kolikrát je hustota zlatých částic v dané vzdálenosti vyšší než v případě náhodné distribuce zlatých partikulí, jež je v grafu označena úsečkami. Hvězdička označuje statisticky významnou velikost shluků ( $p < 0,01$ ). **(B)** Počet zlatých partikulí na jeden shluk ( $\leq 50$  nm). Výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty, jež byly provedené s různými preparáty ACT.

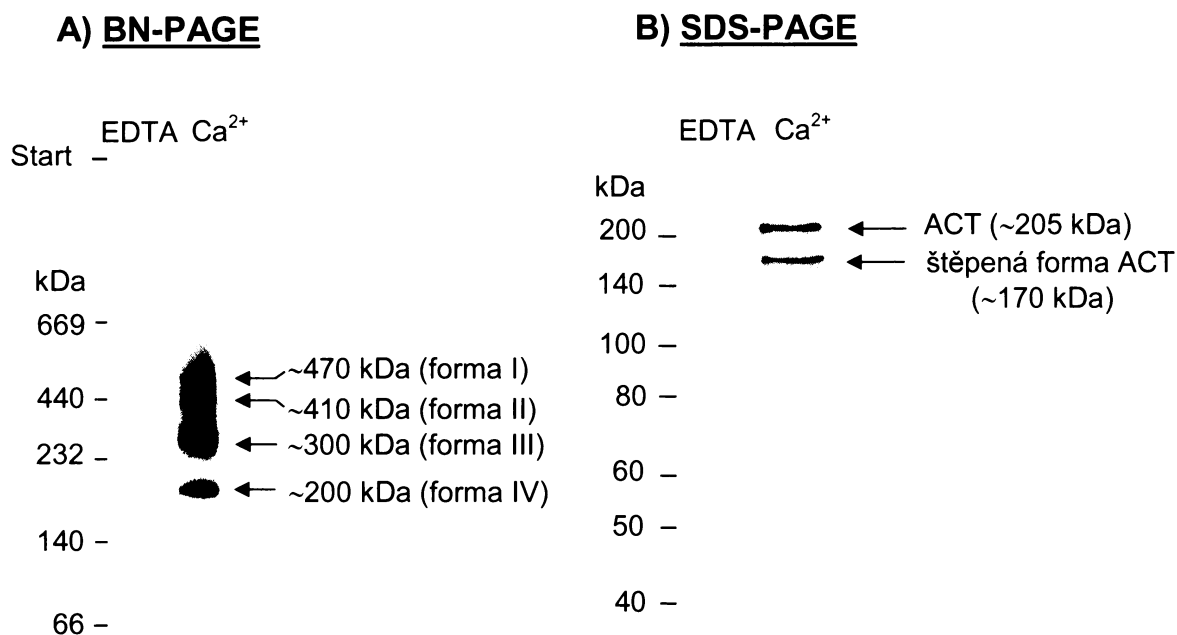
#### 5.1.4. Extrakce oligomerů, monomeru a zkrácené formy ACT z membrány ovčích erytrocytů

Pomocí nepřímé imunodetekce ACT v membráně ovčích erytrocytů jsme zjistili, že se molekuly toxinu nacházejí v membráně ve shlucích a pravděpodobně tvoří nejméně dimery. Rozhodli jsme se proto dále potvrdit přítomnost oligomerů ACT v membráně pomocí jiných metod. Vzhledem k tomu, že oligomery ACT nebyly detekovány za denaturujících podmínek na SDS-PAGE (Loucká, 2003; Rogel *et* Hanski, 1992; Rogel *et al.*, 1991; Rita Krumscheid, nepublikované výsledky), zvolili jsme pro jejich další analýzu tzv. modrou nativní polyakrylamidovou elektroforézu (BN-PAGE), která umožňuje vedle nativní detekce proteinových komplexů také jejich rozdělení podle molekulové hmotnosti (Schagger *et* von Jagow, 1991).

Po inkubaci erytrocytů s ACT v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  nebo EDTA byly erytrocyty promyty v karbonátovém pufru (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 150 mM NaCl, pH 11,5) (Fujiki *et al.*, 1982; Rogel *et* Hanski, 1992). Tímto způsobem byly odstraněny molekuly toxinu, které byly pouze volně asociované s membránou. Proteinové komplexy zanořené v membráně byly poté extrahovány pomocí 1% laurylmaltosidu (Kashino, 2003), rozděleny na BN-PAGE na 3-15% gradientovém gelu a ACT byl detekován metodou Western blot. Rovněž jsme provedli analýzu izolovaných proteinových komplexů za denaturujících podmínek na SDS-PAGE. Jak je patrné z Obr. 30A, po rozdělení izolovaných proteinových komplexů na BN-PAGE byly v membránách erytrocytů inkubovaných s ACT v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  detekovány čtyři formy ACT, které chyběly v membránách kontrolních erytrocytů, jež byly inkubovány s ACT v přítomnosti 5 mM EDTA. Zdánlivá molekulová hmotnost detekovaných forem ACT zjištěná na základě pohyblivosti rozpustných proteinových standardů odpovídala přibližně ~470 kDa (forma I), ~410 kDa (forma II), ~300 kDa (forma III) a ~200 kDa (forma IV). Kromě formy IV (~200 kDa), byla zdánlivá molekulová hmotnost detekovaných forem ACT výrazně vyšší než molekulová hmotnost 177 kDa monomeru ACT (Glaser *et al.*, 1988). Tyto výsledky naznačovaly, že vysokomolekulové komplexy ACT (forma I až III) pravděpodobně odpovídají oligomerům a forma IV monomeru ACT. Avšak, když byly tytéž membránové extrakty rozděleny za denaturujících podmínek na 7,5% SDS-PAGE, detekovali jsme v extraktu z erytrocytů inkubovaných s ACT v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  dvě různé formy ACT, jejichž zdánlivá molekulová hmotnost odpovídala ~205 kDa a



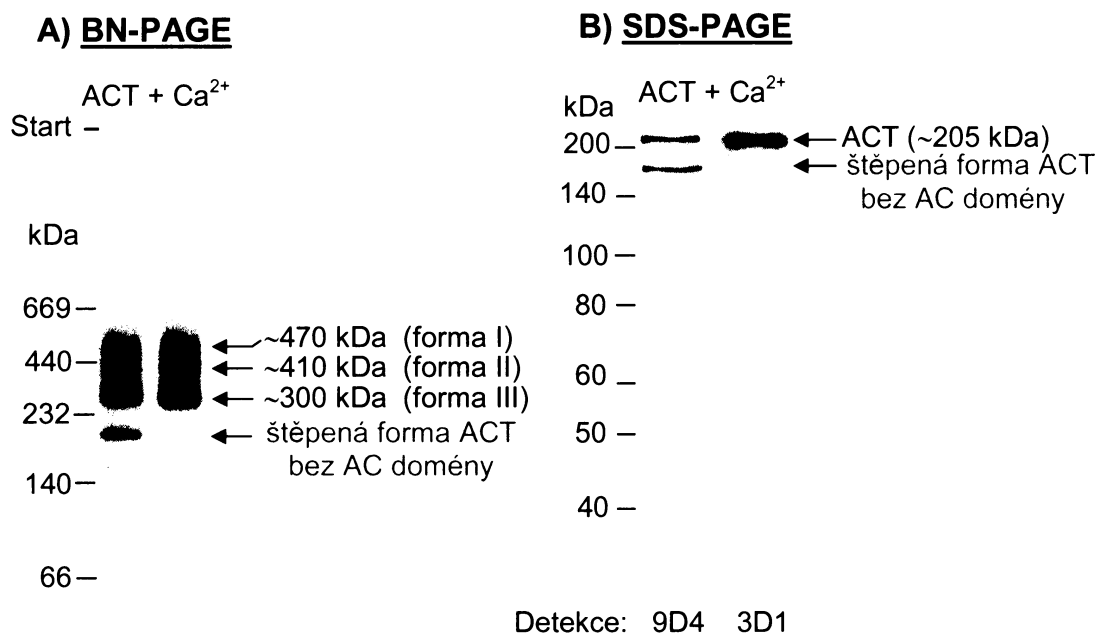
~170 kDa (Obr. 30B). Proužek o velikosti ~205 kDa detekovaný na SDS-PAGE lze považovat za monomer intaktního ACT, o němž je známo, že má sníženou pohyblivost na SDS-PAGE (Hewlett *et al.*, 1989). Detekce proužku o velikosti ~170 kDa ale ukázala, že je v membránovém extraktu rovněž přítomna štěpená forma ACT.



**Obr. 30: Izolace vysokomolekulových forem ACT z membrány ovčích erytrocytů za nativních podmínek.** Erythrocyty byly inkubovány s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C) v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> nebo EDTA. Membránové proteiny byly izolovány v roztoku 1% laurylmaltosidu a rozděleny na modré nativní elektroforéze (BN-PAGE) na gradientovém 3-15% gelu (A) nebo 7,5% SDS-PAGE (B). Po rozdělení byly proteinové komplexy přeneseny na PVDF membránu a ACT byl označen pomocí myší monoklonální anti-ACT protilátky 9D4, která váže opakující se sekvence v C-koncové části toxinu (Lee *et al.*, 1999), a sekundární protilátky s navázanou peroxidázou.

Rozdíl v molekulové hmotnosti celistvé a štěpené formy ACT naznačil, že menší forma ACT odpovídá toxinu s odštěpenou adenylátcyklázovou (AC) doménou. K odštěpení AC domény může dojít například po translokaci AC domény přes erythrocytární membránu do cytozolu, kde jsou proteázy štěpící AC doménu (Rogel *et al.*, 1992). Rozhodli jsme se proto testovat přítomnost štěpené formy ACT bez AC domény v membránovém extraktu. Po rozdělení membránového extraktu na BN-PAGE a SDS-PAGE jsme k detekci ACT na Western blotech použili monoklonální protilátku 9D4, která váže opakující se sekvence v C-koncové části toxinu, a monoklonální protilátku 3D1,

jež specificky váže epitopy mezi aminokyselinami 373-400 v adenylátcyklázové doméně (Lee *et al.*, 1999). Jak je patrné z Obr. 31B, štěpená forma ACT nebyla v membránovém extraktu detekována protilátkou 3D1 proti AC doméně a odpovídá tudíž procesované formě ACT bez AC domény. V případě analýzy membránového extraktu na BN-PAGE odpovídala štěpená forma proužku o velikosti ~200 kDa (Obr. 31).

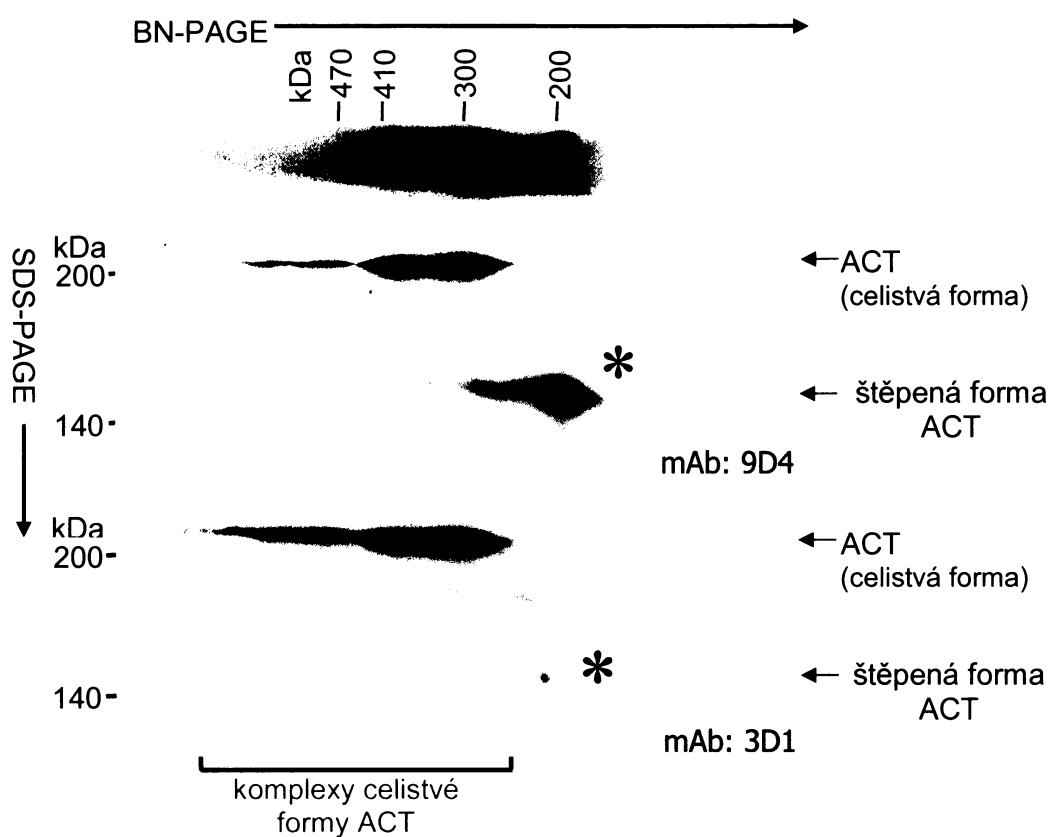


Detekce: 9D4 3D1

**Obr. 31: Detekce štěpené formy ACT bez adenylátcyklázové (AC) domény v membráně ovčích erytrocytů.** Ovčí erythrocyty byly inkubovány s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C, 2 mM Ca<sup>2+</sup>). Membránové proteiny byly izolovány pomocí 1% laurylmaltosidu a rozděleny na modré nativní elektroforéze (BN-PAGE) na gradientovém 3-15% gelu (A) nebo 7,5% SDS-PAGE (B). K detekci ACT po přenesení rozdělených proteinových komplexů na PVDF membránu byla použita myší monoklonální anti-ACT protilátka 9D4 rozeznávající opakující se sekvence v C-koncové části toxinu a anti-myší protilátka s navázanou peroxidázou. Po vyvolání Western blotů byla z PVDF membrány odstraněna protilátka 9D4 a detekce ACT byla zopakována stejným způsobem s myší monoklonální anti-ACT protilátkou 3D1, jež váže adenylátcyklázovou doménu.

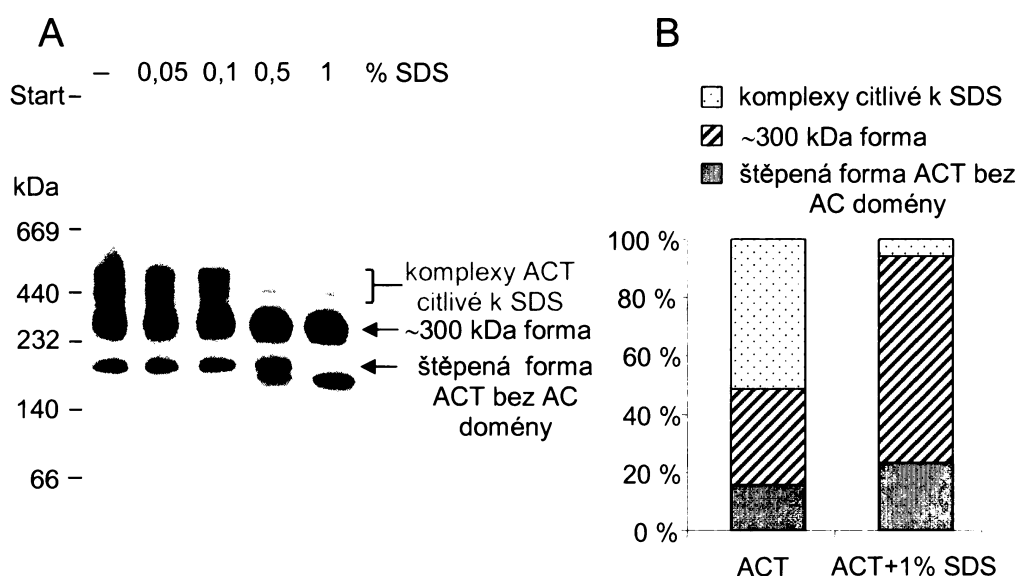
Zjistili jsme, že forma IV ACT (~200 kDa) detekovaná na BN-PAGE odpovídá štěpené molekule ACT, které chybí AC doména. Ostatní formy ACT (I-III) detekované na BN-PAGE obsahovaly celistvé molekuly ACT, protože byly pomocí protilátky 3D1 detekovány. Nebylo však možné vyloučit možnost, že některou z uvedených forem tvoří heterokomplex celistvé a štěpené formy ACT. K prověření této možnosti jsme proteinové

komplexy rozdělené na BN-PAGE vyřízli a proužek gelu přenesli na 5% SDS-PAGE, na které byly izolované proteinové komplexy rozděleny za denaturujících podmínek. Poté byl ACT opět detekován technikou Western blot (4.8.2.). Jak ukazuje Obr. 32, pouze forma IV ACT měla výrazně nižší molekulovou hmotnost na SDS-PAGE, zatímco všechny ostatní formy ACT vykazovaly pohyblivost, jež odpovídala celistvé formě ACT. Tyto výsledky ukázaly, že vysokomolekulové formy ACT pravděpodobně netvoří heterokomplexy štěpené a celistvé formy toxinu.



**Obr. 32: Vysokomolekulové formy detekované na BN-PAGE netvoří heterokomplexy štěpené a celistvé formy ACT.** Ovčí erythrocyty byly inkubovány s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C, 2 mM Ca<sup>2+</sup>). Proteinové komplexy byly extrahovány z membrány pomocí 1% laurylmaltosidu a 20 µl erythrocytárního lyzátu bylo rozděleno na modré nativní elektroforéze (BN-PAGE) na gradientovém 3-15% gelu. Po rozdělení na BN-PAGE byly proteinové komplexy znovu rozděleny na 5% SDS-PAGE, přeneseny na PVDF membránu a molekuly ACT byly detekovány myší anti-ACT monoklonální protilátkou 9D4 a anti-myší protilátkou s navázanou peroxidázou. Po vyvolání Western blotu byla z PVDF membrány odstraněna protilátka 9D4 a detekce ACT byla zopakována stejným způsobem s myší monoklonální anti-ACT protilátkou 3D1.

Pomocí BN-PAGE jsme v membránovém extraktu z erytrocytů detekovali komplexy ACT a ukázali jsme, že obsahují celistvé neštěpené molekuly ACT. Naproti tomu pomocí SDS-PAGE se nepodařilo žádné komplexy ACT detekovat (Rogel *et* Hanski, 1992; Rogel *et al.*, 1991; Rita Krumscheid, nepublikované výsledky; viz též obr. 30B). Tyto výsledky naznačily, že komplexy ACT jsou pravděpodobně citlivé k SDS. Rozhodli jsme se proto testovat účinek SDS na komplexy ACT izolované z erytrocytární membrány. Jak ukazuje Obr. 33A, se vzrůstajícím množstvím SDS, jež bylo přidáno k izolovaným proteinovým komplexům, došlo k rozpadu forem I a II ACT (~470 kDa a ~410 kDa). Na základě denzitometrické analýzy několika nezávislých Western blotů (Obr. 33A, n=3), jsme zjistili, že se tyto komplexy rozpadly na formu III ACT o velikosti ~300 kDa (Obr. 33B). To ukazuje, že forma I a II ACT představují homooligomery ACT (formy III) nebo heterokomplexy ACT s jinými erytrocytárními proteiny. Posledně jmenovaná možnost je ale méně pravděpodobná vzhledem ke skutečnosti, že ACT nerozeznává žádný proteinový receptor v erytrocytární membráně (Martin *et al.*, 2004; Mašín *et al.*, 2004). Po přidání 1% SDS k membránovému extraktu jsme dále detekovali změnu v pohyblivosti štěpené formy ACT (~200 kDa) na BN-PAGE (Obr. 33), jejíž zdánlivá molekulová hmotnost odpovídala ~170 kDa, a tedy i hmotnosti detekované po rozdělení membránového extraktu na SDS-PAGE. Naproti tomu pohyblivost formy III ACT (~300 kDa) po přidání SDS k membránovému extraktu zůstala nezměněna (Obr. 33).

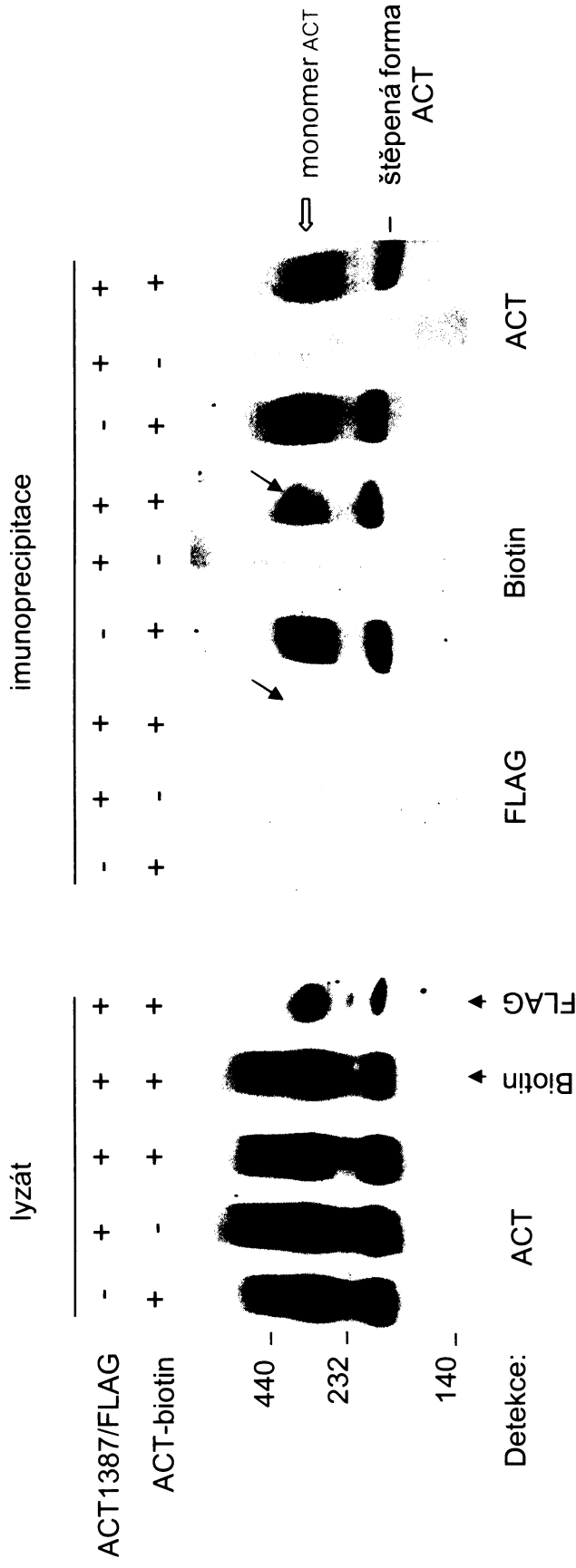


**Obr. 33: Vysokomolekulové komplexy ACT (forma I, ~410 kDa a forma II, ~470 kDa) se rozpadají v přítomnosti SDS. (A) Modrá nativní elektroforéza (BN-PAGE) membránových extraktů erytrocytů inkubovaných s ACT (25 µg/ml, 30 minut, 37 °C) v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> po působení uvedené koncentrace**

sodiumdodecylsulfátu (SDS). Proteinové komplexy byly rozděleny na BN-PAGE, přeneseny na PVDF membránu a molekuly ACT byly detekovány myší anti-ACT monoklonální protilátkou 9D4 a anti-myší protilátkou s navázanou peroxidázou. **(B)** Zastoupení jednotlivých forem ACT detekovaných na BN-PAGE před a po přidání 1% SDS k membránovému extraktu, jak bylo zjištěno na základě denzitometrické analýzy několika nezávislých Western blotů (n=3).

Doposud jsme zjistili, že formu III ACT, detekovanou na BN-PAGE jako proužek o velikosti ~300 kDa, tvoří nezkrácené molekuly ACT a že není citlivá k SDS, může tedy představovat buď aberantně migrující monomer ACT nebo velmi stabilní oligomer (dimer), jež je resistantní k SDS. Aberantní migrace toxinu na BN-PAGE může být způsobena zvýšenou vazbou detergentu, jež byla dříve pozorována u hydrofóbních membránových proteinů (Heuberger *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2001; Nicke *et al.*, 1998), na rozdíl od rozpustných proteinových komplexů používaných jako standardy molekulových hmotností. K otestování možnosti, zda forma III ACT (~300 kDa) představuje monomer nebo oligomer toxinu, jsme inkubovali ovčí erythrocyty se směsí biotinylovaného ACT (ACT-biotin) a ACT nesoucího FLAG epitop v pozici 1387 (ACT/FLAG1387), a provedli imunoprecipitaci biotinylovaného toxinu pomocí avidin-agarózy. Navázané komplexy na avidin-agaróze byly eluovány za nativních podmínek pomocí 2 mM biotinu, podrobeny analýze na BN-PAGE a ACT byl detekován technikou Western blot. Jak ukazuje Obr. 34, po imunoprecipitaci byl pomocí anti-ACT protilátky 9D4 detekován proužek o velikosti ~300 kDa (forma III) a štěpená forma ACT (~200 kDa). Avšak pokud jsme použili k detekci ACT specifickou anti-FLAG protilátku nedetekovali jsme přítomnost ACT/FLAG1387 ve formě III ACT (~300 kDa). Tento výsledek ukázal, že ~300 kDa forma ACT nepředstavuje dimer, ale velmi pravděpodobně aberantně migrující monomer ACT. Dále, jak ukazuje Obr. 16, vysokomolekulové formy I a II ACT (~470 kDa a ~410 kDa) nebyly po imunoprecipitaci detekovány. Tento výsledek naznačil, že se jedná o nestabilní komplexy ACT, které se rozpadnou pravděpodobně při promývání navázaných komplexů na avidin-agaróze.

Lze tedy shrnout, že na BN-PAGE představuje forma I a II ACT (~470 kDa a ~410 kDa) velmi pravděpodobně nestabilní oligomery toxinu, forma III ACT (~300 kDa) monomery toxinu a forma IV ACT (~200 kDa) molekuly ACT s odštěpenou AC doménou.

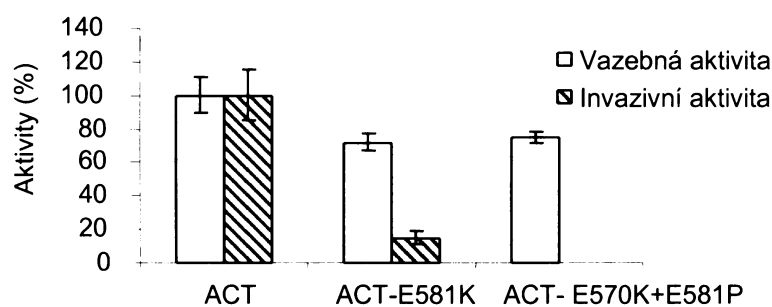


**Obr. 34: Forma ACT detekovaná jako ~300 kDa protein na BN-PAGE představuje monomery ACT.** Ověřeny erytrocyty byly inkubovány s biotinylovaným ACT (ACT-biotin, 25 µg/ml), ACT1387/FLAG (25 µg/ml) a směsí ACT-biotin a ACT1387/FLAG (12,5 µg/ml:12,5 µg/ml) po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Membránové proteinové komplexy byly extrahovány pomocí 1% laurylmaltosidu a inkubovány s avidin-agarózou (2 hodiny, 4 °C). Navázané proteinové komplexy byly eluovány za nativních podmínek 2 mM biotinem, rozděleny na BN-PAGE a ACT byl detekován technikou Western blot. Levý panel ukazuje kontrolní detekci ACT v membránovém extraktu pomocí anti-ACT protilátky 9D4, konjugátem streptavidinu s peroxidázou (Biotin) a anti-FLAG protilátkou (FLAG). Pravá část obrázku ukazuje detekci ACT po imunoprecipitaci. Šipky označují ~300 kDa proužek, jež je detekován konjugátem streptavidinu s peroxidázou (Biotin), ale není detekován anti-FLAG protilátkou (FLAG).

### 5.1.5. Množství oligomerů ACT vytvořené v membráně odpovídá specifické hemolytické aktivitě toxinu

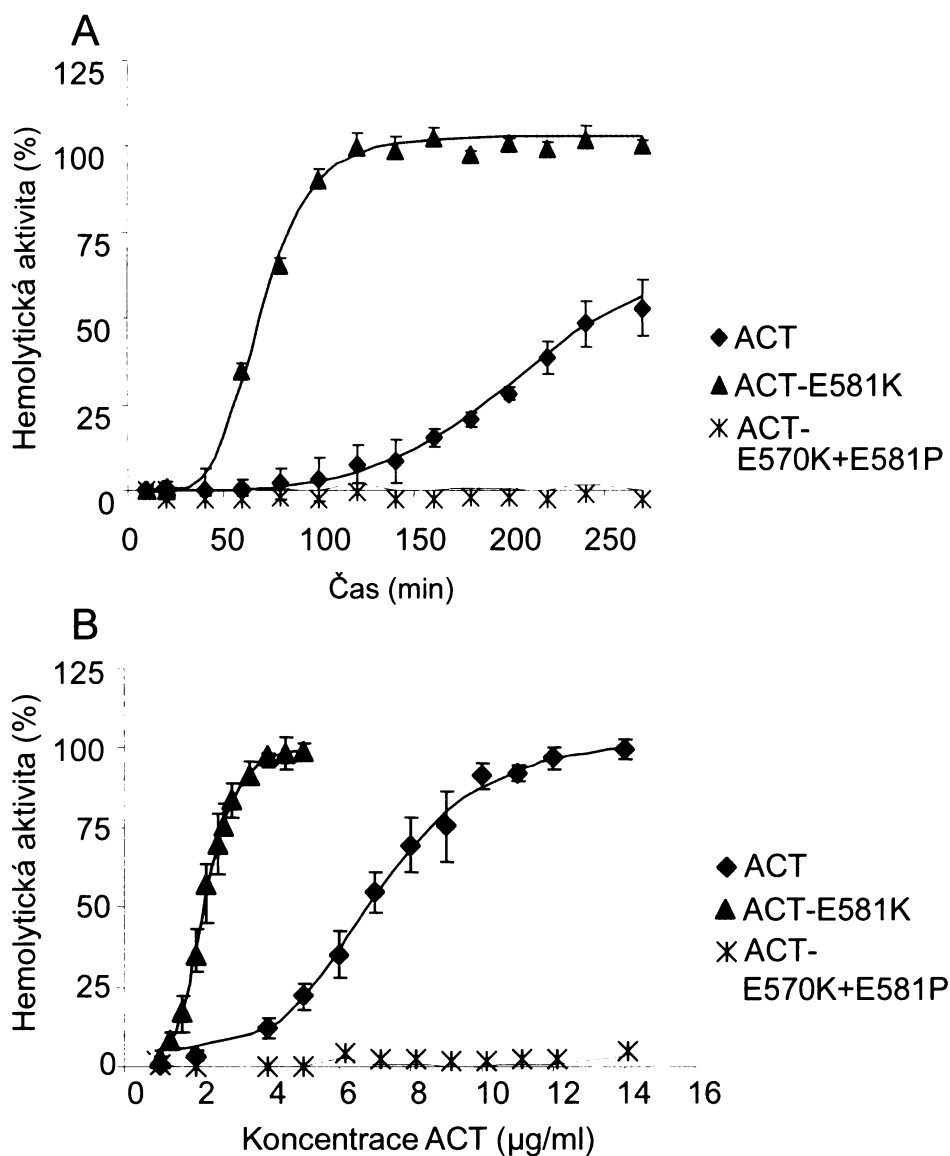
Pomocí techniky BN-PAGE jsme detekovali v membráně ovčích erytrocytů komplexy ACT (formy I-II o velikosti ~470 kDa a ~410 kDa), jež velmi pravděpodobně představují oligomery ACT. Existuje řada nepřímých důkazů o tom, že oligomerizace ACT je nezbytná pro tvorbu pórů (kanálů) v membráně (Benz *et al.*, 1994b; Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Iwaki *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994). Rozhodli jsme se proto porovnat tvorbu oligomerů u nemutovaného typu ACT s množstvím oligomerů, které tvoří mutanty ACT (ACT-E581K a ACT-E570K+E581P), jež mají zvýšenou nebo sníženou specifickou hemolytickou aktivitu, a tedy i schopnost tvořit póry. Tyto mutanty (ACT-E581K a ACT-E570K+E581P) připravil Ing. Marek Basler v rámci přípravy série mutantních forem ACT s bodovou mutací v hydrofóbní doméně (Basler *et al.*, 2006).

ACT a jeho mutanty byly exprimovány v *E. coli*, purifikovány a jejich vazebná, invazivní a hemolytická aktivita byla testována na modelu ovčích erytrocytů. Jak ukazuje Obr. 35, ve srovnání s výchozím ACT měly mutantní formy toxinu o 25 % sníženou vazebnou aktivitu na ovčí erytrocyty. Jejich invazivní aktivita, tedy schopnost přenést svou adenylátcyklázovou (AC) doménu do cytozolu a indukovat tvorbu cAMP, byla u mutantního toxinu ACT-E581K snížena (15 % aktivity nemutovaného typu toxinu) a u mutanty ACT-E570K+E581P byla neměřitelná. Mutanta ACT-E570K+E581P rovněž nezpůsobovala lyzi erytrocytů, zatímco mutanta ACT-E581K způsobovala při navázání stejného množství toxinu mnohem rychlejší lyzi erytrocytů než nemutovaný typ ACT (Obr. 36A) a k dosažení úplné lyze erytrocytů za stejnou dobu stačila asi 5× nižší koncentrace toxinu ACT-E581K než u původního ACT (Obr. 36B).



**Obr. 35: Vazebná a invazivní aktivita ACT-E581K a ACT-E570K+E581P.** Ovčí erytrocyty byly inkubovány s 2,5 µg/ml toxinu při teplotě 37 °C po dobu 30 min. Vazebná aktivita toxinu byla stanovena podle adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu na membráně erytrocytů. Invazivní aktivita byla

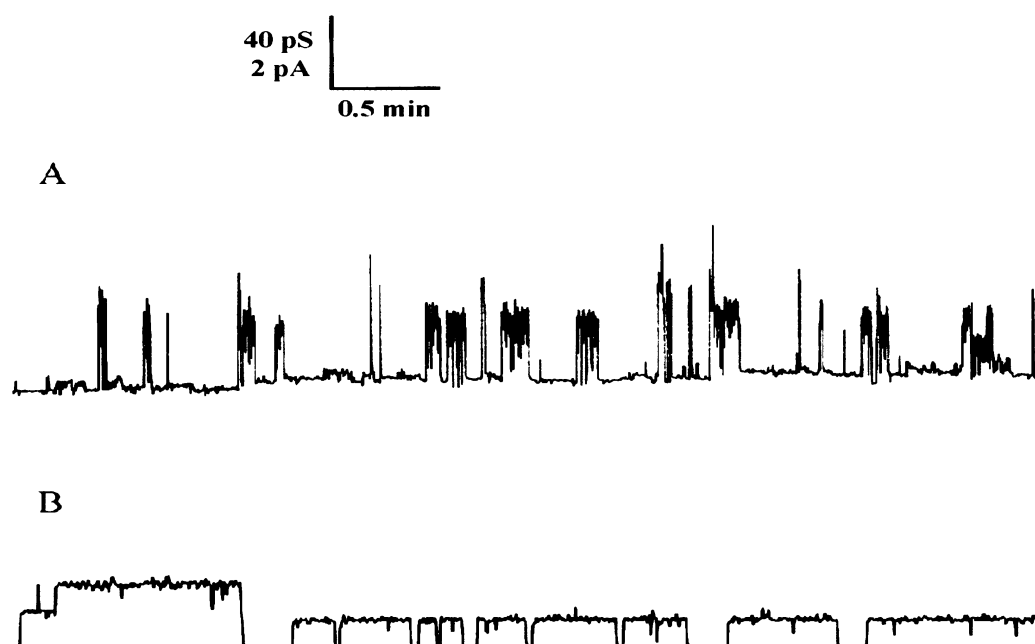
stanovena podle množství cAMP vytvořeného v cytozolu erytrocytů po inkubaci s toxinem. Hodnoty jsou vyjádřeny jako relativní aktivity vůči nemutovanému typu toxinu a odpovídají průměrům ze tří nezávislých experimentů s nezávislými preparáty toxinů, které byly provedeny v duplikátech. Chybová úsečka označuje standardní odchylku (n=6).



**Obr. 36: Mutanta ACT-E581K má zvýšenou specifickou hemolytickou aktivitu než nemutovaný typ toxinu, zatímco mutanta ACT-E570K+E581P nemá hemolytickou aktivitu. (A)** Časová závislost hemolytické aktivity. Ovčí erythrocyty ( $5 \times 10^8$  buněk/ml) byly inkubovány s 0,8 U/ml ACT, 1 U/ml ACT-E581K nebo 1 U/ml ACT-E570K+E581P při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Za těchto podmínek došlo k navázání stejného množství toxinu na erythrocyty (0,8 mU/ml). **(B)** Koncentrační závislost hemolytické aktivity. Ovčí erythrocyty byly inkubovány s uvedenou koncentrací toxinu při teplotě 37 °C po dobu 270 minut. Hemolytická aktivita toxinu byla stanovena za základě měření absorbance ( $\lambda=541$  nm) uvolněného hemoglobinu z erythrocytů. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech divokého typu ACT a odpovídají průměrům ze tří nezávislých experimentů s nezávislými preparáty toxinů, které byly provedeny v triplikátech. Chybová úsečka označuje standardní odchylka (n=9).



V laboratoři prof. Roleta Benze (Würzburg, Německo) byly dále analyzovány vlastnosti pórů, jež tvořil ACT a jeho mutanty ACT-E581K a ACT-E570K+E581P v uměle připravené lipidové membráně. Ukázalo se, že na rozdíl od divokého typu ACT tvoří mutanta ACT-E581K, jež má vyšší hemolytickou aktivitu, póry s nižší vodivostí ale zároveň s výrazně delší dobou otevření (Obr. 37; Tabulka V). S tvorbou déle otevřených kanálů souvisela také vyšší membránová aktivita (celková vodivost kanálů vytvořených v membráně) mutanty ACT-E581K v porovnání s divokým typem ACT (Tabulka V). Navíc při stejné koncentraci toxinu tvořila mutanta ACT-E581K v membráně kanály s vyšší frekvencí než divoký typ toxinu. Naproti tomu u nehemolytické mutanty ACT-E570K+E581P byl vznik kanálů pozorován zcela ojediněle a membránová aktivita ACT-E570K+E581P byla velmi nízká (Tabulka V). Také vodivost kanálů u mutanty ACT-E570K+E581P byla snížena, ale doba otevření kanálů byla stejná jako u nemutovaného typu toxinu (Tabulka V). Tyto výsledky ukázaly, že zvýšená hemolytická aktivita mutanty ACT-E581K je způsobená častější tvorbou a delší dobou otevření vzniklých kanálů v membráně v porovnání s divokým typem toxinu. Naopak ztráta hemolytické aktivity u mutanty ACT-E570K+E581P souvisí se sníženou kapacitou vytvářet kanály v membráně.



**Obr. 37: Mutanta ACT-E581K, jež má vyšší hemolytickou aktivitu, tvoří v uměle připravené membráně kanály s nižší vodivostí ale s delší dobou otevření než nemutovaný typ ACT. Záznam tvorby kanálů v uměle připravené lipidické membráně z asolektinu po přidání nemutovaného typu ACT (13 ng/ml) (A) nebo více hemolytické mutanty ACT-E581K (13 ng/ml) (B) při teplotě 20 °C. Vložený membránový potenciál byl -50 mV.**

Tabulka V

Membránová aktivita, vodivost a poločas otevření kanálů u ACT, ACT-E581K a ACT-E570K+E581P

ACT	Membránová aktivita <sup>a</sup>	Vodivost kanálu <sup>b</sup> [pS]	Poločas otevření <sup>c</sup> [s]
ACT	+++ (+)	50	2.8
ACT-E581K	+++++	22	10.5
ACT-E570K+E581P	+	24	2.2

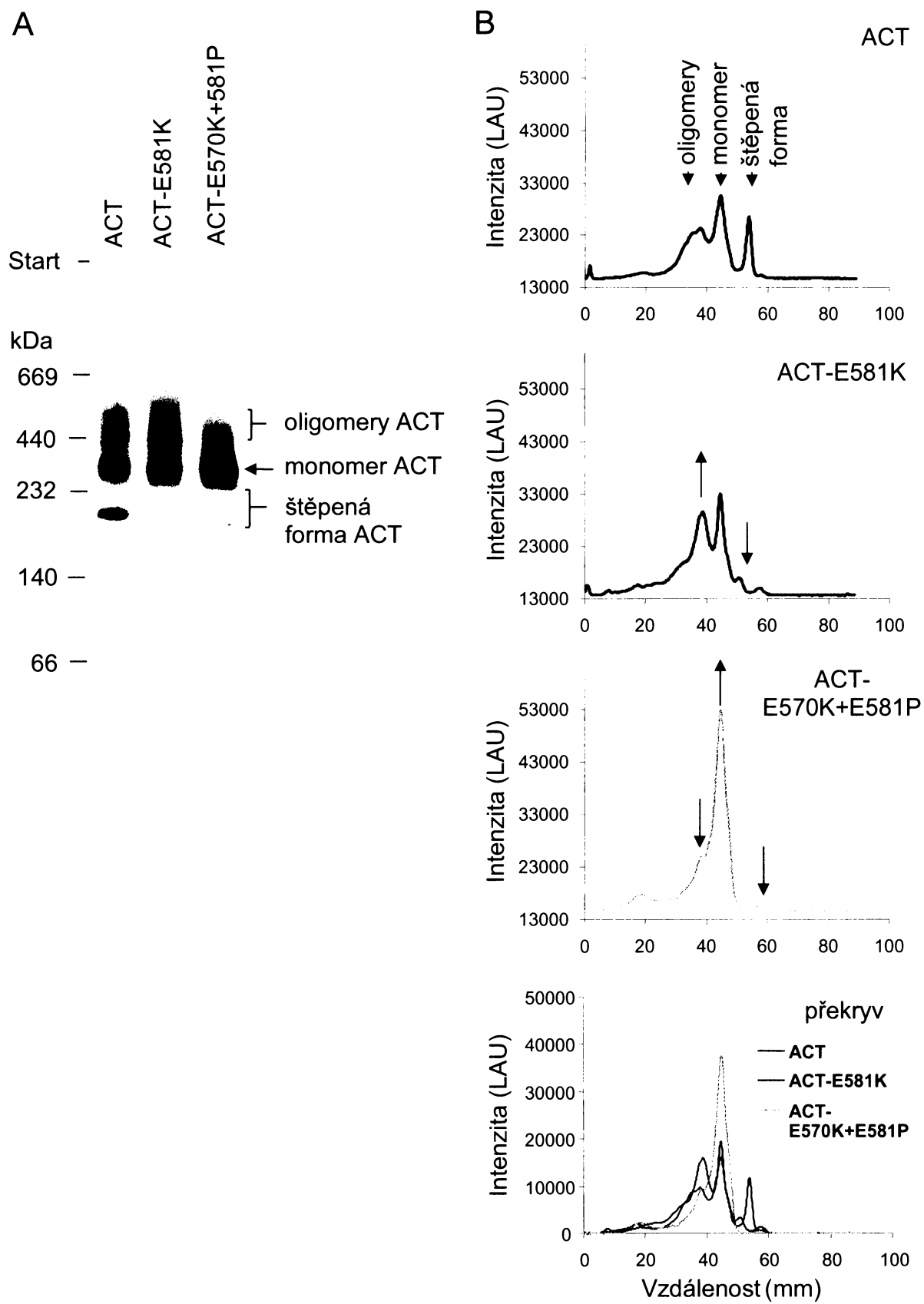
<sup>a</sup> Membránová aktivita byla stanovena při koncentraci toxinu 13 ng/ml a odpovídá celkové vodivosti vzniklých kanálů, jež byla změřena po 30-ti minutách od přidání toxinu k uměle připravené membráně z asolektinu (0,5 mm<sup>2</sup>). Vložený membránový potenciál byl -50 mV a teplota 20 °C. Počet znamének plus (+) vyjadřuje přibližně hodnotu logaritmu celkové vodivosti kanálů vytvořených za uvedených podmínek v membráně.

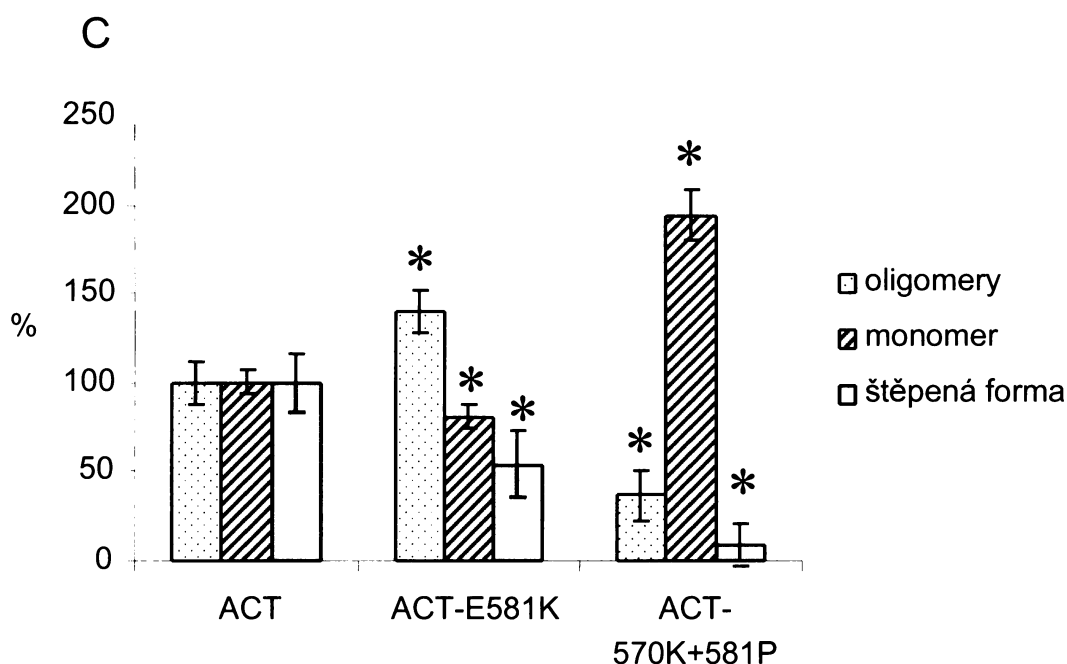
<sup>b</sup> Průměrná vodivost kanálu měřená v prostředí 1 M KCl (pH 7) byla spočítána pro nemutovaný typ ACT z 99 naměřených hodnot, pro ACT-E581K ze 166 naměřených hodnot a pro ACT-E570K+E581P ze 36 naměřených hodnot. Hodnoty vodivosti byly získány ze dvou nezávislých měření s různými preparáty toxinu.

<sup>c</sup> Výpočet poločasu otevření kanálu byl proveden z exponenciální funkce  $N=N_0 \times e^{(-t/\tau)}$ , jež byla proložena histogramem četností kanálů (N) v závislosti na době otevření kanálu (t).  $N_0$  odpovídá teoretické četnosti kanálů s nulovou dobou otevření a  $\tau$  je poločas otevření kanálu.

Pokud tvorba a otevření kanálů v membráně závisí na oligomerizaci ACT, potom lze očekávat zvýšenou tvorbu oligomerů u více hemolytické mutanty ACT-E581K, která tvořila kanály s vyšší frekvencí a delším poločasem otevření, a tedy pravděpodobně i stabilnější než divoký typ toxinu. Na druhé straně, lze v případě nehemolytické mutanty ACT-E570K+E581P očekávat sníženou tvorbu oligomerů vzhledem k její velmi nízké membránové aktivitě v porovnání s ACT. K otestování této hypotézy jsme porovnali tvorbu oligomerů ACT (forem I a II o velikosti ~410 kDa a ~470 kDa) detekovaných na BN-PAGE u divokého typu toxinu, více hemolytické mutanty ACT-E581K a

nehemolytické mutanty ACT-E570K+E581P. Množství jednotlivých forem ACT u nemutovaného typu toxinu a jednotlivých mutant jsme určili na základě denzitometrické analýzy několika nezávislých Western blotů (n=9). Jak ukazuje Obr. 38, mutanta ACT-E581K mající vyšší hemolytickou aktivitu tvořila více oligomerů a méně monomerů a méně zkrácené formy toxinu než nemutovaný typ toxinu. Tento výsledek naznačil, že vyšší hemolytická aktivita toxinu je daná vyšší schopností toxinu tvořit oligomery. Rovněž snížená tvorba zkrácené formy toxinu u ACT-E581K (Obr. 38A), odpovídala nízké invazivní aktivitě toxinu v porovnání s divokým typem ACT. Naproti tomu, nehemolytická mutanta ACT-E570K+E581P tvořila výrazně méně oligomerů a také zkrácené formy toxinu než divoký typ toxinu a byla přednostně detekována ve formě monomeru (Obr. 38). Tento výsledek naznačil, že ztráta hemolytické a invazivní aktivity u mutanty ACT-E570K+E581P negativně koreluje s existencí (tvorbou) oligomerů a zkrácené formy toxinu v membráně. Dohromady tyto výsledky velmi silně podpořily hypotézu, že oligomerizace ACT je nezbytná pro tvorbu resp. otevření kanálů v membráně, zatímco přenesení AC domény přes membránu zprostředkovávají monomery toxinu.





**Obr. 38: Specifická hemolytická aktivita toxinu koreluje s množstvím izolovaných oligomerů ACT z membrány ovčích erytrocytů.** (A) Nativní modrá polyakrylamidová elektroforéza (BN-PAGE) komplexů ACT izolovaných z ovčích erytrocytů po inkubaci s ACT, ACT-E581K nebo ACT-E570K+E581P (25  $\mu$ g/ml, 30 minut, 37  $^{\circ}$ C). Gradientový 3-15 % gel. Detekce ACT byla provedena metodou Western blot pomocí myší anti-ACT mAb 9D4 (Lee *et al.*, 1999) a anti-myší mAb s navázanou peroxidázou. (B) Kvantifikace jednotlivých forem toxinu pro nemutovaný typ ACT, ACT-E581K a ACT-E570K+E581P v dráze rozdělených membránových extraktů na BN-PAGE po 1-D denzitometrické analýze Western blotu (Obr. 20A). Směr šipek označuje nárůst nebo snížení dané formy. Překryv ukazuje změny v relativním množství oligomerů, monomeru a zkrácených forem toxinu po odečtení pozadí. (C) Množství oligomerů, monomerů a zkrácených forem toxinu u nemutovaného typu ACT, ACT-E581K a ACT-E570K+E581P. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní hodnoty vůči divokému typu ACT a představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD získané po 1-D denzitometrické analýze devíti nezávislých Western blotů. Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) v tvorbě jednotlivých forem toxinu u nemutovaného typu ACT a mutanty ACT-E581K nebo ACT-E570K+E581P, který byl zjištěný neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem.

## 5.2. Vazba ACT do specifických oblastí v membráně erytrocytů

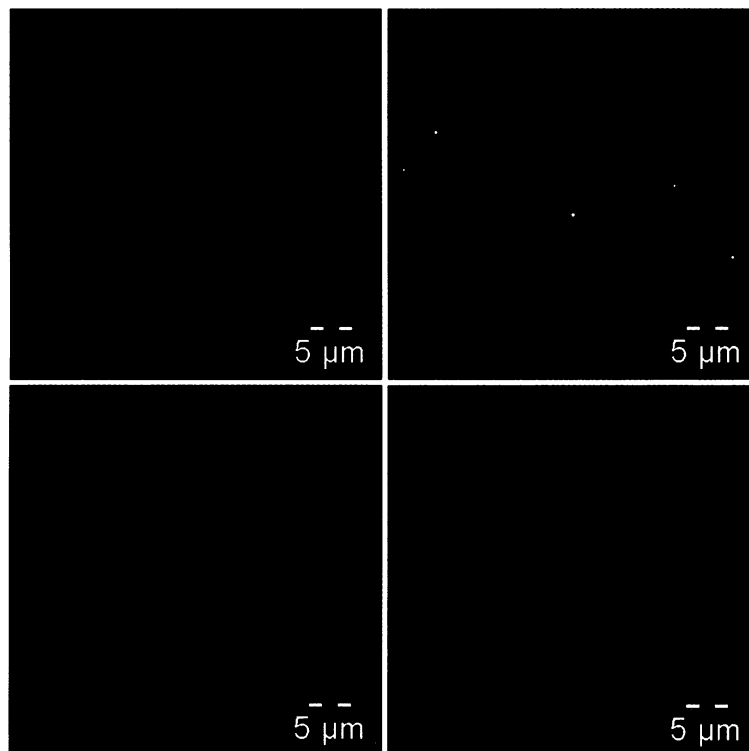
### 5.2.1. Tvorba shluků molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů není závislá na laterální pohyblivosti molekul toxinu v membráně

Předchozí výsledky ukázaly, že molekuly ACT se nacházejí v membráně ovčích erytrocytů ve shlucích, v rámci kterých velmi pravděpodobně dochází k oligomerizaci toxinu a tvorbě pórů. Tvorba shluků molekul toxinu v membráně byla pozorována také u jiných typů toxinů tvořících póry (Nguyen *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2000; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2003). Ke tvorbě shluků může docházet buď nepřímo díky laterální pohyblivosti navázaných molekul toxinu na membráně nebo v důsledku přednostní vazby molekul toxinu do určitých specifických oblastí v membráně, což usnadní oligomerizaci toxinu a tvorbu pórů (Abrami *et van Der Goot*, 1999). Rozhodli jsme se proto tvorbu shluků molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů dále studovat.

Nejprve jsme detekovali shluky molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů pomocí fluorescenční mikroskopie. Erytrocyty byly inkubovány s ACT232/FLAG v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Po inkubaci byly nenavázané molekuly ACT odstraněny promytím erytrocytů v karbonátovém pufru (0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 150 mM NaCl, pH 11,5) (Fujiki *et al.*, 1982; Rogel *et Hanski*, 1992) a polovina každého vzorku byla fixována glutaraldehydem<sup>4</sup>. Molekuly ACT232/FLAG navázané na membráně erytrocytů byly poté označeny specifickou anti-FLAG protilátkou a protilátkou s navázanou fluorescenční barvou (FITC). Zatímco v případě inkubace erytrocytů s ACT v přítomnosti 5 mM EDTA nebyl detekován na membráně žádný signál (Obr. 39A, C), v případě inkubace erytrocytů v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  byly na nefixovaných i na fixovaných erytrocytech detekovány zřetelně ohraničené shluky fluorescenčně označených molekul ACT (Obr. 39B, D). Tento výsledek ukázal, že pomocí fluorescenční mikroskopie lze prokázat shluky molekul ACT v membráně a že jejich tvorba není způsobena uměle vyvolaným shlukováním molekul ACT v membráně po navázání protilátek.

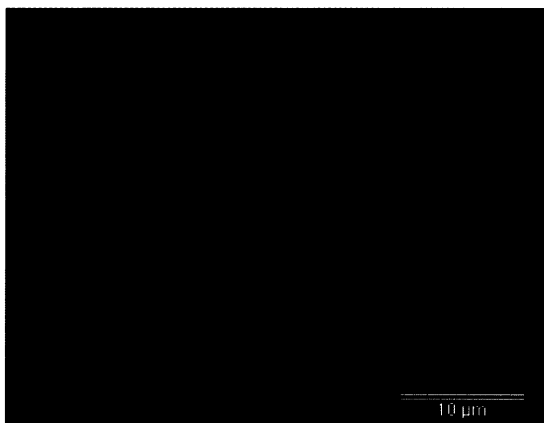
---

<sup>4</sup> Glutaraldehyd je účinné síťovací činidlo, které kovalentně propojí přítomné proteiny (Griffiths, 1993), a tak zabrání jejich možnému shlukování po navázání protilátek.



**Obr. 39: Detekce shluků molekul ACT v membráně fluorescenční mikroskopií.** Oví erythrocyty byly inkubovány s ACT233/FLAG (25  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) a navázané molekuly ACT233/FLAG byly nepřímo označeny anti-FLAG protilátkou a IgG-FITC. **(A)** Kontrolní detekce ACT233/FLAG na erythrocytech inkubovaných s toxinem v přítomnosti 5 mM EDTA. Nefixovaný vzorek. **(B)** Detekce shluků molekul ACT233/FLAG v membráně erythrocytů inkubovaných s toxinem v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Nefixovaný vzorek. **(C)** Kontrolní detekce ACT233/FLAG na erythrocytech inkubovaných s toxinem v přítomnosti 5 mM EDTA. Fixovaný vzorek. **(D)** Detekce shluků molekul ACT233/FLAG v membráně erythrocytů inkubovaných s toxinem v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . Fixovaný vzorek.

Dále jsme se rozhodli ověřit vliv laterální pohyblivosti navázaných molekul ACT na tvorbu shluků v membráně. Pro tento účel jsme inkubovali ovčí erythrocyty s ACT232/FLAG při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$ , kdy je laterální pohyblivost proteinů v membráně nízká (Hillman *et* Schlessinger, 1982). Navázané molekuly ACT232/FLAG byly označeny protilátkami (viz výše) a erythrocyty byly analyzovány ve fluorescenčním mikroskopu. Jak ukazuje Obr. 40, rovněž v případě inkubace erythrocytů s ACT při teplotě 4  $^{\circ}\text{C}$  byly v membráně detekovány shluky molekul ACT. Tento výsledek ukázal, že tvorba shluků molekul ACT není závislá na laterální pohyblivosti navázaných molekul toxinu v membráně.

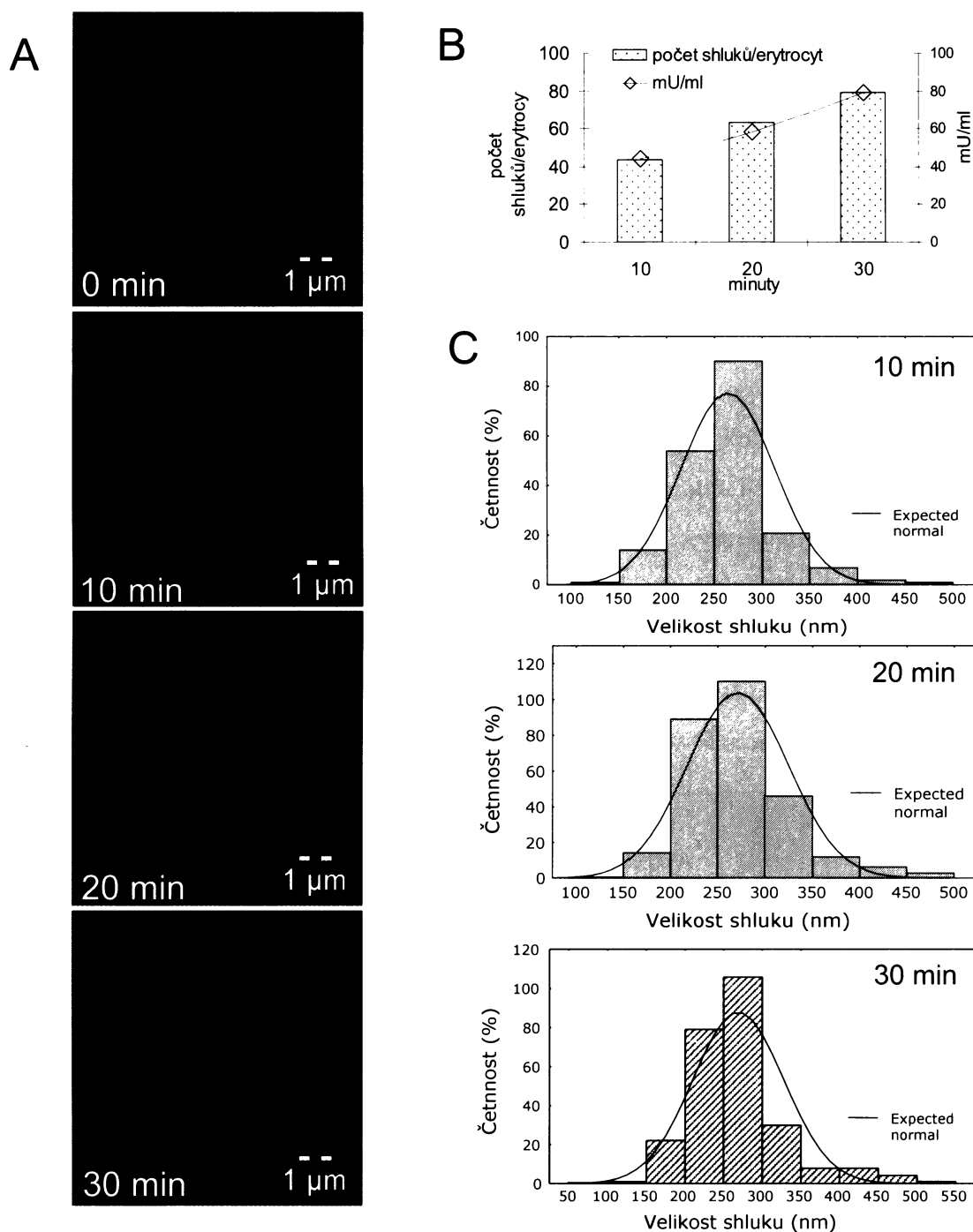


**Obr. 40: Tvorba shluků molekul ACT v membráně není závislá na teplotě.** Ovčí erythrocyty byly inkubovány s ACT233/FLAG (65  $\mu\text{g/ml}$ , 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) a molekuly toxinu byly nepřímo označeny anti-FLAG protilátkou a IgG-FITC. Fluorescenční mikroskopie. Fixovaný vzorek.

### 5.2.2. Shluky molekul ACT v membráně ovčích erythrocytů mají konstantní stechiometrii

Zajímalo nás, jak se mění velikost shluků molekul ACT v membráně a jejich počet v závislosti na čase a množství navázaného toxinu v membráně. Ovčí erythrocyty byly proto inkubovány s ACT232/FLAG v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA po dobu 10, 20 a 30 minut ve 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nenavázané molekuly ACT232/FLAG byly odstraněny (viz výše) a množství navázaného toxinu bylo stanoveno podle adenylátcyklázové aktivity asociované s erythrocyty (4.6.2.). Na základě známé specifické aktivity toxinu (U/mg) jsme rovněž stanovili počet navázaných molekul ACT připadajících na jeden erythrocyt (4.6.2.). Navázané molekuly ACT232/FLAG byly označeny nepřímo specifickou anti-FLAG protilátkou a sekundární protilátkou s navázanou fluorescenční barvou Cy3 a erythrocyty byly analyzovány v konfokálním mikroskopu. U náhodně vybraných erythrocytů ( $n=10$ ) jsme pro každou dobu inkubace stanovili průměrnou velikost shluků a jejich počet na erythrocyt. Jak je patrné z Obr. 41, množství navázaného toxinu a počet detekovaných shluků rostl v závislosti na době inkubace erythrocytů s ACT. Naproti tomu velikost detekovaných shluků nebyla závislá na čase (Obr. 41A) a odpovídala  $\sim 270$  nm. Rovněž počet molekul ACT tvořící jeden shluk byl nezávislý na čase a jeho průměrná hodnota odpovídala 20 molekulám toxinu. Dohromady tyto výsledky ukázaly konstantní stechiometrii shluků molekul ACT v membráně ovčích erythrocytů. Ta mohla být způsobená buď vazbou velkých, předem vytvořených komplexů ACT do membrány nebo přednostní vazbou molekul ACT do určitých specifických oblastí v membráně. Tato druhá možnost se jeví jako pravděpodobnější, protože již dříve bylo ukázáno, že komplexy ACT vytvořené v roztoku nejsou biologicky aktivní (Rogel *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1989).

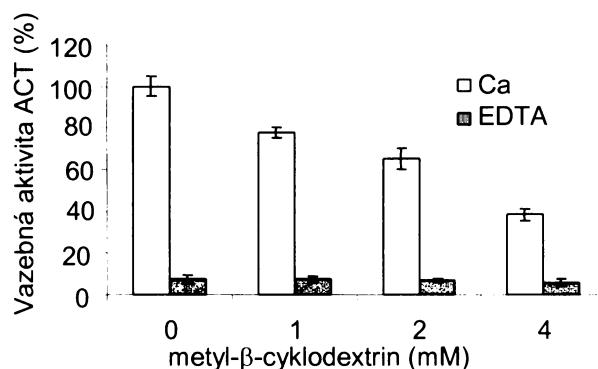




**Obr. 41: Množství shluků molekul ACT v membráně roste s časem, zatímco jejich velikost je nezávislá na čase.** (A) Ukázka celkové projekce ovčího erythrocytu po inkubaci s ACT233/FLAG (65 μg/ml, 37 °C, 2 mM Ca<sup>2+</sup>) po dobu 0, 10, 20 a 30 minut. Navázané molekuly toxinu byly označeny anti-FLAG protilátkou a IgG-Cy3. Konfokální mikroskopie. (B) Počet shluků molekul ACT v membráně je závislý na čase. Počet shluků na erythrocyt byl analyzován na optických řezech deseti nezávisle vybraných erythrocytů a je vyjádřen jako průměr. Množství navázaného toxinu (mU/ml) bylo stanoveno podle průměrné navázané adenylátcyklázové aktivity na jeden erythrocyt. (C) Velikost shluků molekul ACT je nezávislá na čase. Distribuce velikostí shluků byla získána na základě analýzy celkových projekcí deseti nezávisle vybraných erythrocytů. Výsledky reprezentují dva nezávislé experimenty.

### 5.2.3. Odstranění cholesterolu z membrány ovčích erytrocytů vede ke snížení vazby ACT

Konstantní stechiometrie shluků molekul adenylátcyklázového toxinu v membráně naznačila, že se ACT váže do specifických oblastí v membráně erytrocytů. Rozhodli jsem se proto prověřit vazbu ACT do tzv. membránových mikrodomén (Simons *et Ikonen*, 1997), které se vyznačují tím, že jsou na rozdíl od okolní membrány obohaceny o sfingolipidy a cholesterol (kapitola 2.3.3.2). Vazbu ACT na erytrocyty jsme testovali v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA (negativní kontrola) po odstranění cholesterolu z membrány, což vede k narušení membránových mikrodomén (Moran *et Miceli*, 1998; Xavier *et al.*, 1998). K odstranění cholesterolu jsme použili metyl- $\beta$ -cyklodextrin (m $\beta$ CD). V porovnání s kontrolními erytrocyty, které nebyly inkubované s m $\beta$ CD, došlo u erytrocytů preinkubovaných s m $\beta$ CD ke snížení vazby ACT (Obr. 42), a to v závislosti na použité koncentraci m $\beta$ CD. Tento výsledek naznačil, že membránové mikrodomény v membráně ovčích erytrocytů se pravděpodobně účastní vazby ACT.

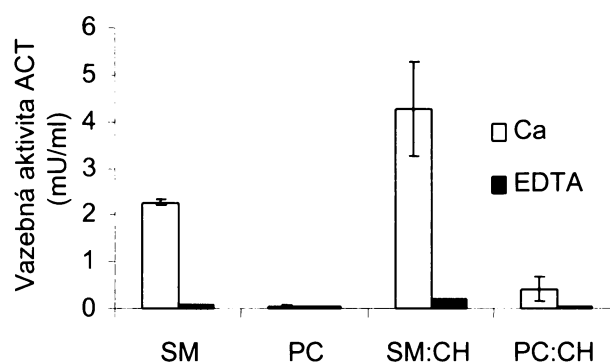


**Obr. 42: Odstranění cholesterolu z membrány ovčích erytrocytů snižuje vazbu ACT.** Ovčí erytrocyty byly preinkubovány s uvedenou koncentrací metyl- $\beta$ -cyklodextrinu, promyty a inkubovány s ACT233/FLAG (65  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min, 37 °C) v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Vazba ACT byla stanovena podle adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu na erytrocytech. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní hodnoty vůči kontrolním erytrocytům, jež nebyly inkubovány s metyl- $\beta$ -cyklodextrinem, a představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD (n=4) ze dvou nezávislých experimentů provedených v duplikátech.

### 5.2.4. ACT se nejvíce váže na lipozómy připravené ze sfingomyelinu a cholesterolu

Konstantní stechiometrie shluků molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů a především vliv cholesterolu na vazbu ACT naznačil, že se ACT váže do membránových

mikrodomén. Vzhledem ke skutečnosti, že ACT se neváže na proteinový receptor na membráně ovčích erytrocytů (Mašín *et al.*, 2004) lze předpokládat, že za cílenou vazbu toxinu do mikrodomén rozhodují lipidy. V nedávné době bylo zjištěno, že mikrodomény v membráně ovčích erytrocytů tvoří přednostně dva typy lipidů: sfingomyelin a cholesterol (Koumanov *et al.*, 2005). Rozhodli jsme se proto analyzovat vazbu ACT na uměle připravené membránové váčky (lipozómy). Lipozómy jsme připravili ze sfingomyelinu, směsi sfingomyelinu a cholesterolu, fosfatidylcholinu a směsi fosfatidylcholinu a cholesterolu. Fosfatidylcholin zde sloužil jako kontrola, protože má stejnou hydrofilní část (cholin) jako sfingomyelin, ale není přítomný v membránových mikrodoménách (Koumanov *et al.*, 2005). Lipozómy byly inkubovány s ACT v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  nebo EDTA a množství navázaného toxinu bylo odvozeno ze stanovení adenylátcyklázové aktivity toxinu asociovaného s erytrocyty (4.6.2.). Jak ukazuje Obr. 43, na lipozómech inkubovaných s ACT v přítomnosti EDTA jsme detekovali malé množství navázaného toxinu. Rovněž v případě lipozómů připravených z fosfatidylcholinu a inkubovaných s toxinem v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  byla vazba ACT nízká. Naproti tomu jsme detekovali zvýšenou vazbu ACT u lipozómů připravených ze směsi cholesterolu a sfingomyelinu a také u lipozómů připravených z čistého sfingomyelinu. Tyto výsledky ukázaly, že se ACT váže ve zvýšené míře na lipozómy připravené ze sfingomyelinu a cholesterolu, a tak naznačily možnost, že sfingomyelin a cholesterol může být odpovědný za vazbu na ACT na ovčí erytrocyty.



**Obr. 43: ACT se váže na lipozómy připravené ze sfingomyelinu a cholesterolu.** Lipozómy byly inkubovány s ACT (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 min, 25  $^{\circ}\text{C}$ ) v přítomnosti 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  nebo 5 mM EDTA. Vazba ACT byla stanovena podle množství navázané adenylátcyklázové aktivity. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry  $\pm$  SD ( $n=4$ ) ze dvou nezávislých experimentů, které byly provedeny v duplikátech. PC, fosfatidylcholin; PC:CH, fosfatidylcholin a cholesterol (1:1); SM, sfingomyelin; SM:CH, sfingomyelin a cholesterol (1:1).

### 5.3. Příprava sady toxoidů ACT nesoucích specifický CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop Male

Adenylátcyklázový toxin je toxický pro široké spektrum eukaryotických buněk. Jeho hlavním cílem *in vivo* jsou ale neutrofilové makrofágy a dendritické buňky, na jejichž povrchu rozpoznává a váže intergrin CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001). Makrofágy a dendritické buňky mají důležitou úlohu ve stimulaci antigeně specifické části imunitního systému, protože působí jako buňky prezentující antigen pro T lymfocyty (Hořejší *et Bartůňková*, 2002). Již dříve bylo ukázáno, že ACT byl schopen dopravit do buněk prezentujících antigen virové nebo nádorové epitopy, jež byly prezentovány na MHC gp I a stimulovaly cytotoxické CD8<sup>+</sup> T lymfocyty, které u myši indukovaly ochranu proti virové infekci nebo nádorům (Dadaglio *et al.*, 2003; Fayolle *et al.*, 1999; Osicka *et al.*, 2000; Saron *et al.*, 1997; Šebo *et al.*, 1995). Pro případné terapeutické využití ACT je ale v některých případech žádoucí stimulovat vedle cytotoxických T lymfocytů také pomocné T lymfocyty. Cílem této části dizertační práce bylo připravit sadu rekombinantních toxoidů ACT, jež budou v definovaných místech obsahovat modelový epitop Male pro stimulaci pomocných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů.

#### 5.3.1. Konstrukce mutantních ACT/Male

Při konstrukci rekombinantních toxinů nesoucích modelový CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop byla využita sada plazmidů pT7CACT1, jež měly v definovaném místě v genu *cyaA* pro adenylátcyklázový toxin vložené unikátní restrikční místo *BsrG* I (Osicka *et al.*, 2000). Do těchto míst byly vloženy dvouřetězcové syntetické oligonukleotidy, které kódovaly modelový CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop o aminokyselinovém složení NGKLIAYPIAVEALS z proteinu Male bakterie *E.coli* (Lo-Man *et al.*, 2000). Vzhledem ke tomu, že restrikční místo *BsrG* I bylo vloženo v různých místech čtecího rámce genu *cyaA*, byly navrženy tři různé typy oligonukleotidů, tak aby nebyla porušena fáze čtení (4.4.10.). Vkládané oligonukleotidy obsahovaly na 5'-koncích sekvenci komplementární k sekvenci 3'-linearizovaného plazmidu pT7CACT1, nové restrikční místo *Hind* III pro rychlou identifikaci klonů s vloženým epitopem a stop kodón, který byl přepisován v případě, když

došlo k vložení oligonukleotidu v opačné orientaci. Správné vložení oligonukleotidu bylo ověřeno sekvenováním příslušné části genu *cyaA*.

### 5.3.2. Kontrola produkce ACT/MalE proteinů

Získané rekombinantní deriváty plazmidu pT7CACT1 byly použity pro expresi ACT/MalE proteinů v buňkách *E.coli* XL-1 Blue. Proteiny ACT/MalE byly po rozbití buněk extrahovány 8M roztokem močoviny (4.5.1.) a pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) bylo ověřeno, že jednotlivé mutantní ACT jsou produkovány ve správné velikosti. Zároveň s ACT/MalE proteiny byl připravován také původní nemutovaný toxin.

### 5.3.3. Vazebná, invazivní a hemolytická aktivita ACT/MalE proteinů

Močovinové extrakty ACT/MalE proteinů byly naředěny na stejnou adenylátcyklázovou aktivitu (U/ml, 4.6.1.) a na modelu ovčích erytrocytů byla charakterizována jejich vazebná, invazivní a hemolytická aktivita (Tabulka VI).

Tabulka VI

Vazebná, invazivní a hemolytická aktivita proteinu ACT/MalE

ACT	Vazebná aktivita <sup>a,b</sup> (%)	Invazivní AC aktivita <sup>a,c</sup> (%)	Hemolytická aktivita <sup>a,d</sup> (%)
Původní ACT	100 ± 11	100 ± 12	100 ± 15
ACT108/MalE	97 ± 12	99 ± 10	98 ± 13
ACT133/MalE	96 ± 11	98 ± 12	95 ± 17
ACT233/MalE	100 ± 8	98 ± 13	99 ± 8
ACT336/MalE	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	96 ± 9
ACT424/MalE	90 ± 15	99 ± 6	111 ± 20

ACT594/MalE	75 ± 23	<2	20 ± 5
ACT607/MalE	61 ± 18	15 ± 8	80 ± 34
ACT751/MalE	83 ± 11	93 ± 8	99 ± 15
ACT926/MalE	0	0	0
ACT1334/MalE	88 ± 15	90 ± 11	99 ± 8
ACT1648/MalE	100 ± 9	98 ± 12	88 ± 7

<sup>a</sup>Všechny aktivity proteinů ACT/MalE byly měřeny na modelu ovčích erytrocytů a jsou vyjádřeny jako relativní aktivity nemutovaného typu toxinu.

<sup>b</sup>Ovčí erytrocyty byly inkubovány s 1 U/ml toxinu po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Vazebná aktivita ACT byla stanovena podle adenylátcyklázové aktivity navázaného toxinu na erytrocytech.

<sup>c</sup>Invazivní aktivita vyjadřuje schopnost toxinu přenášet svou adenylátcyklázou doménu do cytosolu. Ovčí erytrocyty byly inkubovány s 1 U/ml toxinu po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Invazivní aktivita byla stanovena podle postupu popsaném v kapitole 4.6.3.

<sup>d</sup>Hemolytická aktivita toxinu byla stanovena podle množství uvolněného hemoglobinu z erytrocytů po inkubaci s 1 U/ml toxinu za 270 minut při teplotě 37 °C.

<sup>e</sup>ND, nelze určit vzhledem k neměřitelné adenylátcyklázové aktivitě.

#### 5.3.4. Detoxifikace ACT/MalE proteinů

Předtím než byly proteiny ACT/MalE použity na testování stimulace pomocných T lymfocytů, bylo u nich nezbytné zrušit adenylátcyklázovou aktivitu, jež je toxická pro buňky prezentující antigen. Zrušení adenylátcyklázové aktivity jednotlivých proteinů ACT/MalE bylo provedeno vložением dipeptidu CysThr mezi aminokyselinové zbytky 188 a 189 v adenylátcyklázové doméně, jež představuje vazebné místo pro ATP (Ladant *et al.*, 1992). Detailní postup detoxifikace proteinů ACT/MalE je popsán v kapitole 4.4.11.

#### 5.3.5. Purifikace detoxifikovaných ACT/MalE proteinů

Získané deriváty plazmidu pT7CACT1 nesoucí gen *cyaA* s vloženým oligonukleotidem kódujícím epitop MalE a s vloženou sekvencí kódující dipeptid CysThr v adenylátcyklázové doméně byly použity pro expresi jednotlivých proteinů ACT/MalE v buňkách *E.coli* XL-1 Blue. Proteiny ACT/MalE byly z buněk extrahovány 8M roztokem močoviny a k jejich purifikaci byla nejprve použita chromatografie na DEAE-Sepharóze a poté chromatografie na Phenyl-Sepharóze. Analýza jednotlivých purifikovaných ACT/MalE toxinů v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) je zobrazena na Obr. 44.



**Obr. 44. SDS-PAGE analýza purifikovaných toxoidů ACT/MalE.** Z močovinných extraktů byly proteiny purifikovány na DEAE-Sepharóze a Phenyl-Sepharóze. Množství 2,5  $\mu\text{g}$  ACT/MalE bylo elektroforeticky rozděleno na 7,5% polyakrylamidovém gelu a barveno pomocí Coomassie Brilliant Blue R250.

### 5.3.6. Studium schopnosti toxoidů ACT/MalE dopravovat vložený epitop MalE do buněk prezentujících antigen a stimulovat specifickou $\text{CD4}^+$ T-buněčnou imunitní odpověď

Připravené toxoidy ACT/MalE byly zaslány do spolupracující laboratoře Dr. Claude Leclerc (Institut Pasteur, Francie), kde byla nejprve u buněk prezentujících antigen studována jejich schopnost dopravovat epitop MalE do dráhy zajišťující jeho zpracování a prezentaci na MHC gp II *in vitro*.

Myší splenocyty (buňky prezentující antigen) byly inkubovány s ACT toxoidy. Poté byly myší splenocyty inkubovány s hybridomovou linií CRMC3 nebo FBCD1 T lymfocytů, která specificky rozpoznává komplexy molekul MHC gp II s navázaným epitopem MalE na povrchu buněk prezentujících antigen. Stimulace T lymfocytů myšími splenocyty byla poté sledována jako produkce interleukinu 2. Zatímco splenocyty inkubované s kontrolním ACT, který nenesl vložený epitop MalE, nestimulovaly uvolňování interleukinu 2, splenocyty inkubované s toxoidy ACT108/MalE, ACT133/MalE, ACT233/MalE, ACT336/MalE, ACT424/MalE nebo ACT594/MalE stimulovaly uvolňování IL-2. Toxoidy ACT607/MalE a ACT1648/MalE měly sníženou schopnost prezentovat epitop MalE na buňkách prezentujících antigen, a tedy stimulovat

T lymfocyty, a toxoidy ACT751/MaE, ACT926/MaE a ACT1334/MaE nestimulovaly buňky prezentující antigen.

Poté, co byla u toxoidů ACT108/MaE a ACT336/MaE zjištěna velmi dobrá schopnost stimulovat *in vitro* buňky prezentující antigen, byla u těchto toxoidů studována stejná stimulace T-buněčné odpovědi *in vivo* u myši. Myši C57BL/6 byly intravenózně imunizovány toxoidem ACT108/MaE, ACT336/MaE nebo ACT, jež nenesl MaE epitop. Po týdnu byly myším odebrány splenocyty, které byly stimulovány přidavkem peptidu MaE a byla sledována jejich proliferační schopnost. Splenocyty z myši, které byly imunizovány ACT108/MaE nebo ACT336/MaE vykazovaly ve srovnání se splenocyty z myši, které byly imunizovány původním nemutovaným ACT, silnou proliferační odpověď. Tento výsledek ukázal, že toxoidy ACT/MaE mají schopnost indukovat specifickou odpověď CD4<sup>+</sup> pomocných T lymfocytů.



## 6. DISKUZE

### 6.1. Oligomerizace adenylátcyklázového toxinu v membráně ovčích erytrocytů

Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* patří do skupiny RTX toxinů, jež tvoří póry (kanály) v plazmatické membráně cílových buněk. U většiny toxinů tvořících póry je podmínkou pro tvorbu pórů oligomerizace několika molekul toxinu (Alouf, 2003; Braun *et Focareta*, 1991; Narayanan *et al.*, 2002). V případě RTX toxinů není ale otázka oligomerizace doposud plně objasněna.

U žádného z RTX toxinů nebyla doposud popsána detekce oligomerů v membráně nebo jejich izolace (Bhakdi *et al.*, 1986; Soloaga *et al.*, 1999), přestože existují nepřímé důkazy o jejich existenci. Například u  $\alpha$ -hemolyzinu bakterie *Escherichia coli*, jež patří mezi nejlépe prostudované RTX toxiny, byla popsána sigmoidní závislost tvorby kanálů na koncentraci toxinu, která naznačila, že za tvorbu kanálu je zodpovědný oligomer (Benz *et al.*, 1989). Existence oligomerů  $\alpha$ -hemolyzinu *Escherichia coli* byla podpořena také výsledky Ludwiga a kolegů, kteří ukázali, že nehemolytické mutanty toxinu mohou komplementovat a vytvořit aktivní hemolyzin (Ludwig *et al.*, 1993). Na druhé straně, jiná skupina badatelů popsala u stejného typu toxinu lineární závislost tvorby kanálů či lyze lipozómů nebo erytrocytů na koncentraci toxinu a interpretovala výsledky tak, že i jediná molekula toxinu je schopna vytvořit kanál (Eberspacher *et al.*, 1989; Menestrina, 1988; Menestrina *et al.*, 1987). V případě adenylátcyklázového toxinu (ACT) bakterie *Bordetella pertussis* byly získány výsledky, jež nepřímo ukazovaly na existenci oligomerů ACT. Jednak to byla závislost hemolytické aktivity nebo tvorby kanálů na koncentraci toxinu, která vykazovala sigmoidní průběh s Hillovým číslem kooperativity  $> 3$  (Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994), což nepřímo naznačilo, že kanály tvoří trimery nebo vyšší oligomery ACT. Na existenci oligomerů ACT ukázalo také to, že neaktivní mutanty toxinu, jež měly vzájemně se nepřekrývající delece, měly schopnost komplementovat a obnovit biologickou aktivitu (Bejerano *et al.*, 1999; Iwaki *et al.*, 1995). To naznačuje, že nejméně část aktivního toxinu může existovat ve formě dimeru nebo většího oligomeru. Konečně v nedávné době byla popsána tvorba oligomerů adenylátcyklázového toxinu v roztoku, která byla závislá na přítomnosti posttranslační modifikace toxinu mastnou kyselinou, ale nebyla závislá na přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  v roztoku (Lee *et al.*, 2005), jež je jinak pro biologickou aktivitu toxinu

nezbytný. U detekovaných oligomerů ale nebyla přímo testována jejich biologická aktivita, a nelze tedy jednoznačně prohlásit, že odpovídají za tvorbu pórů v membráně. Naše výsledky ukazují na tvorbu oligomerů (pravděpodobně dimerů) ACT přímo v membráně a prokazují vzájemnou souvislost mezi množstvím detekovaných oligomerů a specifickou hemolytickou (kanálovou) aktivitou toxinu.

Existenci oligomerů ACT v membráně velmi silně podpořila detekce shluků molekul ACT po jejich označení specifickou protilátkou proti toxinu, vázající jediný epitop v molekule toxinu, a proteinem A s navázanou zlatou partikulí. Po označení ACT byly nejčastěji detekovány shluky dvou zlatých partikulí ve vzájemné vzdálenosti maximálně 20 nm. To ukázalo na velmi těsnou asociaci dvou až čtyř molekul toxinu (vzhledem k možnosti vazby primární protilátky na dvě molekuly toxinu) a naznačilo pravděpodobnou tvorbu nejméně dimerů ACT v membráně. Možnost, že by tyto shluky představovaly dva monomery ACT, je velmi málo pravděpodobná právě vzhledem k velmi krátké vzdálenosti zlatých partikulí a skutečnosti, že velikost samotného komplexu primární protilátka-protein A s 5 nm zlatou partikulí je 17 nm (Hainfeld, 1987). Navíc v membráně byly detekovány, i když s nižší frekvencí, také větší shluky zlatých partikulí, které ukázaly na tvorbu ještě větších oligomerů ACT nebo shluků oligomerů ACT v membráně. Existenci těchto větších shluků podporují také výsledky fluorescenční a konfokální mikroskopie (viz dále). Ve shlucích byly detekovány také jiné typy toxinů tvořících póry v membráně po oligomerizaci několika molekul toxinu (Nguyen *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2000; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2003). Shlukování molekul toxinu v membráně pravděpodobně způsobí posun rovnováhy směrem k oligomerizaci toxinu, a tak zvýšení celkového počtu pórů na buňku (Wallace *et al.*, 2000).

Komplexy ACT, jejichž zdánlivá molekulová hmotnost odpovídala přibližně dimerům (~410 kDa a ~470 kDa), jsme rovněž detekovali po rozdělení izolovaných membránových proteinových komplexů na modré nativní elektroforéze (BN-PAGE). Pokud byly izolované proteinové komplexy rozděleny na SDS-PAGE nebo bylo k izolovaným proteinovým komplexům přidáno SDS před jejich rozdělením na BN-PAGE, nebyly oligomery ACT detekovány. Citlivost oligomerů k SDS může být obecnou vlastností RTX toxinů a může vysvětlovat, proč nebyly detekovány oligomery  $\alpha$ -hemolyzinu *Escherichia coli* po rozdělení izolovaných proteinových komplexů na SDS-PAGE (Bhakdi *et al.*, 1986).

Izolované oligomery ACT nebyly stabilní a rozpadaly se během imunoprecipitace, nepodařilo se nám proto jednoznačně ukázat, zda se jednalo o

homooligomery ACT nebo o heterokomplexy ACT s jinými erytrocytárními proteiny. Posledně jmenovaná možnost se ale jeví nepravděpodobnou z následujících důvodů: 1) ACT nerozeznává na povrchu erytrocytů proteinový receptor (Martin *et al.*, 2004; Mašín *et al.*, 2004), 2) po proteolýze povrchových proteinů z erytrocytární membrány dochází naopak ke zvýšení vazby ACT (Mašín *et al.*, 2004; Vojtová, nepublikované výsledky) a 3) na existenci oligomerů ACT v membráně ukázaly výsledky imunodetekce ACT pomocí proteinu A s navázaným koloidním zlatem. Navíc naše výsledky ukázaly, že množství detekovaných oligomerů ACT souviselo se specifickou hemolytickou aktivitou toxinu. Mutanta ACT-E581K, jež měla vyšší hemolytickou aktivitu, tvořila více oligomerů a naopak nehemolytická mutanta tvořila méně oligomerů v porovnání s divokým typem toxinu. To naznačuje, že tvorba těchto oligomerů je důležitá pro tvorbu pórů. Možnost, že by za tvorbu póru byl zodpovědný heterokomplex ACT a jiného erytrocytárního proteinu je velmi nepravděpodobná, protože je známa skutečnost, že ACT tvoří póry také v uměle připravené lipidové membráně, která neobsahuje žádné proteiny (Benz *et al.*, 1994a; Knapp *et al.*, 2003; Mašín *et al.*, 2004; Osíčková *et al.*, 1999).

Molekulová hmotnost detekovaných oligomerů (dimerů) ACT byla velká (>400 kDa), z našich výsledků ale vyplynulo, že v membráně netvoří pravidelné kompaktní struktury, jež jsou detekovatelné pomocí negativního barvení, jako je tomu např.  $\alpha$ -toxinu bakterie *Staphylococcus aureus* nebo pneumolyzinu (Bhakdi *et al.*, 1985; Fussle *et al.*, 1981; Morgan *et al.*, 1995; Sekiya *et Futaesaku*, 1998). Stejně neúspěšnou byla rovněž již dříve popsaná detekce oligomerů  $\alpha$ -hemolyzinu *Escherichia coli* v membráně pomocí transmisní elektronové mikroskopie negativně barvených preparátů (Bhakdi *et al.*, 1986). Tyto výsledky naznačily možnost, že se tvorby oligomeru účastní pouze část molekuly, např. hydrofóbní doména, jež je nezbytná pro tvorbu póru (Benz *et al.*, 1994a), a zbytek molekuly se na tvorbě oligomeru nepodílí. Dále je možné, že oligomery ACT tvoří v membráně dynamické struktury, které se rozpadají a opětovně spojují do komplexu. Tato hypotéza byla již dříve navržena Benzem a kolegy na základě pozorování, že RTX toxiny tvoří v uměle připravené lipidové membráně kanály, jež jsou otevřeny pouze na velmi krátkou dobu (Benz *et al.*, 1994a; Benz *et al.*, 1994b; Benz *et al.*, 1989). Otevření kanálu tak může znamenat tvorbu oligomeru a naopak zavření kanálu jeho rozpad. Tento způsob otevírání a zavírání kanálu ale nebyl doposud u žádného toxinu tvořícího póry popsán. Na druhé straně byla popsána tvorba dynamického komplexu (dimeru) v membráně u translokačního kanálu SecYEG bakterie *Escherichia coli*

(Bessonneau *et al.*, 2002; Driessen, 2005; Mitra *et al.*, 2005). V tomto případě docházelo ke konformačním změnám dimeru během přenosu nasyntetizovaných proteinů přes bakteriální membránu. Dále, byla popsána konformační změna kolicinů, jež byla spojena s otevíráním a zavíráním póru v membráně (Merrill *et Cramer*, 1990; Slatin *et al.*, 2004; Slatin *et al.*, 1994). Je tedy možné, že i v případě adenylátcyklázového toxinu bude vytvoření póru spojené spíše s konformační změnou oligomeru než s jeho rozpadem. Existenci různých konformerů oligomeru ACT v membráně může podporovat detekce dvou různých forem oligomerů o velikosti ~410 kDa a ~470 kDa, jež byly detekovány pomocí BN-PAGE. Změna konformace toxinu detekovaná jako změna pohyblivosti na nativní polyakrylamidové elektroforéze byla již dříve popsána např. u hemolyzinu ShlA bakterie *Serratia marcescens* (Walker *et al.*, 2004). Zatímco u nemutovaného typu ACT byly detekovány obě formy oligomerů, u více hemolytické mutanty ACT-E581K nebo ACT-E509K+E516K (data nejsou ukázána) byly detekovány především oligomery o velikosti ~410 kDa. Lze tedy spekulovat o tom, že v membráně existuje rovnováha mezi dvěma konformacemi kanálu, kde oligomery o velikosti ~410 kDa představují otevřený kanál a oligomery o velikosti ~470 kDa zavřený kanál. A u více hemolytických mutant dochází díky mutaci k posunu rovnováhy ve prospěch tvorby otevřeného kanálu. Existenci různých konformerů oligomerů ACT v membráně je ale třeba ještě otestovat jiným způsobem. Navíc lze přítomnost oligomeru o velikosti ~470 kDa u nemutovaného typu toxinu vysvětlit také tak, že se jedná o větší oligomer (trimer nebo tetramer).

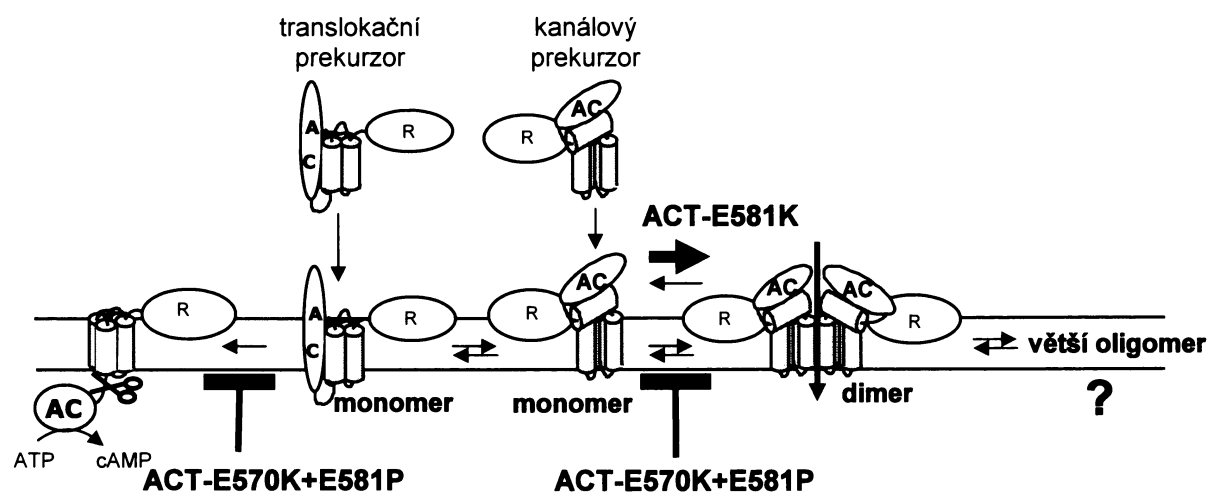
Nezodpovězenou zůstává otázka, zda ke tvorbě oligomerů ACT dochází v roztoku nebo teprve poté, co se molekuly toxinu naváží na membránu. Naše výsledky ukázaly, že se ACT nachází v membráně ve třech formách: 1) monomerů s odštěpenou adenylátcyklázovou doménou, 2) monomerů a 3) oligomerů, což spíše naznačuje možnosti, že k oligomerizaci toxinu dochází až v membráně. Tuto možnost podporuje také pozorování, že izolované oligomery ACT byly velmi nestabilní. Také výsledky Iwakiho a kolegů naznačily, že k interakci mezi molekulami toxinu dochází, až po jejich inzerci do membrány (Iwaki *et al.*, 2000). Navíc již dříve, bylo popsáno, že ACT tvoří v roztoku neaktivní agregáty (Rogel *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1989). Na druhé straně, Bejerano a kolegové ukázali, že ke komplementaci neaktivních mutant ACT, a tedy ke tvorbě funkčních oligomerů nedochází, pokud jsou k buňkám přidávány mutanty ACT postupně (Bejerano *et al.*, 1999). Rovněž Lee a kolegové popsali, že nedošlo k funkční komplementaci molekul ACT, pokud byly ovčí erytrocyty nejprve inkubovány

s nemutovaným typem ACT, promyty a poté inkubovány s deleční mutantou ACT ( $\Delta R$ ), jež neobsahovala vekou část opakujících se sekvencí (Lee *et al.*, 2005). Tyto výsledky naznačují, že k funkční komplementaci molekul ACT došlo ještě před jejich vazbou a inzercí do membrány. Nelze tedy vyloučit možnost, že ke tvorbě funkčních oligomerů může docházet jak v membráně, tak ještě před tím než dojde k inzerci ACT do membrány.

Kromě hemolytické (kanálotvorné) aktivity ACT, jež je spojována s tvorbou oligomerů, má ACT také invazivní aktivitu, která spočívá v translokaci adenylátcyklázové domény přes membránu cílových buněk a indukci syntézy cAMP v cytozolu. Existuje několik důkazů o tom, že translokace adenylátcyklázové domény přes plazmatickou membránu (invazivní aktivita) a tvorba kanálů (hemolytická aktivita) jsou dvě nezávislé a oddělené aktivity ACT (Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2001; Hackett *et al.*, 1995; Osičková *et al.*, 1999; Rogel *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1989; Szabo *et al.*, 1994). Pro interakci ACT s membránou byl proto navržen model, který předpokládá existenci dvou různých prekurzorů ACT: tzv. translokačního prekurzoru a kanálotvorného prekurzoru (Osičková *et al.*, 1999). Translokační prekurzor ACT je zodpovědný za translokaci adenylátcyklázové domény přes membránu, zatímco kanálový prekurzor je zodpovědný za tvorbu kanálů. Naše výsledky podporují tento model, neboť naznačují, že v membráně existuje rovnováha mezi molekulami ACT s odštěpenou adenylátcyklázovou doménou, monomery a oligomery. Tato rovnováha je u více hemolytické mutanty ACT-E581K nebo ACT-E509K+E516K posunuta ve prospěch tvorby oligomerů (Obr. 45). Naproti tomu, u mutanty ACT-E570K+E581K, jež nemá ani invazivní ani hemolytickou aktivitu, dochází k výraznému snížení tvorby jak molekul toxinu s odštěpenou adenylátcyklázovou doménou tak oligomerů, a molekuly ACT jsou přednostně detekovány ve formě monomerů (Obr. 45). Naše výsledky tady naznačují, že hlavní „operační jednotkou“ u adenylátcyklázového toxinu je monomer, který může buď přenést svou adenylátcyklázovou doménu přes membránu nebo se spojit s jinou molekulou toxinu (oligomerizovat) a vytvořit transmembránový kanál.

Transmembránový kanál tvoří pravděpodobně dimery ACT, ale nelze vyloučit možnost, že v membráně dochází ke tvorbě větších oligomerů (Obr. 45), jež jsou velmi nestabilní, a proto nebyly detekovány použitými metodami. Tvorbu větších oligomerů ACT může naznačovat např. to, že po imunoznačení ACT byly v membráně detekovány také shluky, jež obsahovaly více než 2 molekuly toxinu. Detekce takových shluků může znamenat buď tvorbu větších oligomerů nebo shluků oligomerů. Tvorbu větších oligomerů ACT naznačují také sigmoidní závislosti hemolytické aktivity nebo tvorby kanálů na

koncentraci toxinu (Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999; Szabo *et al.*, 1994). Na základě těchto měření je ale určení stechiometrie kanálu ACT poměrně nepřesné. Existenci větších oligomerů ACT v membráně je tedy třeba ještě dále testovat.



**Obr. 45: Model interakce adenylátcyklázového toxinu s membránou.** V membráně existuje rovnováha mezi tzv. translokačním prekurzorem ACT, který přenáší svou adenylátcyklázovou (AC) doménu přes membránu a tzv. kanálovým prekurzorem, který vytvoří po oligomerizaci pravděpodobně dvou molekul ACT transmembránový kanál. U více hemolytické mutanty ACT-E581K dochází díky mutaci v hydrofóbní doméně k posunu rovnováhy směrem ke tvorbě oligomerních kanálů, zatímco u mutanty ACT-E570K+E581P dochází k výrazné inhibici translokace AC domény a tvorby kanálů.

Jak již bylo řečeno výše translokace adenylátcyklázové domény přes membránu a tvorba kanálů jsou pravděpodobně dvě oddělené a nezávislé aktivity ACT. Tuto hypotézu podporuje také to, že jsme nedetekovali žádné oligomery ACT, které by tvořily molekuly toxinu s odštěpenou adenylátcyklázovou doménou. Rovněž zvýšená tvorba oligomerů u mutant ACT, jež měly vyšší hemolytickou aktivitu, a naopak snížená detekce molekul ACT s odštěpenou adenylátcyklázovou doménou u mutant se sníženou invazivní aktivitou, ukazuje na dvě nezávislé aktivity toxinu. Molekuly s translokovanou adenylátcyklázovou doménou tedy pravděpodobně nemohou tvořit kanál a naopak molekuly, které se podílejí na tvorbě kanálu, nepřenesou adenylátcyklázovou doménu přes membránu. Avšak výsledky Iwakiho a kolegů naznačily, že interakce mezi molekulami ACT resp. jejich oligomerizace souvisí také s invazivní aktivitou toxinu, tj. s přenosem adenylátcyklázové domény přes plazmatickou membránu. Iwaki a kolegové ukázali, že postupné přidávání nemutovaného ACT a deleční mutanty ACT bez AC domény ( $ACT\Delta 3-372$ ) k erytrocytům

a opačně vede ke zvýšení invazivní adenylátcyklázové aktivity v porovnání s erytrocyty, které byly inkubovány pouze s nemutovaným ACT (Iwaki *et al.*, 2000). Je možné, že zanořené molekuly ACT a to jak nemutovaného toxinu tak deleční mutanty ACT $\Delta$ 3-372 sloužily jako „sběrné antény“ pro ještě nenavázané molekuly toxinu a usnadnily jejich inzerci do membrány. V případě inkubace erytrocytů s mutantou ACT $\Delta$ 3-372 a poté s nemutovaným toxinem mohla přítomnost molekul ACT $\Delta$ 3-372 v membráně posílit vazbu nemutovaných molekul toxinu, a tak zvýšit invazivní aktivitu nemutovaného toxinu. V opačném případě, když byly erytrocyty inkubovány s nemutovaným toxinem a poté s deleční mutantou ACT $\Delta$ 3-372, pravděpodobně molekuly neaktivního toxinu přímo nebo nepřímo stimulovaly translokaci AC domény u již zanořených molekul nemutovaného toxinu. Přímá stimulace translokace AC domény by znamenala oligomerizaci ACT, jež doposud nebyla s invazivní aktivitou ACT spojována (Betsou *et al.*, 1993; Gray *et al.*, 1998; Osičková *et al.*, 1999). Je ale možné, že šlo o nepřímou stimulaci translokace AC domény u molekul nemutovaného toxinu. Neaktivní mutanta ACT $\Delta$ 3-373 má stejnou hemolytickou aktivitu jako nemutovaný typ ACT a lze předpokládat, že její vlastnosti odpovídají vlastnostem kanálotvorného prekurzoru ACT. S inzercí kanálotvorného toxinu do membrány je na rozdíl od translokačního prekurzoru spojován únik K<sup>+</sup> z cytozolu buňky (Gray *et al.*, 1998). Je známa skutečnost, že únik K<sup>+</sup> z cytozolu erytrocytů může způsobit hyperpolarizaci membrány, a tak zvýšení membránového potenciálu z -8 mV až na -40 mV (Halperin *et al.*, 1993). Invazivní aktivita ACT je závislá na velikosti membránového potenciálu (Otero *et al.*, 1995). Je tedy možné, že zanoření molekul ACT $\Delta$ 3-373 do membrány způsobilo lokální hyperpolarizaci membrány, jež podpořila translokaci adenylátcyklázové domény u molekul nemutovaného toxinu, a tak jeho invazivní aktivitu. Toto vysvětlení nepopírá hypotézu o oddělené invazivní a hemolytické aktivitě toxinu a současně naznačuje vzájemnou součinnost molekul ACT v membráně.

Translokace adenylátcyklázové domény přes membránu a tvorba kanálů jsou také dvě časově oddělené aktivity ACT. Zatímco k translokaci AC domény dochází okamžitě po přidání k buňkám, tvorba pórů v membráně a případně lyze buňky nastává s časovým odstupem (Benz *et al.*, 1994a; Rogel *et al.*, 1991). Příčinou rychlé translokace AC domény je pravděpodobně skutečnost, že po tvorbě kanálů v membráně dochází ke snížení membránového potenciálu na membráně a případně k její depolarizaci, což vede ke zvýšení propustnosti membrány pro ionty a koloidně osmotické lyzi buňky.

Z výsledků nepřímého značení molekul ACT pomocí proteinu A s navázaným koloidním zlatem vyplynulo, že se molekuly toxinu nacházejí v membráně ovčích erytrocytů ve shlucích podobně jako je tomu u jiných typů toxinů tvořících póry (Nguyen *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2000; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2003). V okolí shluků toxinů tvořících póry byla často detekována poškozená membrána (Nguyen *et al.*, 2003; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2003). V případě adenylátcyklázového toxinu mohou shluky pórů také způsobit přímé poškození membrány, protože molekuly ACT byly detekovány také v místech poškozené membrány. Navíc, již dříve bylo ukázáno, že inserce ACT do membrány může způsobovat vznik nelamelárních struktur v lipidové dvojvrstvě (Martin *et al.*, 2004), které mohou přispívat k poškození membrány.

Pomocí konfokální mikroskopie jsme detekovali v membráně shluky molekul ACT, jež měly konstantní stechiometrii a obsahovali přibližně 20 molekul toxinu. Konstantní stechiometrie shluků může naznačovat, že se jednalo o agregáty toxinu navázané na membráně erytrocytů. Tato možnost je ale nepravděpodobná z následujících důvodů: 1) agregáty ACT nemají biologickou aktivitu (Rogel *et al.*, 1991; Rogel *et al.*, 1989), zatímco naše výsledky ukázaly, že navázané molekuly ACT byly aktivní, protože indukovaly vznik morfologických změn (viz dále) a způsobovaly lyzi erytrocytů 2) molekuly ACT, jež nebyly zanořené do membrány, byly odstraněny promytím erytrocytů v 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11,5 (Fujiki *et al.*, 1982; Rogel *et al.*, 1992) a 3) počet molekul ACT na shluk nebyl závislý na koncentraci toxinu (data nejsou ukázána). Konstantní stechiometrie shluků tak spíše naznačuje, že molekuly ACT byly přednostně vázány do specifických oblastí v membráně, které obsahovaly určitý počet vazebných míst pro toxin.

Tyto oblasti mohou představovat místa, která obsahují nějakou receptorovou molekulu pro ACT. Receptorem pro ACT v membráně erytrocytů pravděpodobně není žádný protein, protože po odstranění proteinů z membrány dochází ke zvýšení vazby ACT (Mašín *et al.*, 2004; Vojtová, nepublikované výsledky). Pokud tedy nějaký receptor v membráně erytrocytů existuje, jedná se pravděpodobně o hojně se vyskytující molekulu, protože vazba ACT na erytrocyty není saturovatelná (Gray *et al.*, 1999; Mašín *et al.*, 2004). Takovou molekulou by mohl být některý lipid. Tuto domněnku podporují dřívější výsledky, jež naznačily, že za interakci ACT s membránou mohou být zodpovědné lipidy, resp. glykolipidy (Gordon *et al.*, 1989).

V membráně ovčích erytrocytů existují tzv. membránové mikrodomény, které obsahují přednostně dva typy lipidů: cholesterol a sfingomyelin (Koumanov *et al.*, 2005).



Naše výsledky ukázaly, že vazba ACT na ovčí erythrocyty je nižší po odstranění cholesterolu z membrány, jež vede k rozpuštění membránových mikrodomén. Dále jsme ukázali, že se ACT váže s vyšší účinností na lipozómy připravené ze sfingomyelinu a cholesterolu v porovnání s lipozómy, jež byly připravené z fosfatidylcholinu a cholesterolu. Je tedy možné, že sfingomyelin a cholesterol se podílejí na vazbě ACT do membrány ovčích erythrocytů. Tuto možnost podporuje také to, že tvorba shluků molekul ACT v membráně a některé morfologické změny erythrocytů po působení toxinu jsou srovnatelné s působením hemolysinu lyseninu, který v membráně ovčích erythrocytů váže sfingomyelin (Nguyen *et al.*, 2003; Wallace *et al.*, 2000; Yamaji-Hasegawa *et al.*, 2003).

Naše výsledky dále ukázaly, že tvorba oligomerů ACT v membráně souvisí s hemolytickou aktivitou toxinu, a tak s tvorbou pórů. Vytvořené póry resp. kanály v membráně jsou selektivní pro kationty (Benz *et al.*, 1994a) a mohou způsobit koloidně osmotickou lyzi erythrocytů (Bellalou *et al.*, 1990b; Glaser *et al.*, 1988). Naše výsledky ukázaly, že lyzi předchází morfologické změny erythrocytů, za které je zodpovědná hemolytická (kanálotvorná) aktivita toxinu. Po působení ACT jsme u ovčích erythrocytů detekovali postupnou změnu jejich morfologie, jež zahrnovala smrštění buněk, tvorbu membránových výběžků a váčků, bobtnání a lyzi. Na koncích membránových výběžků jsme detekovali také malé váčky. Detekce těchto váčků naznačila, že u erythrocytů může docházet po působení ACT k odštěpování membránových váčků. Odštěpování membránových váčků z erythrocytů bylo již dříve pozorováno např. u lidských erythrocytů, u nichž chránilo před lyzí způsobenou komplementem (Iida *et al.*, 1991).

Díky použití enzymaticky neaktivního toxoidu ACT a mutanty ACT-E581K s vyšší hemolytickou aktivitou jsme mohli vyloučit možný efekt enzymatické adenylátcyklázové aktivity na morfologické změny erythrocytů. Morfologické změny erythrocytů tak způsobily póry ACT nebo některý z dřívějších kroků, jež vedly ke tvorbě pórů. Již dříve bylo popsáno, že inserce molekul ACT do membrány, jež předchází tvorbě pórů, způsobuje únik  $K^+$  z erythrocytů (Gray *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2001). Únik  $K^+$  způsobuje u lidských erythrocytů jejich smrštění a pokud navíc dojde ke zvýšení vnitrobuněčné koncentrace  $Ca^{2+}$  je indukováno odštěpování membránových váčků z erythrocytů (Allan *et Thomas*, 1981). U erythrocytů nebylo doposud popsáno zvýšení vnitrobuněčné koncentrace  $Ca^{2+}$  po působení ACT, ale ACT indukuje vstup  $Ca^{2+}$  do makrofágové linie J774 (Radovan Fišer, osobní sdělení). Je tedy možné, že jak únik  $K^+$  tak vstup  $Ca^{2+}$  hraje roli v morfologických změnách erythrocytů. Navíc u příbuzného toxinu

hemolyzinu *E.coli*, který také způsoboval morfologické změny erytrocytů (Jorgensen *et al.*, 1980), byla popsána indukce rychlého úniku  $K^+$  a akumulace  $Ca^{2+}$  v cytozolu erytrocytů (Jorgensen *et al.*, 1983).

Dohromady naše výsledky naznačily, že se ACT váže do specifických míst v membráně erytrocytů, ve kterých dochází k oligomerizaci toxinu a tvorbě pórů nebo k translokaci adenylátcyklázové domény přes membránu. Tvorba kanálů a translokace adenylátcyklázové domény přes membránu se zdají být ve vzájemné rovnováze a součinnosti.

## 6.2. Příprava sady rekombinantních ACT nesoucích specifický $CD4^+$ T-buněčný epitop

Již dříve bylo ukázáno, že ACT lze využít jako nereplikativní vektor pro dopravu cizorodých  $CD8^+$  T-buněčných antigenů do dráhy pro zpracování a prezentaci antigenů na MHC gp I v buňkách prezentujících antigen, jež vede ke stimulaci cytotoxických  $CD8^+$  T lymfocytů (Fayolle *et al.*, 1996; Fayolle *et al.*, 1999; Osicka *et al.*, 2000; Saron *et al.*, 1997; Šebo *et al.*, 1995). Nebylo ale známo, zda ACT může také dopravovat  $CD4^+$  T-buněčné epitopy na MHC gp II a indukovat příslušnou imunitní odpověď pomocných  $CD4^+$  T lymfocytů.

Připravili jsme proto sadu mutantních ACT, které nesly na různých místech v molekule toxinu modelový  $CD4^+$  T-buněčný epitop z proteinu MalE vázajícího maltózu z bakterie *E.coli*. Vzhledem k tomu, že vložením epitopu MalE do molekuly ACT mohlo dojít ke změně struktury toxinu, a tak k ovlivnění jeho biologické aktivity, byla u všech mutantních proteinů ACT/MalE testována jejich vazebná, invazivní a hemolytická aktivita na modelu ovčích erytrocytů. U většiny mutantních proteinů byla jejich biologická aktivita srovnatelná s nemutovaným typem toxinu. Pouze proteiny ACT594/MalE a ACT607/MalE, jež měly epitop MalE vložený v hydrofóbní doméně, a protein ACT926/MalE, který měl epitop MalE vložený v blízkosti opakujících se sekvencí, vykazovaly snížené aktivity. ACT594/MalE měl přibližně o 25 % sníženou specifickou vazebnou aktivitu v porovnání s nemutovaným typem toxinu. Jeho specifická invazivní aktivita byla velmi nízká (2 % nemutovaného ACT) a hemolytická aktivita dosahovala pouze 25 % nemutovaného typu ACT. ACT607/MalE měl také sníženou vazebnou

aktivitu, jeho invazivní aktivita dosahovala 15 % a hemolytická aktivita 80 % nemutovaného typu ACT. V případě proteinu ACT926/MalE ale došlo v souladu s již dříve popsánymi výsledky (Osicka *et al.*, 2000) ke zrušení všech testovaných aktivit, protože se tento protein vůbec nevázal na ovčí erythrocyty. V tomto případě velmi pravděpodobně došlo ke ztrátě esenciální acylace na lyzinu 983 v blízkosti místa inserce epitopu. Protein ACT926/MalE byl proto použit jako negativní kontrola v experimentech, jež testovaly dopravu vložených epitopů do buněk prezentujících antigen a indukcii specifické imunitní odpovědi.

Toxoidy ACT/MalE byly ve spolupracující laboratoři Dr. C. Leclerc použity ke studiu schopnosti dopravovat epitop MalE do dráhy zajišťující jejich zpracování a prezentaci na molekulách MHC gp II. Ukázalo se, že proteiny, které měly epitop MalE vložený v adenylátcyklázové doméně, hydrofóbní doméně a v oblasti C-koncového sekrečního signálu mohly být účinně zpracovány a vystaveny na MHC gp II a indukovaly specifickou CD4<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď *in vitro*. Pouze u proteinu ACT607/MalE byla schopnost dopravit epitop MalE k prezentaci na molekulách MHC gp II nízká a u proteinů ACT751/MalE, ACT926/MalE a ACT1334/MalE byla tato schopnost zanedbatelná. Tyto výsledky ukazují, že zde není zřejmá korelace mezi invazivní nebo hemolytickou aktivitou mutovaných proteinů, testovanou na ovčích erythrocytech, a schopností proteinu zajistit prezentaci epitopu MalE na MHC gp II. Na druhé straně protein ACT926/MalE, jež nebyl aktivní na erythrocytech, rovněž neměl schopnost prezentovat epitop na MHC gp II.

Pro zpracování a prezentaci epitopu MalE vloženého do ACT na MHC gp II je nezbytná vazba toxinu na receptorovou molekulu na povrchu buněk prezentujících antigen, jíž je intergrin CD11b/CD18 (Guermonprez *et al.*, 2001), a endocytóza závislá na klatrinu (Schlecht *et al.*, 2004). Dále je pro účinné zpracování epitopu MalE nutné snížení pH v endozómu a přítomnost proteolytických enzymů (Schlecht *et al.*, 2004). V případě molekul ACT/MalE, jež mají epitop MalE vložený v oblasti AC domény, lze předpokládat, že dojde k rychlé translokaci AC domény přes membránu a posléze k její degradaci v proteazómu. Bylo ale ukázáno, že degradace v toxinu v proteazómu nevede k prezentaci epitopu MalE na MHC gp II (Schlecht *et al.*, 2004). Vzhledem ke skutečnosti, že epitopy MalE vložené do AC domény ACT byly účinně prezentovány na MHC gp II, je zřejmé, že alespoň u části molekul ACT/MalE nedošlo k přímé translokaci AC domény přes membránu a molekuly s ACT s netraslokovanou AC doménou byly endocytovány klatrinovou dráhou. Vysvětlením, proč některé molekuly ACT nepřenášejí AC doménu přes membránu, může být oddělená invazivní a hemolytická aktivita toxinu, jež byla

navržena na modelu ovčích erytrocytů (Osičková *et al.*, 1999). Tato hypotéza předpokládá, že ty molekuly toxinu, které translokují AC doménu přes membránu netvoří v membráně póry a naopak (viz obr. 45), což je v souladu s našimi výsledky.

U proteinů, ACT108/MalE a ACT336/MalE, pomocí kterých byly peptidy MalE nejlépe prezentovány, bylo dále prokázáno, že jsou schopny indukovat specifickou CD4<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď *in vivo*. Vzhledem k již známé skutečnosti, že je ACT schopen indukovat také specifickou CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď *in vivo*, tyto výsledky ukázaly, že ACT by mohl být velmi vhodný nástroj pro imunoterapii nádorů a chronických virových infekcí, kdy je nezbytné stimulovat jak CD4<sup>+</sup> tak CD8<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď. V tomto smyslu nedávné studie provedené na myších skutečně potvrzují to, že ACT lze využít jak k preventivnímu tak k terapeutickému očkování proti nádorovým onemocněním a virovým infekcím (El Azami El Idrissi *et al.*, 2002; Mackova *et al.*, 2006; Mascarell *et al.*, 2005; Preville *et al.*, 2005; Simsova *et al.*, 2004). V roce 2006 je již plánováno zahájení I. a II. fáze klinických testů, v rámci nichž bude ACT využit jako nosič antigenů v imunoterapii melanomů či rakoviny děložního čípku indukované papilomavirem HPV 16 (Peter Šebo, osobní sdělení).

## 7. ZÁVĚRY

### 7.1. Oligomerizace adenylátcyklázového toxinu v membráně ovčích erytrocytů

- Zjistili jsme, že ACT netvoří v membráně na rozdíl od  $\alpha$ -toxinu bakterie *Staphylococcus aureus* pravidelné kompaktní útvary detekovatelné pomocí negativního barvení.
- Pomocí transmisní elektronové mikroskopie a skenovací elektronové mikroskopie jsme detekovali morfologické změny erytrocytů po působení ACT. Použitím toxoidu ACT, jež neměl enzymatickou adenylátcyklázovou aktivitu, ale měl zachovanou hemolytickou aktivitu, jsme ukázali, že za morfologické změny erytrocytů je zodpovědná hemolytická aktivita toxinu.
- Molekuly ACT jsme detekovali v membráně pomocí nepřímé imunodetekce, tedy primární protilátkou a sekundární protilátkou s navázanou partikulí zlata nebo primární protilátkou a proteinem A s navázanou partikulí zlata.
- Distribuce molekul ACT v membráně označených proteinem A byla testována pomocí párové korelační funkce. Zjistili jsme, že v membráně jsou nejčastěji detekovány shluky dvou molekul toxinu, které pravděpodobně představují dimery ACT.
- Z membrány ovčích erytrocytů byly izolovány pomocí 1% lauryl maltosidu vysokomolekulové komplexy ACT, jejichž zdánlivá molekulová hmotnost na nativní modré polyakrylamidové elektroforéze (BN-PAGE) odpovídala ~470 kDa, ~410 kDa, ~300 kDa a ~200 kDa.
- Zjistili jsme, že komplexy o velikosti ~470 kDa a ~410 kDa pravděpodobně odpovídají oligomerům ACT, protein o velikosti ~300 kDa monomeru ACT a protein o velikosti ~200 kDa monomeru ACT s odštěpenou AC doménou.
- Ukázali jsme také, že oligomery ACT detekované na BN-PAGE jsou citlivé k SDS a tvoří je neštěpené molekuly ACT.
- Byla charakterizována vazebná, invazivní a hemolytická aktivita u mutanty ACT-E581K a mutanty ACT-E570K+E581P. Mutanty ACT-E581K a ACT-E570K+E581P dosahovaly 80% vazebné aktivity nemutovaného typu toxinu. Mutanta ACT-E581K způsobovala rychlejší lyzi erytrocytů v porovnání s nemutovaným typem toxinu a její invazivní aktivita dosahovala 15 %

nemutovaného typu toxinu. Mutanta ACT-E570K+E581P neměla hemolytickou ani invazivní aktivitu.

- U mutanty ACT-E581K a ACT-E570K+E581P byly charakterizovány vlastnosti jejich kanálů na černých lipidových membránách. Mutanta ACT-E581K tvořila v membráně déle otevřené kanály a její membránová aktivita byla vyšší než u nemutovaného typu toxinu. Mutanta ACT-E570K+E581P tvořila kanály v membráně s velmi nízkou účinností.
- Pomocí analýzy izolovaných komplexů ACT na BN-PAGE jsme ukázali, že zvýšená hemolytická aktivita u mutanty ACT-E581K je spojená s tvorbou většího množství oligomerů v membráně než u nemutovaného typu toxinu. Naopak ztráta hemolytické aktivity u mutanty ACT-E570K+E581P byla spojená s nízkou tvorbou oligomerů.
- Ukázali jsme také, že snížená invazivní aktivita u mutanty ACT-E581K a zrušená invazivní aktivita u mutanty ACT-E570K+E581P koreluje s izolací sníženého množství štěpené formy ACT bez AC domény z membrány erytrocytů.
- Pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie jsme potvrdili lokalizaci molekul ACT v membráně ovčích erytrocytů ve shlucích a zjistili jsme, že tyto shluky mají konstantní stechiometrii, jež odpovídá ~20 molekulám toxinu na jeden shluk.
- Ukázali jsme, že po odstranění cholesterolu z membrány ovčích erytrocytů dochází ke snížení vazby ACT a ACT se nejvíce váže na liposómy připravené ze směsi sfingomyelinu a cholesterolu.

## 7.2. Indukce antigeně specifické imunitní odpovědi

Příprava sady toxoidů ACT nesoucích specifický CD4<sup>+</sup> T-buněčný epitop MalE

- Připravili jsme 11 mutantních proteinů ACT/MalE.
- U všech proteinů ACT/MalE byla stanovena vazebná, invazivní a hemolytická aktivita na modelu ovčích erytrocytů. U většiny proteinů ACT/MalE byly tyto aktivity srovnatelné s nemutovaným typem ACT, výjimku tvořily proteiny ACT594/MalE, ACT607/MalE a ACT926/MalE.
- Proteiny ACT/MalE jsme detoxifikovali.

- 
- Toxoidy ACT/MaE byly použity ke studiu schopnosti *in vitro* prezentace epitopu MaE na molekulách MHC II. třídy.
  - Toxoidy ACT/MaE, jež měly epitop MaE vložený v N-koncové části toxinu (oblast mezi 1.-600. aminokyselinou) a na samém C-konci molekuly, dopravovaly epitop MaE s vysokou účinností do dráhy pro zpracování a prezentaci epitopů na molekulách MHC gp II. Toxoid ACT/607MaE měl tuto schopnost nižší a toxoidy ACT/751MaE, ACT/926MaE a ACT/1334MaE ji měly zanedbatelnou.
  - U toxoidů ACT108/MaE a ACT336/MaE, jež nejlépe zajišťovaly prezentaci epitopu MaE na molekulách MHC gp II, byla zjištěna také schopnost indukovat specifickou CD4<sup>+</sup> T-buněčnou odpověď *in vivo*.

## 8. LITERATURA

- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T. and van der Goot, F.G. (1998) The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem*, **273**, 32656-32661.
- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S.H. and van der Goot, F.G. (2003) Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J Cell Biol*, **160**, 321-328.
- Abrami, L. et van Der Goot, F.G. (1999) Plasma membrane microdomains act as concentration platforms to facilitate intoxication by aerolysin. *J Cell Biol*, **147**, 175-184.
- Akerley, B.J. et Miller, J.F. (1996) Understanding signal transduction during bacterial infection. *Trends Microbiol*, **4**, 141-146.
- Allan, D. et Thomas, P. (1981) Ca<sup>2+</sup>-induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation. *Biochem J*, **198**, 433-440.
- Alouf, J.E. (2003) Molecular features of the cytolytic pore-forming bacterial protein toxins. *Folia Microbiol (Praha)*, **48**, 5-16.
- Altwegg, M. et Geiss, H.K. (1989) Aeromonas as a human pathogen. *Crit Rev Microbiol*, **16**, 253-286.
- Arai, H. et Sato, Y. (1976) Separation and characterization of two distinct hemagglutinins contained in purified leukocytosis-promoting factor from Bordetella pertussis. *Biochim Biophys Acta*, **444**, 765-782.
- Arico, B., Miller, J.F., Roy, C., Stibitz, S., Monack, D., Falkow, S., Gross, R. and Rappuoli, R. (1989) Sequences required for expression of Bordetella pertussis virulence factors share homology with prokaryotic signal transduction proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6671-6675.
- Backman, L. (1986) Shape control in the human red cell. *J Cell Sci*, **80**, 281-298.
- Bagley, K.C., Abdelwahab, S.F., Tuskan, R.G., Fouts, T.R. and Lewis, G.K. (2002) Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol*, **72**, 962-969.
- Bachelet, M., Richard, M.J., Francois, D. and Polla, B.S. (2002) Mitochondrial alterations precede Bordetella pertussis-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **32**, 125-131.
- Ballard, J.D., Collier, R.J. and Starnbach, M.N. (1996) Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12531-12534.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Goodwin, M.S. (1991) Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol*, **173**, 720-726.
- Basar, T., Havlíček, V., Bezoušková, S., Halada, P., Hackett, M. and 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.
- Basler, M., Mašín, J., Osička, R. and Šebo, P. (2006) Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun*, **74**, 2207-14.
- Bassinat, L., Fitting, C., Housset, B., Cavaillon, J.M. and Guiso, N. (2004) Bordetella pertussis adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells. *Infect Immun*, **72**, 5530-5533.



- Bednář, M. (1996) *Lékařská mikrobiologie. Bakteriologie. Virologie. Parazitologie*. Marvil, Praha.
- Bejerano, M., Nisan, I., Ludwig, A., Goebel, W. and Hanski, E. (1999) Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol*, **31**, 381-392.
- Bellalou, J., Ladant, D. and Sakamoto, H. (1990a) Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. *Infect Immun*, **58**, 1195-1200.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A. (1990b) Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun*, **58**, 3242-3247.
- Benada, O. et Pokorný, V. (1990) Modification of the Polaron sputter-coater unit for glow-discharge activation of carbon support films. *J Electron Microscop Tech*, **16**, 235-239.
- Benz, R., Hardie, K.R. and Hughes, C. (1994a) Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Eur J Biochem*, **220**, 339-347.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Šebo, P. (1994b) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **269**, 27231-27239.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. and Goebel, W. (1989) Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun*, **57**, 887-895.
- Bessonneau, P., Besson, V., Collinson, I. and Duong, F. (2002) The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *Embo J*, **21**, 995-1003.
- Betsou, F., Šebo, P. and Guiso, N. (1993) CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, **61**, 3583-3589.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.M. and Holland, I.B. (1986) *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun*, **52**, 63-69.
- Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. and Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun*, **47**, 52-60.
- Bordet, J. et Gengou, O. (1906) Le Microbe de la coqueluche. *Annales de Institut Pasteur*, **20**, 48-68.
- Boucher, P.E., Menozzi, F.D. and Locht, C. (1994) The modular architecture of bacterial response regulators. Insights into the activation mechanism of the BvgA transactivator of *Bordetella pertussis*. *J Mol Biol*, **241**, 363-377.
- Bourne, H.R., Lichtenstein, L.M., Melmon, K.L., Henney, C.S., Weinstein, Y. and Shearer, G.M. (1974) Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*, **184**, 19-28.
- Boyd, A.P., Ross, P.J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E.C. and Mills, K.H. (2005) *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin Modulates Innate and Adaptive Immune Responses: Distinct Roles for Acylation and Enzymatic Activity in Immunomodulation and Cell Death. *J Immunol*, **175**, 730-738.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**:248

- Braun, V. *et* Focareta, T. (1991) Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Crit Rev Microbiol*, **18**, 115-158.
- Braun, V., Neuss, B., Ruan, Y., Schiebel, E., Schoffler, H. and Jander, G. (1987) Identification of the *Serratia marcescens* hemolysin determinant by cloning into *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **169**, 2113-2120.
- Brennan, M.J., David, J.L., Kenimer, J.G. and Manclark, C.R. (1988) Lectin-like binding of pertussis toxin to a 165-kilodalton Chinese hamster ovary cell glycoprotein. *J Biol Chem*, **263**, 4895-4899.
- Cabiaux, V., Buckley, J.T., Wattiez, R., Ruyschaert, J.M., Parker, M.W. and van der Goot, F.G. (1997) Conformational changes in aerolysin during the transition from the water-soluble protoxin to the membrane channel. *Biochemistry*, **36**, 15224-15232.
- Clinkenbeard, K.D., Mosier, D.A. and Confer, A.W. (1989) Transmembrane pore size and role of cell swelling in cytotoxicity caused by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect Immun*, **57**, 420-425.
- Coelho, A., Andrade, J.R., Vicente, A.C. and Dirita, V.J. (2000) Cytotoxic cell vacuolating activity from *Vibrio cholerae* hemolysin. *Infect Immun*, **68**, 1700-1705.
- Confer, D.L. *et* Eaton, J.W. (1982) Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science*, **217**, 948-950.
- Coutte, L., Alonso, S., Reveneau, N., Willery, E., Quatannens, B., Locht, C. and Jacob-Dubuisson, F. (2003) Role of adhesin release for mucosal colonization by a bacterial pathogen. *J Exp Med*, **197**, 735-742.
- Cover, T.L. *et* Blaser, M.J. (1992) Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, **267**, 10570-10575.
- Cowan, L.D., Griffin, M.R., Howson, C.P., Katz, M., Johnston, R.B., Jr., Shaywitz, B.A. and Fineberg, H.V. (1993) Acute encephalopathy and chronic neurological damage after pertussis vaccine. *Vaccine*, **11**, 1371-1379.
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J. and Greenberg, S. (2000) A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 680-685.
- Cramer, W.A., Heymann, J.B., Schendel, S.L., Deriy, B.N., Cohen, F.S., Elkins, P.A. and Stauffacher, C.V. (1995) Structure-function of the channel-forming colicins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **24**, 611-641.
- Crowcroft, N.S., Booy, R., Harrison, T., Spicer, L., Britto, J., Mok, Q., Heath, P., Murdoch, I., Zambon, M., George, R. and Miller, E. (2003) Severe and unrecognised: pertussis in UK infants. *Arch Dis Child*, **88**, 802-806.
- Dadaglio, G., Morel, S., Bauche, C., Moukrim, Z., Lemonnier, F.A., Van Den Eynde, B.J., Ladant, D. and Leclerc, C. (2003) Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA\*0201-restricted melanoma epitopes. *Int Immunol*, **15**, 1423-1430.
- Dautin, N., Karimova, G. and Ladant, D. (2002) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a versatile screening tool. *Toxicon*, **40**, 1383-1387.
- Diep, D.B., Lawrence, T.S., Ausio, J., Howard, S.P. and Buckley, J.T. (1998) Secretion and properties of the large and small lobes of the channel-forming toxin aerolysin. *Mol Microbiol*, **30**, 341-352.
- Driessen, A.J. (2005) Cell biology: two pores better than one? *Nature*, **438**, 299-300.
- Eberspacher, B., Hugo, F. and Bhakdi, S. (1989) Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun*, **57**, 983-988.

- Edwards, J.A., Groathouse, N.A. and Boitano, S. (2005) Bordetella bronchiseptica adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A. *Infect Immun*, **73**, 3618-3626.
- Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Gordon, V.M., Gray, L.S. and Hewlett, E.L. (1991) Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *FEBS Lett*, **278**, 79-83.
- Ehrmann, I.E., Weiss, A.A., Goodwin, M.S., Gray, M.C., Barry, E. and Hewlett, E.L. (1992) Enzymatic activity of adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis is not required for hemolysis. *FEBS Lett*, **304**, 51-56.
- El Azami El Idrissi, M., Ladant, D. and Leclerc, C. (2002) The adenylate cyclase of Bordetella pertussis: a vector to target antigen presenting cells. *Toxicon*, **40**, 1661-1665.
- el Baya, A., Bruckener, K. and Schmidt, M.A. (1999) Nonrestricted differential intoxication of cells by pertussis toxin. *Infect Immun*, **67**, 433-435.
- el Baya, A., Linnemann, R., von Olleschik-Elbheim, L., Robenek, H. and Schmidt, M.A. (1997) Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol*, **73**, 40-48.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucká, J., Osička, R., Šebo, P., Ladant, D. and 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.
- Elder, K.D. et Harvill, E.T. (2004) Strain-dependent role of BrkA during Bordetella pertussis infection of the murine respiratory tract. *Infect Immun*, **72**, 5919-5924.
- Eraso, J.M. et Weinstock, G.M. (1992) Anaerobic control of colicin E1 production. *J Bacteriol*, **174**, 5101-5109.
- Fayolle, C., Abdel-Motal, U.M., Berg, L., Deriaud, E., Jondal, M. and Leclerc, C. (1996) Induction of cytotoxic T-cell response by optimal-length peptides does not require CD4+ T-cell help. *Immunology*, **89**, 41-45.
- Fayolle, C., Osičková, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M.J., Saron, M.F., Šebo, P. and Leclerc, C. (2001) Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of Bordetella pertussis induces protective antiviral immunity. *J Virol*, **75**, 7330-7338.
- Fayolle, J., Verrier, B., Buckland, R. and Wild, T.F. (1999) Characterization of a natural mutation in an antigenic site on the fusion protein of measles virus that is involved in neutralization. *J Virol*, **73**, 787-790.
- Fernandez, R.C. et Weiss, A.A. (1994) Cloning and sequencing of a Bordetella pertussis serum resistance locus. *Infect Immun*, **62**, 4727-4738.
- Flak, T.A. et Goldman, W.E. (1999) Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol*, **1**, 51-60.
- Friedman, R.L., Fiederlein, R.L., Glasser, L. and Galgiani, J.N. (1987) Bordetella pertussis adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun*, **55**, 135-140.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. and Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Fukushima, K., Ikehara, Y., Kanai, M., Kochibe, N., Kuroki, M. and Yamashita, K. (2003) A beta-N-acetylglucosaminyl phosphate diester residue is attached to the glycosylphosphatidylinositol anchor of human placental alkaline phosphatase: a target of the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*, **278**, 36296-36303.

- Fussle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Trantum-Jensen, J., Kranz, T. and Wellensiek, H.J. (1981) On the mechanism of membrane damage by Staphylococcus aureus alpha-toxin. *J Cell Biol*, **91**, 83-94.
- Gale, J.L., Thapa, P.B., Wassilak, S.G., Bobo, J.K., Mendelman, P.M. and Foy, H.M. (1994) Risk of serious acute neurological illness after immunization with diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. A population-based case-control study. *Jama*, **271**, 37-41.
- Garland, W.J. et Buckley, J.T. (1988) The cytolytic toxin aerolysin must aggregate to disrupt erythrocytes, and aggregation is stimulated by human glycophorin. *Infect Immun*, **56**, 1249-1253.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. and Danchin, A. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis. *Embo J*, **7**, 3997-4004.
- Gmira, S., Karimova, G. and Ladant, D. (2001) Characterization of recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Res Microbiol*, **152**, 889-900.
- Golub, T., Wacha, S. and Caroni, P. (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid raft. *Curr Opin Neurobiol*, **Oct**, 542-550.
- Goodwin, M.S. et Weiss, A.A. (1990) Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by Bordetella pertussis in infant mice. *Infect Immun*, **58**, 3445-3447.
- Gordon, V.M., Young, W.W., Jr., Lechler, S.M., Gray, M.C., Leppla, S.H. and Hewlett, E.L. (1989) Adenylate cyclase toxins from Bacillus anthracis and Bordetella pertussis. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J Biol Chem*, **264**, 14792-14796.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L. and Hewlett, E. (1998) Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by Bordetella pertussis AC toxin. *J Biol Chem*, **273**, 18260-18267.
- Gray, M.C., Donato, G.M., Jones, F.R., Kim, T. and Hewlett, E.L. (2004) Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by Bordetella pertussis. *Mol Microbiol*, **53**, 1709-1719.
- Gray, M.C., Lee, S.J., Gray, L.S., Zaretzky, F.R., Otero, A.S., Szabo, G. and Hewlett, E.L. (2001) Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol*, **183**, 5904-5910.
- Gray, M.C., Ross, W., Kim, K. and Hewlett, E.L. (1999) Characterization of binding of adenylate cyclase toxin to target cells by flow cytometry. *Infect Immun*, **67**, 4393-4399.
- Griffin, M.R., Ray, W.A., Mortimer, E.A., Fenichel, G.M. and Schaffner, W. (1990) Risk of seizures and encephalopathy after immunization with the diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *Jama*, **263**, 1641-1645.
- Griffiths, G. (1993) *Fine Structure Immunocytochemistry With Contributions by Brian Burke and John Lucocq*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. and 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.
- Guermonprez, P., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. and Leclerc, C. (1999) Direct delivery of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol*, **162**, 1910-1916.

- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J. (2005) Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenyl cyclase toxin with calmodulin. *Embo J*, **24**, 3190-3201.
- Gustafsson, L., Hallander, H.O., Olin, P., Reizenstein, E. and Storsaeter, J. (1996) A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N Engl J Med*, **334**, 349-355.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hewlett, E.L. (1994) Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis. *Science*, **266**, 433-435.
- Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L. and Šebo, P. (1995) Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in Escherichia coli. *J Biol Chem*, **270**, 20250-20253.
- Haicheur, N., Bismuth, E., Bosset, S., Adotevi, O., Warnier, G., Lacabanne, V., Regnault, A., Desaynard, C., Amigorena, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Goud, B., Fridman, W.H., Johannes, L. and Tartour, E. (2000) The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol*, **165**, 3301-3308.
- Hainfeld, J.F. (1987) A small gold-conjugated antibody label: improved resolution for electron microscopy. *Science*, **236**, 450-453.
- Halperin, J.A., Taratuska, A., Rynkiewicz, M. and Nicholson-Weller, A. (1993) Transient changes in erythrocyte membrane permeability are induced by sublytic amounts of the complement membrane attack complex (C5b-9). *Blood*, **81**, 200-205.
- Hanada, K. (2005) Sphingolipids in infectious diseases. *Jpn J Infect Dis*, **58**, 131-148.
- Hardie, K.R., Schulze, A., Parker, M.W. and Buckley, J.T. (1995) Vibrio spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation. *Mol Microbiol*, **17**, 1035-1044.
- Harris, J.R., Bhakdi, S., Meissner, U., Scheffler, D., Bittman, R., Li, G., Zitzer, A. and Palmer, M. (2002) Interaction of the Vibrio cholerae cytolysin (VCC) with cholesterol, some cholesterol esters, and cholesterol derivatives: a TEM study. *J Struct Biol*, **139**, 122-135.
- Havlicek, V., Higgins, L., Chen, W., Halada, P., Šebo, P., Sakamoto, H. and Hackett, M. (2001) Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom*, **36**, 384-391.
- Hazenbos, W.L., van den Berg, B.M., van't Wout, J.W., Mooi, F.R. and van Furth, R. (1994) Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized Bordetella pertussis by human monocytes. *Infect Immun*, **62**, 4818-4824.
- Hertle, R. (2000) Serratia type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci*, **1**, 75-89.
- Hertle, R. (2002) Serratia marcescens hemolysin (ShlA) binds artificial membranes and forms pores in a receptor-independent manner. *J Membr Biol*, **189**, 1-14.
- Hertle, R. (2005) The family of Serratia type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci*, **6**, 313-325.
- Hertle, R., Brutsche, S., Groeger, W., Hobbie, S., Koch, W., Konninger, U. and Braun, V. (1997) Specific phosphatidylethanolamine dependence of Serratia marcescens cytotoxin activity. *Mol Microbiol*, **26**, 853-865.
- Hertle, R. et Schwarz, H. (2004) Serratia marcescens internalization and replication in human bladder epithelial cells. *BMC Infect Dis*, **4**, 16.

- Heuberger, E.H., Veenhoff, L.M., Duurkens, R.H., Friesen, R.H. and Poolman, B. (2002) Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J Mol Biol*, **317**, 591-600.
- Hewlett, E.L., Donato, G.M. and Gray, M.C. (2006) Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*: more than just making cyclic AMP! *Mol Microbiol*, **59**, 447-459.
- Hewlett, E.L., Gordon, V.M., McCaffery, J.D., Sutherland, W.M. and Gray, M.C. (1989) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Identification and purification of the holotoxin molecule. *J Biol Chem*, **264**, 19379-19384.
- Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I., Gordon, V.M. and Gray, M.C. (1991) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem*, **266**, 17503-17508.
- Hewlett, E.L., Urban, M.A., Manclark, C.R. and Wolff, J. (1976) Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**, 1926-1930.
- Hillman, G.M. et Schlessinger, J. (1982) Lateral diffusion of epidermal growth factor complexed to its surface receptors does not account for the thermal sensitivity of patch formation and endocytosis. *Biochemistry*, **21**, 1667-1672.
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K. and Kang, C. (2004) Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol Microbiol*, **51**, 711-720.
- Holčíková, A., Kunická, J., Žarošská, E. and Kapičková, M. (1998) Pertuse a parapertuse v současné dětské populaci. *Čs. Pediat.*, **53**, 533-535.
- Honda, T. et Finkelstein, R.A. (1979) Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produced by cholera vibrios. *Infect Immun*, **26**, 1020-1027.
- Hong, Y., Ohishi, K., Inoue, N., Kang, J.Y., Shime, H., Horiguchi, Y., van der Goot, F.G., Sugimoto, N. and Kinoshita, T. (2002) Requirement of N-glycan on GPI-anchored proteins for efficient binding of aerolysin but not *Clostridium septicum* alpha-toxin. *Embo J*, **21**, 5047-5056.
- Horiguchi, Y., Inoue, N., Masuda, M., Kashimoto, T., Katahira, J., Sugimoto, N. and Matsuda, M. (1997) *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotizing toxin induces reorganization of actin stress fibers through deamidation of Gln-63 of the GTP-binding protein Rho. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 11623-11626.
- Horiguchi, Y., Nakai, T. and Kume, K. (1989) Purification and characterization of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. *Microb Pathog*, **6**, 361-368.
- Horiuchi, M., Nicke, A., Gomeza, J., Aschrafi, A., Schmalzing, G. and Betz, H. (2001) Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1448-1453.
- Hořejší, V. et Bartůňková, J. (2002) *Základy imunologie (2. vydání)*. Nakladatelství TRITON, Praha.
- Hořejší, V. (2003) The roles of membrane microdomains (rafts) in T cell activation. *Immunol Rev*, **191**, 148-164.
- Hořejší, V., Drbal, K., Cebecauer, M., Černý, J., Brdička, T., Angelisová, P. and Stockinger, H. (1999) GPI-microdomains: a role in signalling via immunoreceptors. *Immunol Today*, **20**, 356-361.
- Hořejší, V., Zhang, W. and Schraven, B. (2004) Transmembrane adaptor proteins: organizers of immunoreceptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 603-616.
- Howard, S.P. et Buckley, J.T. (1985) Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J Bacteriol*, **163**, 336-340.

- Chattopadhyay, K. *et* Banerjee, K.K. (2003) Unfolding of *Vibrio cholerae* hemolysin induces oligomerization of the toxin monomer. *J Biol Chem*, **278**, 38470-38475.
- Cherry, J.D. (1990) 'Pertussis vaccine encephalopathy': it is time to recognize it as the myth that it is. *Jama*, **263**, 1679-1680.
- Chopra, A.K., Xu, X., Ribardo, D., Gonzalez, M., Kuhl, K., Peterson, J.W. and Houston, C.W. (2000) The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect Immun*, **68**, 2808-2818.
- Iida, K., Whitlow, M.B. and Nussenzweig, V. (1991) Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *J Immunol*, **147**, 2638-2642.
- Ishibashi, Y., Claus, S. and Relman, D.A. (1994) Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, **180**, 1225-1233.
- Iwaki, M., Kamachi, K. and Konda, T. (2000) Stimulation of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin intoxication by its hemolysin domain. *Infect Immun*, **68**, 3727-3730.
- Iwaki, M., Ullmann, A. and Šebo, P. (1995) Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol*, **17**, 1015-1024.
- Jadhav, S.S. *et* Gairola, S. (1999) Composition of acellular pertussis and combination vaccines: a general review. *Biologicals*, **27**, 105-110.
- Johansson, A., Claesson, R., Hanstrom, L., Sandstrom, G. and Kalfas, S. (2000) Polymorphonuclear leukocyte degranulation induced by leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res*, **35**, 85-92.
- Jorgensen, S.E., Hammer, R.F. and Wu, G.K. (1980) Effects of a single hit from the alpha hemolysin produced by *Escherichia coli* on the morphology of sheep erythrocytes. *Infect Immun*, **27**, 988-994.
- Jorgensen, S.E., Mulcahy, P.F., Wu, G.K. and Louis, C.F. (1983) Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by *Escherichia coli* hemolysin. *Toxicon*, **21**, 717-727.
- Kang, D.S., Ryberg, K., Morgelin, M. and Leeb-Lundberg, L.M. (2004) Spontaneous formation of a proteolytic B1 and B2 bradykinin receptor complex with enhanced signaling capacity. *J Biol Chem*, **279**, 22102-22107.
- Karimova, G., Ullmann, A. and Ladant, D. (2000) A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **328**, 59-73.
- Kashimoto, T., Katahira, J., Cornejo, W.R., Masuda, M., Fukuoh, A., Matsuzawa, T., Ohnishi, T. and Horiguchi, Y. (1999) Identification of functional domains of Bordetella dermonecrotizing toxin. *Infect Immun*, **67**, 3727-3732.
- Kashino, Y. (2003) Separation methods in the analysis of protein membrane complexes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **797**, 191-216.
- Kaslow, H.R. *et* Burns, D.L. (1992) Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *Faseb J*, **6**, 2684-2690.
- Kern, D.E., Klarinet, J.P., Jensen, M.C. and Greenberg, P.D. (1986) Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I-restricted CTL. *J Immunol*, **136**, 4303-4310.

- Khelef, N., Sakamoto, H. and Guiso, N. (1992) Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog*, **12**, 227-235.
- Khelef, N., Zychlinsky, A. and Guiso, N. (1993) *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, **61**, 4064-4071.
- Kim, J.F., Ham, J.H., Bauer, D.W., Collmer, A. and Beer, S.V. (1998) The *hrpC* and *hrpN* operons of *Erwinia chrysanthemi* EC16 are flanked by *plcA* and homologs of hemolysin/adhesin genes and accompanying activator/transporter genes. *Mol Plant Microbe Interact*, **11**, 563-567.
- Kleanthous, C. et Walker, D. (2001) Immunity proteins: enzyme inhibitors that avoid the active site. *Trends Biochem Sci*, **26**, 624-631.
- Knapp, O., Maier, E., Polleichtner, G., Mašín, J., Šebo, P. and Benz, R. (2003) Channel formation in model membranes by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: effect of calcium. *Biochemistry*, **42**, 8077-8084.
- Konig, W., Faltin, Y., Scheffer, J., Schoffler, H. and Braun, V. (1987) Role of cell-bound hemolysin as a pathogenicity factor for *Serratia* infections. *Infect Immun*, **55**, 2554-2561.
- Koronakis, V., Andersen, C. and Hughes, C. (2001) Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 403-407.
- Koronakis, V., Eswaran, J. and Hughes, C. (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem*, **73**, 467-489.
- Koumanov, K.S., Tessier, C., Momchilova, A.B., Rainteau, D., Wolf, C. and Quinn, P.J. (2005) Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*, **434**, 150-158.
- Škovránková, J., Komárek, V. and Paděrová, K. (2004) Indikace očkování proti tetanu, záškrtu a černému kašli vakcínou obsahující acelulární pertusovou složku. *Pediatric pro praxi*, **2**, 67-68.
- Krasilnikov, O.V., Muratkhodjaev, J.N. and Zitzer, A.O. (1992) The mode of action of *Vibrio cholerae* cytolysin. The influences on both erythrocytes and planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta*, **1111**, 7-16.
- Krause, K.H., Fivaz, M., Monod, A. and van der Goot, F.G. (1998) Aerolysin induces G-protein activation and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores in human granulocytes. *J Biol Chem*, **273**, 18122-18129.
- Kuno-Sakai, H., Kimura, M. and Watanabe, H. (2004) Verification of components of acellular pertussis vaccines that have been distributed solely, been in routine use for the last two decades and contributed greatly to control of pertussis in Japan. *Biologicals*, **32**, 29-35.
- Ladant, D. (1988) Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem*, **263**, 2612-2618.
- Ladant, D., Glaser, P. and Ullmann, A. (1992) Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem*, **267**, 2244-2250.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R. and Korostoff, J. (1999) The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends Microbiol*, **7**, 356-361.
- Laoide, B.M. et Ullmann, A. (1990) Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella pertussis* *cya* operon. *Embo J*, **9**, 999-1005.
- Lazdunski, C.J. (1995) Colicin import and pore formation: a system for studying protein transport across membranes? *Mol Microbiol*, **16**, 1059-1066.



- Lee, S.J., Gray, M.C., Guo, L., Šebo, P. and Hewlett, E.L. (1999) Epitope mapping of monoclonal antibodies against Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. *Infect Immun*, **67**, 2090-2095.
- Lee, S.J., Gray, M.C., Zu, K. and Hewlett, E.L. (2005) Oligomeric behavior of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin in solution. *Arch Biochem Biophys*, **438**, 80-87.
- Leininger, E., Roberts, M., Kenimer, J.G., Charles, I.G., Fairweather, N., Novotny, P. and Brennan, M.J. (1991) Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing Bordetella pertussis surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 345-349.
- Liese, J.G., Meschievitz, C.K., Harzer, E., Froeschle, J., Hosbach, P., Hoppe, J.E., Porter, F., Stojanov, S., Niinivaara, K., Walker, A.M. and Belohradsky, B.H. (1997) Efficacy of a two-component acellular pertussis vaccine in infants. *Pediatr Infect Dis J*, **16**, 1038-1044.
- Locht, C., Antoine, R. and Jacob-Dubuisson, F. (2001) Bordetella pertussis, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 82-89.
- Locht, C., Antoine, R., Raze, D., Mielcarek, N., Hot, D., Lemoine, Y. and Mascart, F. (2004) Bordetella pertussis from functional genomics to intranasal vaccination. *Int J Med Microbiol*, **293**, 583-588.
- Lo-Man, R., Langeveld, J.P., Deriaud, E., Jehanno, M., Rojas, M., Clement, J.M., Meloen, R.H., Hofnung, M. and Leclerc, C. (2000) Extending the CD4(+) T-cell epitope specificity of the Th1 immune response to an antigen using a Salmonella enterica serovar typhimurium delivery vehicle. *Infect Immun*, **68**, 3079-3089.
- Loucká, J. (2003) Adenylátcyklázový toxin bakterie Bordetella pertussis: interakce s cílovými buňkami a využití jako nosiče cizorodých antigenů. *Doktorská dizertační práce (uložená v knihovně katedry genetiky a mikrobiologie PřF UK)*.
- Loucká, J., Schlecht, G., Vodolánová, J., Leclerc, C. and 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.
- Ludwig, A., Benz, R. and Goebel, W. (1993) Oligomerization of Escherichia coli haemolysin (HlyA) is involved in pore formation. *Mol Gen Genet*, **241**, 89-96.
- MacKenzie, C.R., Hiram, T. and Buckley, J.T. (1999) Analysis of receptor binding by the channel-forming toxin aerolysin using surface plasmon resonance. *J Biol Chem*, **274**, 22604-22609.
- Macková, J., Stašíková, J., Kutinová, L., Mašín, J., Hainz, P., Šimšová, M., Gabriel, P., Šebo, P. and Němečková, S. (2006) Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunol Immunother*, **55**, 39-46.
- Maki, D.G., Hennekens, C.G., Phillips, C.W., Shaw, W.V. and Bennett, J.V. (1973) Nosocomial urinary tract infection with Serratia marcescens: an epidemiologic study. *J Infect Dis*, **128**, 579-587.
- Malev, V.V., Schagina, L.V., Gurnev, P.A., Takemoto, J.Y., Nestorovich, E.M. and Bezrukov, S.M. (2002) Syringomycin E channel: a lipidic pore stabilized by lipopeptide? *Biophys J*, **82**, 1985-1994.
- Martin, C., Requero, M.A., Mašín, J., Konopasek, I., Goni, F.M., Šebo, P. and Ostolaza, H. (2004) Membrane restructuring by Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J Bacteriol*, **186**, 3760-3765.
- Mascarell, L., Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D. and Leclerc, C. (2005) Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8+ T-cell

- responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *J Virol*, **79**, 9872-9884.
- Mašín, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C. and Šebo, P. (2005) Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry*, **44**, 12759-12766.
- Mašín, J., Konopásek, I., Svobodová, J. and Šebo, P. (2004) Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1660**, 144-154.
- Mastrangelo, M.J., Maguire, H.C. and Lattime, E.C. (2000) Intralesional vaccinia/GM-CSF recombinant virus in the treatment of metastatic melanoma. *Adv Exp Med Biol*, **465**, 391-400.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y. and Horiguchi, Y. (2000) Activation of rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *Embo J*, **19**, 521-530.
- Masuda, M., Minami, M., Shime, H., Matsuzawa, T. and Horiguchi, Y. (2002) In vivo modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun*, **70**, 998-1001.
- Matheson, A.J. et Goa, K.L. (2000) Diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine adsorbed (Triacelluvax; DTaP3-CB): a review of its use in the prevention of *Bordetella pertussis* infection. *Paediatr Drugs*, **2**, 139-159.
- Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M. and Horiguchi, Y. (2004) *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *J Biol Chem*, **279**, 2866-2872.
- Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Katahira, J. and Horiguchi, Y. (2002) Identification of a receptor-binding domain of *Bordetella* dermonecrotic toxin. *Infect Immun*, **70**, 3427-3432.
- Mattoo, S. et Cherry, J.D. (2005) Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*, **18**, 326-382.
- Meade, B.D., Kind, P.D. and Manclark, C.R. (1984) Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* alters mononuclear phagocyte circulation and response to inflammation. *Infect Immun*, **46**, 733-739.
- Menestrina, G. (1988) *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett*, **232**, 217-220.
- Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I.B. and Bhakdi, S. (1987) *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, **905**, 109-117.
- Merrill, A.R. et Cramer, W.A. (1990) Identification of a voltage-responsive segment of the potential-gated colicin E1 ion channel. *Biochemistry*, **29**, 8529-8534.
- Mills, K.H. (2001) Immunity to *Bordetella pertussis*. *Microbes Infect*, **3**, 655-677.
- Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks, C.L., Ban, N. and Frank, J. (2005) Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, **438**, 318-324.
- Mock, M. et Ullmann, A. (1993) Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol*, **1**, 187-192.
- Moore, D.L., Le Saux, N., Scheifele, D. and Halperin, S.A. (2004) Lack of evidence of encephalopathy related to pertussis vaccine: active surveillance by IMPACT, Canada, 1993-2002. *Pediatr Infect Dis J*, **23**, 568-571.



- Moran, M. *et* Miceli, M.C. (1998) Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity*, **9**, 787-796.
- Morgan, P.J., Hyman, S.C., Rowe, A.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. and Saibil, H.R. (1995) Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett*, **371**, 77-80.
- Moschioni, M., Tombola, F., de Bernard, M., Coelho, A., Zitzer, A., Zoratti, M. and Montecucco, C. (2002) The *Vibrio cholerae* haemolysin anion channel is required for cell vacuolation and death. *Cell Microbiol*, **4**, 397-409.
- Nakazawa, A. *et* Tamada, T. (1972) Stimulation of colicin E 1 synthesis by cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in mitomycin C-induced *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, **46**, 1004-1010.
- Narayanan, S.K., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M. and Stewart, G.C. (2002) Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol*, **84**, 337-356.
- Nau, C.D. *et* Konisky, J. (1989) Evolutionary relationship between the TonB-dependent outer membrane transport proteins: nucleotide and amino acid sequences of the *Escherichia coli* colicin I receptor gene. *J Bacteriol*, **171**, 1041-1047.
- Nelson, K.L., Brodsky, R.A. and Buckley, J.T. (1999) Channels formed by subnanomolar concentrations of the toxin aerolysin trigger apoptosis of T lymphomas. *Cell Microbiol*, **1**, 69-74.
- Nguyen, V.T., Kamio, Y. and Higuchi, H. (2003) Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes. *Embo J*, **22**, 4968-4979.
- Nicke, A., Baumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E. and Schmalzing, G. (1998) P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *Embo J*, **17**, 3016-3028.
- Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H.O. and Heijbel, H. (1997) Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines. *Lancet*, **350**, 1569-1577.
- Olson, L.C. (1975) Pertussis. *Medicine (Baltimore)*, **54**, 427-469.
- Olson, R. *et* Gouaux, E. (2003) *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Sci*, **12**, 379-383.
- Ortiz-Carranza, O. and Czuprynski, C.J. (1992) Activation of bovine neutrophils by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin is calcium dependent. *J Leukoc Biol*, **52**, 558-564.
- Osička, R., Osičková, A., Basar, T., Guermonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Šebo, P. (2000) Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun*, **68**, 247-256.
- Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R. and 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.
- Otero, A.S., Yi, X.B., Gray, M.C., Szabo, G. and Hewlett, E.L. (1995) Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem*, **270**, 9695-9697.

- Palek, J., Liu, S.C. and Snyder, L.M. (1978) Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. I. Analysis of spectrin-rich complexes in ATP-depleted red cells. *Blood*, **51**, 385-395.
- Parker, M.W., Buckley, J.T., Postma, J.P., Tucker, A.D., Leonard, K., Pattus, F. and Tsernoglou, D. (1994) Structure of the *Aeromonas* toxin proaerolysin in its water-soluble and membrane-channel states. *Nature*, **367**, 292-295.
- Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D. and Tsernoglou, D. (1989) Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature*, **337**, 93-96.
- Parker, M.W., van der Goot, F.G. and Buckley, J.T. (1996) Aerolysin--the ins and outs of a model channel-forming toxin. *Mol Microbiol*, **19**, 205-212.
- Parton, R.G. et Richards, A.A. (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, **4**, 724-738.
- Pattus, F., Cavard, D., Crozel, V., Baty, D., Adrian, M. and Lazdunski, C. (1985) pH-dependent membrane fusion is promoted by various colicins. *Embo J*, **4**, 2469-2474.
- Pearson, R.D., Symes, P., Conboy, M., Weiss, A.A. and Hewlett, E.L. (1987) Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol*, **139**, 2749-2754.
- Peng, S., Tomson, T.T., Trimble, C., He, L., Hung, C.F. and Wu, T.C. (2006) A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Ther*, **13**, 257-265.
- Peterson, A.A. et Cramer, W.A. (1987) Voltage-dependent, monomeric channel activity of colicin E1 in artificial membrane vesicles. *J Membr Biol*, **99**, 197-204.
- Philimonenko, V.V., Flechon, J.E. and Hozak, P. (2001) The nucleoskeleton: a permanent structure of cell nuclei regardless of their transcriptional activity. *Exp Cell Res*, **264**, 201-210.
- Pichel, M., Rivas, M., Chinen, I., Martin, F., Ibarra, C. and Binsztein, N. (2003) Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J Clin Microbiol*, **41**, 124-134.
- Pincus, S., Tartaglia, J. and Paoletti, E. (1995) Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Biologicals*, **23**, 159-164.
- Preville, X., Ladant, D., Timmerman, B. and Leclerc, C. (2005) Eradication of established tumors by vaccination with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Cancer Res*, **65**, 641-649.
- Pugsley, A.P., Francetic, O., Possot, O.M., Sauvonnnet, N. and Hardie, K.R. (1997) Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene*, **192**, 13-19.
- Rappuoli, R., Podda, A., Pizza, M., Covacci, A., Bartoloni, A., de Magistris, M.T. and Nencioni, L. (1992) Progress towards the development of new vaccines against whooping cough. *Vaccine*, **10**, 1027-1032.
- Rayevskaya, M.V. et Frankel, F.R. (2001) Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J Virol*, **75**, 2786-2791.
- Relman, D., Tuomanen, E., Falkow, S., Golenbock, D.T., Saukkonen, K. and Wright, S.D. (1990) Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell*, **61**, 1375-1382.
- Relman, D.A., Domenighini, M., Tuomanen, E., Rappuoli, R. and Falkow, S. (1989) Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*: nucleotide sequence and crucial role in adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2637-2641.

- Robbins, J.B., Schneerson, R., Trollfors, B., Sato, H., Sato, Y., Rappuoli, R. and Keith, J.M. (2005) The diphtheria and pertussis components of diphtheria-tetanus toxoids-pertussis vaccine should be genetically inactivated mutant toxins. *J Infect Dis*, **191**, 81-88.
- Rogel, A. et Hanski, E. (1992) Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem*, **267**, 22599-22605.
- Rogel, A., Meller, R. and Hanski, E. (1991) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem*, **266**, 3154-3161.
- Rogel, A., Schultz, J.E., Brownlie, R.M., Coote, J.G., Parton, R. and Hanski, E. (1989) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J*, **8**, 2755-2760.
- Roch-Arveiller, M., Boquet, P., Bradshaw, D. and Giroud, J.P. (1979) Inhibition by cholera toxin of rat polymorphonuclear leukocyte chemotaxis demonstrated in vitro and in vivo. *Infect Immun*, **25**, 187-190.
- Roos, N. et Morgan, A.J. (1990) *Cryopreparation of Thin Biological Specimens for Electron Microscopy: Methods and Applications*. Oxford University Press, New York.
- Ropele, M. et Menestrina, G. (1989) Electrical properties and molecular architecture of the channel formed by *Escherichia coli* hemolysin in planar lipid membranes. *Biochim Biophys Acta*, **985**, 9-18.
- Rose, T., Šebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D. (1995) Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem*, **270**, 26370-26376.
- Rosenthal, R.S., Nogami, W., Cookson, B.T., Goldman, W.E. and Folkening, W.J. (1987) Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin. *Infect Immun*, **55**, 2117-2120.
- Ross, P.J., Lavelle, E.C., Mills, K.H. and Boyd, A.P. (2004) Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells. *Infect Immun*, **72**, 1568-1579.
- Saha, N. et Banerjee, K.K. (1997) Carbohydrate-mediated regulation of interaction of *Vibrio cholerae* hemolysin with erythrocyte and phospholipid vesicle. *J Biol Chem*, **272**, 162-167.
- Sambrook et Russel. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*.
- Sanders, S.K., Alexander, E.L. and Braylan, R.C. (1975) A high-yield technique for preparing cells fixed in suspension for scanning electron microscopy. *J Cell Biol*, **67**, 476-480.
- Santoso, S., Zimmermann, U., Neppert, J. and Mueller-Eckhardt, C. (1986) Receptor patching and capping of platelet membranes induced by monoclonal antibodies. *Blood*, **67**, 343-349.
- Saron, M.F., Fayolle, C., Šebo, P., Ladant, D., Ullmann, A. and Leclerc, C. (1997) Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3314-3319.
- Sekiya, K. et Futaesaku, Y. (1998) Characterization of the damage to membranes caused by bacterial cytolysins. *J Electron Microsc (Tokyo)*, **47**, 543-552.

- Shen, Y., Lee, Y.S., Soelaiman, S., Bergson, P., Lu, D., Chen, A., Beckingham, K., Grabarek, Z., Mrksich, M. and Tang, W.J. (2002) Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylyl cyclase exotoxins. *Embo J*, **21**, 6721-6732.
- Shields, W.D., Nielsen, C., Buch, D., Jacobsen, V., Christenson, P., Zachau-Christiansen, B. and Cherry, J.D. (1988) Relationship of pertussis immunization to the onset of neurologic disorders: a retrospective epidemiologic study. *J Pediatr*, **113**, 801-805.
- Schaeffer, L.M. et Weiss, A.A. (2001) Pertussis toxin and lipopolysaccharide influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human monocytes. *Infect Immun*, **69**, 7635-7641.
- Schagger, H. et von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, **199**, 223-231.
- Schiebel, E. et Braun, V. (1989) Integration of the *Serratia marcescens* haemolysin into human erythrocyte membranes. *Mol Microbiol*, **3**, 445-453.
- Schlecht, G., Loucka, J., Najar, H., Šebo, P. and Leclerc, C. (2004) Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol*, **173**, 6089-6097.
- Schmitt, H.J., von König, C.H., Neiss, A., Bogaerts, H., Bock, H.L., Schulte-Wissermann, H., Gahr, M., Schult, R., Folkens, J.U., Rauh, W. and Clemens, R. (1996) Efficacy of acellular pertussis vaccine in early childhood after household exposure. *Jama*, **275**, 37-41.
- Schnell, S., Young, J.W., Houghton, A.N. and Sadelain, M. (2000) Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4+ T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J Immunol*, **164**, 1243-1250.
- Schonherr, R., Hilger, M., Broer, S., Benz, R. and Braun, V. (1994) Interaction of *Serratia marcescens* hemolysin (ShlA) with artificial and erythrocyte membranes. Demonstration of the formation of aqueous multistate channels. *Eur J Biochem*, **223**, 655-663.
- Schuck, S. et Simons, K. (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci*, **117**, 5955-5964.
- Simondon, F., Preziosi, M.P., Yam, A., Kane, C.T., Chabirand, L., Iteman, I., Sanden, G., Mboup, S., Hoffenbach, A., Knudsen, K., Guiso, N., Wassilak, S. and Cadoz, M. (1997) A randomized double-blind trial comparing a two-component acellular to a whole-cell pertussis vaccine in Senegal. *Vaccine*, **15**, 1606-1612.
- Simons, K. et Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
- Singer, S.J., Maher, P.A. and Yaffe, M.P. (1987) On the transfer of integral proteins into membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1960-1964.
- Singer, S.J. et Nicolson, G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
- Slatin, S.L. (1988) Colicin E1 in planar lipid bilayers. *Int J Biochem*, **20**, 737-744.
- Slatin, S.L., Duche, D., Kienker, P.K. and Baty, D. (2004) Gating movements of colicin A and colicin Ia are different. *J Membr Biol*, **202**, 73-83.
- Slatin, S.L., Nardi, A., Jakes, K.S., Baty, D. and Duche, D. (2002) Translocation of a functional protein by a voltage-dependent ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1286-1291.
- Slatin, S.L., Qiu, X.Q., Jakes, K.S. and Finkelstein, A. (1994) Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature*, **371**, 158-161.

- Slot, J.W., Posthuma, G., Chang, L.Y., Crapo, J.D. and Geuze, H.J. (1989) Quantitative aspects of immunogold labeling in embedded and in nonembedded sections. *Am J Anat*, **185**, 271-281.
- Sobko, A.A., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Zakharov, S.D. and Cramer, W.A. (2004) Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett*, **576**, 205-210.
- Soloaga, A., Veiga, M.P., Garcia-Segura, L.M., Ostolaza, H., Brasseur, R. and Goni, F.M. (1999) Insertion of Escherichia coli alpha-haemolysin in lipid bilayers as a non-transmembrane integral protein: prediction and experiment. *Mol Microbiol*, **31**, 1013-1024.
- Stephenson, J.B. (1988) A neurologist looks at neurological disease temporally related to DTP immunization. *Tokai J Exp Clin Med*, **13 Suppl**, 157-164.
- Stibitz, S. et Yang, M.S. (1991) Genetic and immunological studies on polypeptides encoded by the vir locus of Bordetella pertussis. *Dev Biol Stand*, **73**, 87-91.
- Stolz, J., Stadler, R., Opekarova, M. and Sauer, N. (1994) Functional reconstitution of the solubilized Arabidopsis thaliana STP1 monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter in lipid vesicles and purification of the histidine tagged protein from transgenic Saccharomyces cerevisiae. *Plant J*, **6**, 225-233.
- Stroud, R. (1995) Ion channel forming colicins. *Curr Opin Struct Biol*, **5**, 514-520.
- Szabo, G., Gray, M.C. and Hewlett, E.L. (1994) Adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem*, **269**, 22496-22499.
- Šebo, P., Fayolle, C., d'Andria, O., Ladant, D., Leclerc, C. and Ullmann, A. (1995) Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of Bordetella pertussis allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Infect Immun*, **63**, 3851-3857.
- Šebo, P., Moukrim, Z., Kalhous, M., Schaft, N., Dadaglio, G., Sheshko, V., Fayolle, C. and Leclerc, C. (1999) In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis carrying multiple copies of a viral CD8(+) T-cell epitope. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **26**, 167-173.
- Šimšová, M., Šebo, P. and Leclerc, C. (2004) The adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis-a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *Int J Med Microbiol*, **293**, 571-576.
- Tessman, E.S. et Peterson, P.K. (1980) tif-dependent induction of colicin E1, prophage lambda, and filamentation in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol*, **143**, 1307-1317.
- Toes, R.E., Ossendorp, F., Offringa, R. and Melief, C.J. (1999) CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med*, **189**, 753-756.
- Trollfors, B. et Taranger, J. (1997) Towards better pertussis vaccines. *Ann Med*, **29**, 87-89.
- Tsitrin, Y., Morton, C.J., el-Bez, C., Paumard, P., Velluz, M.C., Adrian, M., Dubochet, J., Parker, M.W., Lanzavecchia, S. and van der Goot, F.G. (2002) Conversion of a transmembrane to a water-soluble protein complex by a single point mutation. *Nat Struct Biol*, **9**, 729-733.
- Tuomanen, E., Weiss, A., Rich, R., Zak, F. et Zak, O. (1985) Filamentous hemagglutinin and pertussis toxin promote adherence of Bordetella pertussis to cilia. *Dev Biol Stand*, **61**, 197-204.
- Valeva, A., Walev, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Heinz, N., Hedderich, J., Lautwein, S., Mocking, M., Weis, S., Zitzer, A. and Bhakdi, S. (2005) Identification of the membrane penetrating domain of Vibrio cholerae cytolysin as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol*, **57**, 124-131.

- Valeva, A., Waley, I., Weis, S., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Endres, K., Fahrenholz, F., Bhakdi, S. *et* Zitzer, A. (2004) A cellular metalloproteinase activates *Vibrio cholerae* pro-cytolysin. *J Biol Chem*, **279**, 25143-25148.
- van den Berg, B.M., Beekhuizen, H., Willems, R.J., Mooi, F.R. and van Furth, R. (1999) Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun*, **67**, 1056-1062.
- van der Goot, F.G., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H. and Pattus, F. (1991) A 'molten-globule' membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature*, **354**, 408-410.
- van der Goot, F.G., Lakey, J., Pattus, F., Kay, C.M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. and Buckley, J.T. (1992) Spectroscopic study of the activation and oligomerization of the channel-forming toxin aerolysin: identification of the site of proteolytic activation. *Biochemistry*, **31**, 8566-8570.
- van Meer, G. *et* Sprong, H. (2004) Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr Opin Cell Biol*, **16**, 373-378.
- Vojtová, J., Kamanová, J. and Šebo, P. (2006a) *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 69-75.
- Vojtová, J., Kofroňová, O., Šebo, P. and Benada, O. (2006b) *Bordetella* adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes. *Microsc Res Tech*, **69**, 119-129.
- von Konig, C.H., Halperin, S., Riffelmann, M. and Guiso, N. (2002) Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis*, **2**, 744-750.
- Vordermeier, H.M., Šimšová, M., Wilkinson, K.A., Wilkinson, R.J., Hewinson, R.G., Šebo, P. *et* Leclerc, C. (2004) Recognition of mycobacterial antigens delivered by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by T cells from cattle with bovine tuberculosis. *Infect Immun*, **72**, 6255-6261.
- Vospělová, J. *et* Zapletalová, J. (2004) Stále aktuální pertuse. *Pediatric pro praxi*, **4**, 204-206.
- Waleh, N.S. *et* Johnson, P.H. (1985) Structural and functional organization of the colicin E1 operon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8389-8393.
- Walker, G., Hertle, R. *et* Braun, V. (2004) Activation of *Serratia marcescens* hemolysin through a conformational change. *Infect Immun*, **72**, 611-614.
- Wallace, A.J., Stillman, T.J., Atkins, A., Jamieson, S.J., Bullough, P.A., Green, J. and Artymiuk, P.J. (2000) *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell*, **100**, 265-276.
- Weber, K., Rathke, P.C. *et* Osborn, M. (1978) Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 1820-1824.
- Wedemeyer, H., Gagneten, S., Davis, A., Bartenschlager, R., Feinstone, S. and Rehmann, B. (2001) Oral immunization with HCV-NS3-transformed *Salmonella*: induction of HCV-specific CTL in a transgenic mouse model. *Gastroenterology*, **121**, 1158-1166.
- Weingart, C.L., Mobberley-Schuman, P.S., Hewlett, E.L., Gray, M.C. and Weiss, A.A. (2000) Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils. *Infect Immun*, **68**, 7152-7155.
- Weingart, C.L. *et* Weiss, A.A. (2000) *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun*, **68**, 1735-1739.
- Weiss, A.A. *et* Hewlett, E.L. (1986) Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol*, **40**, 661-686.



- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A. et Falkow, S. (1984) Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*, **150**, 219-222.
- WHO. (1999) Pertussis vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, **74**, 137-142.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P. and Stroud, R.M. (1997) Crystal structure of colicin Ia. *Nature*, **385**, 461-464.
- Wilkinson, K.A., Šimsová, M., Scholvinck, E., Šebo, P., Leclerc, C., Vordermeier, H.M., Dickson, S.J., Brown, J.R., Davidson, R.N., Pasvol, G., Levin, M. and Wilkinson, R.J. (2005) Efficient Ex vivo stimulation of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase antigen toxoids. *Infect Immun*, **73**, 2991-2998.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R. et Berkowitz, S.A. (1980) Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3841-3844.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. and Seed, B. (1998) Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity*, **8**, 723-732.
- Yamaji-Hasegawa, A., Makino, A., Baba, T., Senoh, Y., Kimura-Suda, H., Sato, S.B., Terada, N., Ohno, S., Kiyokawa, E., Umeda, M. and Kobayashi, T. (2003) Oligomerization and pore formation of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *J Biol Chem*, **278**, 22762-22770.
- Zakharov, S.D. et Cramer, W.A. (2002a) Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim Biophys Acta*, **1565**, 333-346.
- Zakharov, S.D. et Cramer, W.A. (2002b) Insertion intermediates of pore-forming colicins in membrane two-dimensional space. *Biochimie*, **84**, 465-475.
- Zakharov, S.D., Rokitskaya, T.I., Shapovalov, V.L., Antonenko, Y.N. and Cramer, W.A. (2002) Tuning the membrane surface potential for efficient toxin import. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8654-8659.
- Zaretsky, F.R., Gray, M.C. and Hewlett, E.L. (2002) Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol*, **45**, 1589-1598.
- Zitzer, A., Bittman, R., Verbicky, C.A., Erukulla, R.K., Bhakdi, S., Weis, S., Valeva, A. and Palmer, M. (2001) Coupling of cholesterol and cone-shaped lipids in bilayers augments membrane permeabilization by the cholesterol-specific toxins streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin. *J Biol Chem*, **276**, 14628-14633.
- Zitzer, A., Harris, J.R., Kemminer, S.E., Zitzer, O., Bhakdi, S., Muething, J. and Palmer, M. (2000) *Vibrio cholerae* cytolysin: assembly and membrane insertion of the oligomeric pore are tightly linked and are not detectably restricted by membrane fluidity. *Biochim Biophys Acta*, **1509**, 264-274.
- Zitzer, A., Walev, I., Palmer, M. and Bhakdi, S. (1995) Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, **184**, 37-44.
- Zitzer, A., Westover, E.J., Covey, D.F. and Palmer, M. (2003) Differential interaction of the two cholesterol-dependent, membrane-damaging toxins, streptolysin O and *Vibrio cholerae* cytolysin, with enantiomeric cholesterol. *FEBS Lett*, **553**, 229-231.
- Zitzer, A., Zitzer, O., Bhakdi, S. and Palmer, M. (1999) Oligomerization of *Vibrio cholerae* cytolysin yields a pentameric pore and has a dual specificity for cholesterol and sphingolipids in the target membrane. *J Biol Chem*, **274**, 1375-1380.

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1. Publikace 1

**Vojtová, J.**, Kamanová, J. and Šebo, P. (2006) Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 69-75.



ELSEVIER

## ***Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense**

Jana Vojtova, Jana Kamanova and Peter Sebo

*Bordetella* that infect mammals produce a multifunctional repeat in toxin (RTX) adenylate cyclase toxin known as CyaA, an excellent example of bacterial sophistication in subverting host defense. Recent reports show that interaction of CyaA with tracheal epithelial cells aids adhesion of *Bordetella* to ciliated mucosa and induces production of the pro-inflammatory cytokine interleukin, IL-6. Myeloid phagocytes, attracted to the site of infection are the target of freshly secreted CyaA that binds to the  $\alpha_M\beta_2$  integrin (CD11b/CD18), penetrates cells and promptly suppresses their bactericidal functions by converting cellular ATP to cAMP. Such uncontrolled cAMP signaling can also drive CD11b-expressing immature dendritic cells into a semi-mature state, possibly hijacking them to shape the local adaptive immune response towards tolerance of the pathogen.

### Addresses

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences, Videnska 1083, 142 20 Prague, Czech Republic

Corresponding author: Sebo, Peter (sebo@biomed.cas.cz)

**Current Opinion in Microbiology** 2006, 9:69–75

This review comes from a themed issue on  
Host–microbe interactions: bacteria  
Edited by Chihiro Sasakawa and Jörg Hacker

Available online 6th January 2006

1369-5274/\$ – see front matter  
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

DOI 10.1016/j.mib.2005.12.011

### Introduction

Three *Bordetella* species are able to infect the respiratory tract of mammals: *B. pertussis*, a strictly human pathogen, causes pertussis (whooping cough) and remains endemic despite extensive vaccination programs [1,2]; *B. parapertussis* causes a somewhat milder form of pertussis in humans and can also infect sheep, whereas *B. bronchiseptica* establishes persistent and often asymptomatic respiratory infections in a wide range of mammals and occasionally also in immunocompromised humans. *B. pertussis* and *B. parapertussis* appear to have evolved from a *B. bronchiseptica*-like ancestor, essentially by losing genes and accumulating insertional mutations [3,4]. Nevertheless, the three species express overlapping arrays of adhesins and toxins. All three species produce the adenylate cyclase toxin, CyaA, a dermonecrotic toxin

(DNT) and a tracheal cytotoxin, TCT, whereas the type III secretion system (T3SS) effectors are only produced by *B. bronchiseptica* and the ovine *B. parapertussis* strains. By contrast, pertussis toxin (PT) appears to be produced exclusively by *B. pertussis*. Action of the *Bordetella* toxins, as well as the biology of *Bordetella* in general, have recently been covered in several comprehensive reviews [5–7].

In this review, we cover recent findings related to the interaction of CyaA with host cells. We focus on activation of CyaA by calmodulin, the importance of proximity between bacteria and cell in toxin action, the interaction of the toxin with cellular receptor, and immunomodulatory consequences of toxin action on dendritic and epithelial cells. For references to earlier studies on action of CyaA, refer to a previous review by Ladant and Ullman [8].

### **CyaA is a unique fusion of a cytolysin with a calmodulin-activated adenylate cyclase enzyme**

The adenylate cyclase toxin of *Bordetella*, which is also a hemolysin and cytolysin, referred to in the literature as CyaA, ACT, AC-Hly or AC toxin, is a member of the RTX (repeat in toxin) family of bacterial pore-forming toxins [9]. CyaA differs, however, from the other members of this family, however, by being a protein fusion of a cell-invasive and highly potent adenylate cyclase (AC) enzyme with a typical RTX cytolysin moiety (Figure 1). The N-terminal AC domain (~400 residues) penetrates the cytosol of target cells, where the AC is activated by binding of eukaryotic calmodulin and catalyzes unregulated conversion of cellular ATP to cAMP, a key second messenger signaling molecule [8]. The RTX hemolytic moiety (~1300 residues) accounts for binding of the toxin to target cells, for translocation of the AC domain into the cell cytosol, directly through the cytoplasmic membrane, and for making the cell membrane permeable by cation-selective toxin pores [8]. CyaA, thus, combines two distinct strategies employed by bacterial toxins for the manipulation of host cell physiology: interference with cellular signaling pathways by elevating cAMP level; and interference with ion homeostasis through disruption of the permeability barrier of the cellular membrane.

Upon activation by cytosolic calmodulin, the AC enzyme of CyaA acquires a particularly high catalytic potency,  $k_{cat} \sim 2000 \text{ s}^{-1}$ , in conversion of ATP to cAMP [10]. Recently, Guo *et al* [11] solved the crystal structure of the adenylate cyclase domain of CyaA in complex with the C-terminal fragment of calmodulin (C-CaM) (Figure 1)

**Glossary**

**Adaptive immunity:** Response of antigen-specific lymphocytes to pathogen-derived antigens. Adaptive immunity (also known as acquired immunity) depends on presentation of the antigen by antigen-presenting cells (APCs), in particular dendritic cells (DCs), and the subsequent activation of T and B lymphocytes.

**Dendritic cell (DC):** Immature DCs are phagocytic cells that circulate, or reside under resting conditions in tissues such as mucosa. Upon maturation induced by microbial and inflammatory products, DCs function as antigen-presenting cells (APCs) that migrate into mucosa-associated lymph nodes and initiate adaptive immune response. Fully mature DCs are characterized by up-regulation of MHC II and of co-stimulatory molecules, such as CD80, CD86 and CD40, and by secretion of pro-inflammatory cytokines.

**Innate immunity:** Host response that acts as the first line of defense. Innate immunity is omnipresent and involves a variety of resistance mechanisms, such as opsono-phagocytosis and oxidative burst, with broad spectrum activity on microorganisms, including bactericidal activity of phagocytic cells.

**Regulatory T cells (Tr):** T lymphocytes that control adaptive immunity. For example, Tr cells can fully suppress immune responses or modify the cellular immune responses (Th1) or antibody responses (Th2).

**RTX (repeat in toxin):** Important virulence factors produced by a wide range of Gram-negative bacteria. RTX toxins are unconventional pore-forming toxins that are characterized by binding of calcium ions to numerous sites within glycine and aspartate-rich repeats harboring a conserved sequence motif GGXGXD. The produced inactive protoxins acquire biological activity upon covalent posttranslational fatty-acylation on  $\epsilon$ -amino groups of one or two conserved internal lysine residues that is accomplished by co-expressed protein toxin acyltransferases.

**Semi-mature dendritic cell (smDC):** An intermediary differentiation stage of DCs between immature and mature DCs. As with mature DCs, semi-mature DCs also express high amounts of surface markers such as MHC II and co-stimulatory molecules, but do not secrete pro-inflammatory cytokines. *In vivo*, semi-mature DCs are actively tolerogenic by inducing IL-10-secreting regulatory CD4<sup>+</sup> T cells (Tr) in an antigen-specific manner.

**Type I secretion system:** RTX protein secretion machinery used by Gram-negative bacteria for secretion of toxins, proteases, lipases and other RTX proteins. Such factors pass directly from cytoplasm across both the inner and outer bacterial membranes in a single step, without a periplasmic intermediate, employing a 'channel-tunnel' assembly spanning the membranes and the periplasmic space.

**Type III secretion system:** A bacterial 'molecular syringe' injector assembly which enables the translocation of effector proteins directly from the site of production within cytoplasm of the adhering bacterial cells into the cytoplasm of colonized eukaryotic target cells. It involves about 20 components that assemble into a large structure that spans both bacterial membranes and penetrates also the host cell membrane.

and performed a detailed analysis of the catalytic mechanism employed by AC. This provided essential structural and mechanistic clues for understanding the high catalytic efficiency of AC ( $\sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and enabled definitive identification of catalytic residues. The structure reveals that four discrete regions of the prokaryotic AC bind to calcium-loaded eukaryotic calmodulin with a large, buried contact surface, where a tryptophan residue (W242) of AC plays a crucial role and makes extensive contacts with the calcium-induced, hydrophobic pocket of calmodulin [11\*\*].

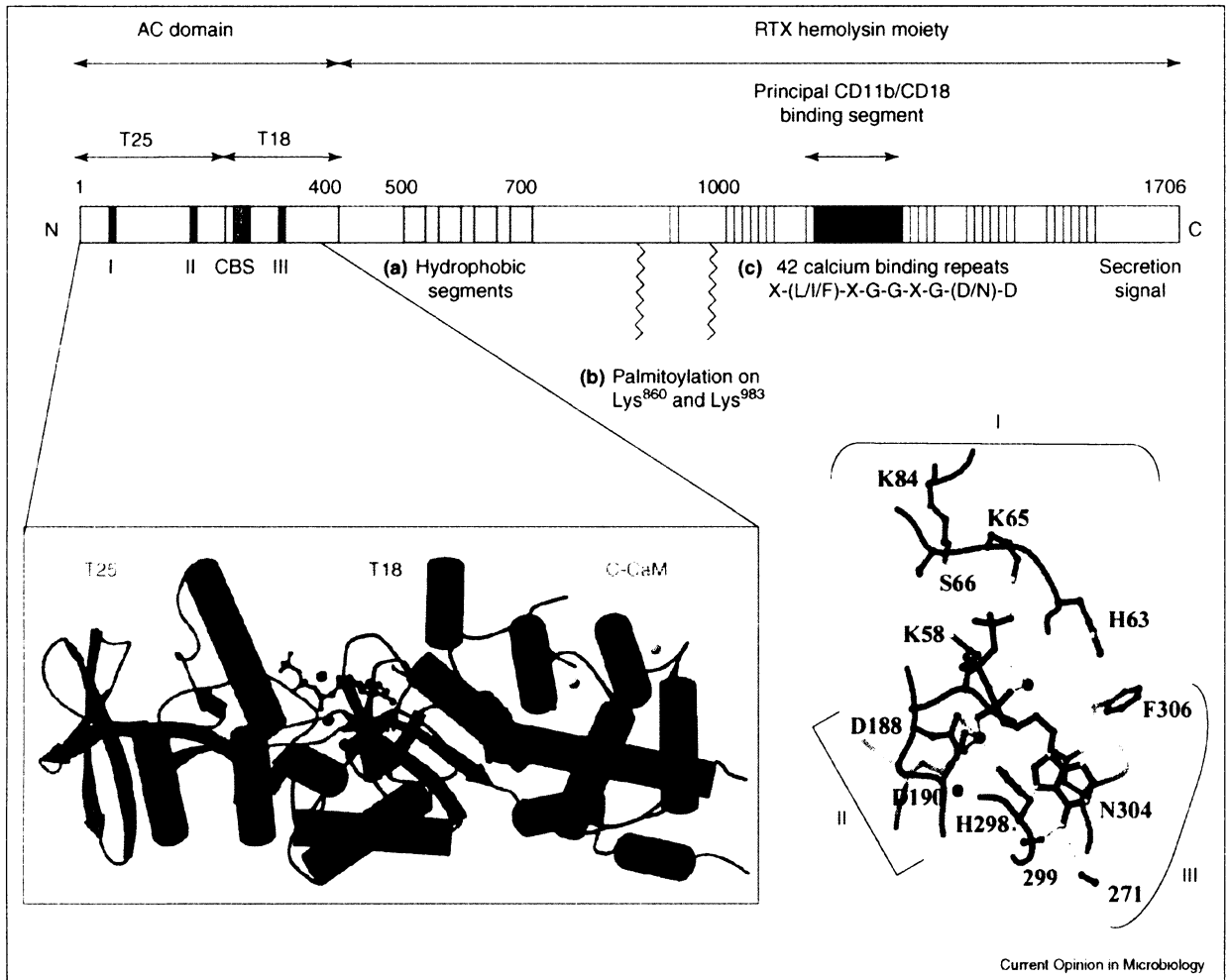
Interestingly, AC affinity for calmodulin and AC-calmodulin interactions differ substantially from those of edema

factor (EF), another calmodulin dependent adenylate cyclase toxin, produced by *Bacillus anthracis*, which, otherwise, has quite similar catalytic properties to those of the AC of CyaA [10,12]. The affinity of AC to calmodulin is  $\sim 100$ -fold higher than that of EF to calmodulin, and the need for this high affinity might reflect the different routes of entry and cellular localization of both toxins [11\*\*]. Whereas the AC domain of CyaA is directly translocated across the plasma membrane into the cytosol [13\*] and probably stays close to the plasma membrane, the EF enters the cytosol upon endocytosis and translocates across the endosomal membrane [14]. Therefore, AC and EF can be expected to compete with different sets of calmodulin-binding proteins [11\*\*]. In contrast to the delay in action of EF, the direct translocation of the AC domain of CyaA across the plasma membrane and rapid activation by calmodulin, enables immediate synthesis of large amounts of cAMP that rapidly paralyze CD11b<sup>+</sup> target cells upon exposure to CyaA.

### CyaA is a short-lived toxin acting in the proximity of the bacteria

CyaA is secreted as an unfolded protein, through a type I 'channel-tunnel' secretion system spanning the Gram-negative bacterial cell envelope, directly from Bordetella cytoplasm into the external environment [15]. Most of the CyaA, however, remains associated with the bacterial surface, as shown initially for *B. pertussis* by Hewlett *et al* [16]. It was, therefore, hypothesized that surface-bound CyaA is the active form of the toxin and that association of CyaA with filamentous hemagglutinin on the bacterial cell surface enabled delivery of CyaA from the bacterium to the target cell [17]. A recent study by Gray *et al* [18\*\*], however, established that only the freshly secreted, newly synthesized toxin molecules, and not the bacterial-surface-associated CyaA, are able to penetrate target cells and elicit elevation of cAMP levels. These authors demonstrated that proximity, but not direct physical interaction between the bacterial and the target cell membranes, was important for efficient intoxication of host cells by CyaA. Secretion of CyaA from the bacteria does not appear to occur in a polarized manner or to be limited to the bacterium-target cell interface but, rather, occurs in all directions, hence, it was proposed that freshly secreted CyaA proteins form an 'atmosphere' of active toxin molecules around the bacterial cell (Figure 2) [18\*\*]. Some of the newly synthesized CyaA molecules are secreted near the target cell surface and can reach cellular receptors and penetrate target cells before aggregating and losing activity (Figure 2). This model is supported by a recent observation that, in contrast to pertussis toxin, CyaA does not act as a conventional soluble factor *in vivo* and the intranasal administration of purified CyaA does not increase the colonization capacity of a *B. pertussis* strain defective in production of CyaA in mice [19]. The requirement of close association of bacteria with its target cell for

Figure 1

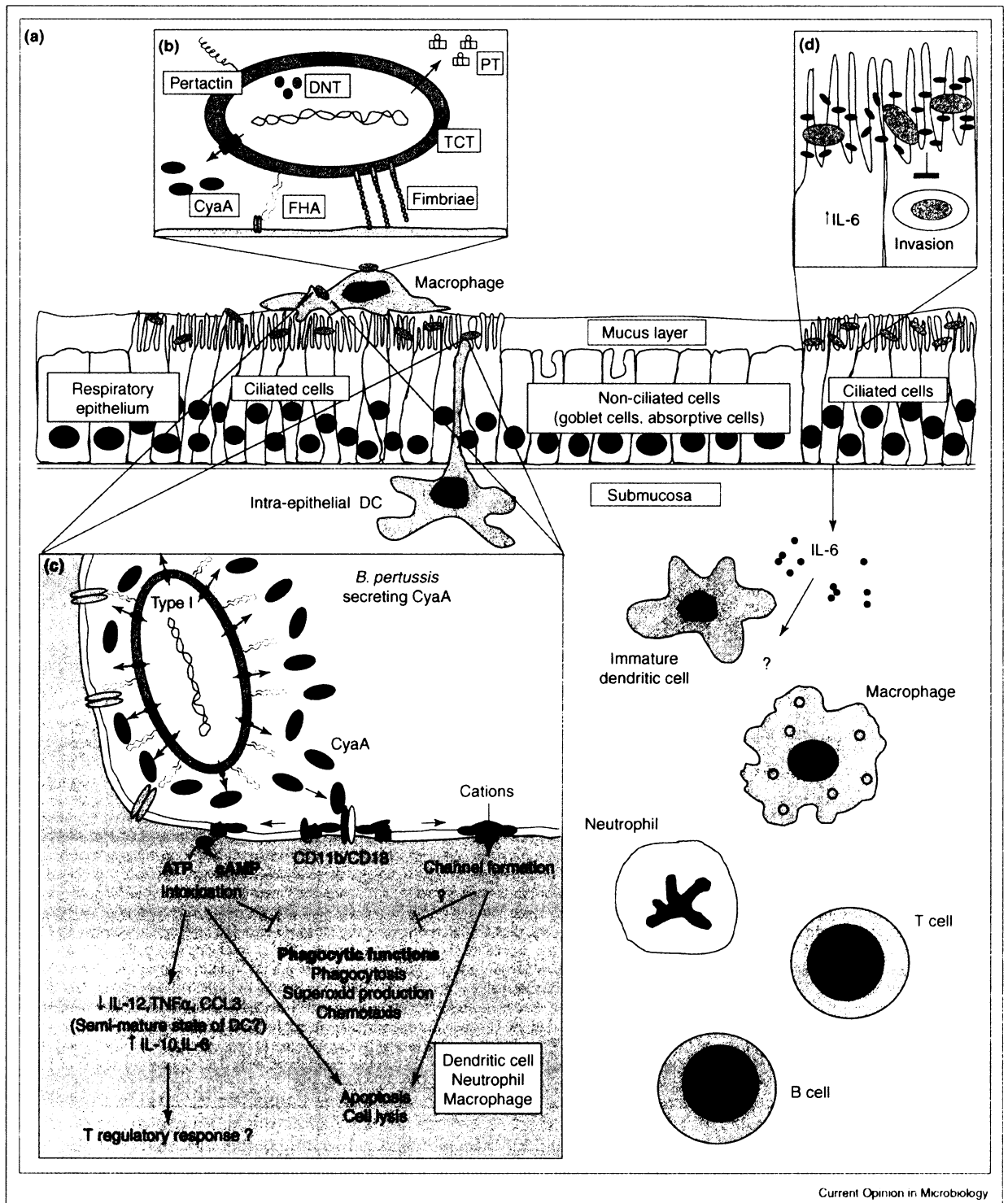


Structural organization of the 1706 residue-long *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (CyaA) toxin molecule. The N-terminal catalytic domain of ~400 residues is a cell-invasive and calmodulin-activated adenylate cyclase (AC) enzyme; T25 and T18 correspond to subdomains of AC, CBS represents the main calmodulin-binding site, and boxes I, II and III highlight the AC segments involved in catalysis. The catalytic domain is enlarged to show the recently solved three-dimensional structure of the ternary complex of AC with the C-terminal fragment of calmodulin and adefovir diphosphate, a metabolite of an anti-viral drug that tightly binds into the catalytic site of CyaA thereby mimicking binding of ATP [11\*\*]. Structure of the catalytic site with bound adefovir diphosphate (black structure) is given in further close-up (right). It shows that aspartates 188 and 190 (D188 and D190), as well as histidine 298 (H298) of AC, are crucial for binding of the catalytic  $Mg^{2+}$  metal ions (red balls) and asparagine 304 (N304) is involved in positioning of ribose, arginine 37 and three lysine residues, K58, K65 and K84 are involved in binding the triphosphate of the ATP substrate of AC. Deprotonation of 3' OH of ATP is accomplished by histidine 63 (H63), the central catalytic residue of AC. The last ~1300 residues represent an RTX hemolysin moiety (Hly) of CyaA. This harbors (a) the hydrophobic domain forming cation-selective membrane pores, (b) the acylated domain, where post-translational activation of the protoxin is accomplished through CyaC-mediated covalent fatty-acylation of either of  $\epsilon$ -amino groups of Lys<sup>860</sup> and Lys<sup>983</sup> [27\*] and (c) the RTX repeat blocks binding of calcium ions (~40  $Ca^{2+}$  per CyaA molecule) and allowing interaction of toxin with its  $\beta_2$  integrin receptor CD11b/CD18 on myeloid phagocytic cells [25]. Concerted action of these segments allows toxin interaction with and translocation of the AC domain across target cell membrane.

effective cell intoxication by CyaA to occur, indeed agrees with observations from the early *in vitro* studies, showing that CyaA readily forms inactive toxin aggregates in solution [20]. Upon secretion, a significant proportion of CyaA molecules appear to become trapped on the bacterial surface, and are unable to penetrate target cells

[18\*\*]. Interestingly, this bacterial cell-associated CyaA still appears to be of potential benefit to the producing bacteria, as Edwards *et al* [21\*] showed that CyaA associated with surface of *B. bronchiseptica* cells might make an important contribution to the ability of the bacteria adhere to ciliated epithelium.

Figure 2



Schematic depiction of key steps of CyaA interaction with target cells in the course of *Bordetella pertussis* infection of the host respiratory tract mucosa (a) *B. pertussis* colonizes the ciliated columnar epithelium in the trachea and nasopharynx and can also adhere to host immune cells (e.g. incoming macrophages or resident intraepithelial dendritic cells). (b) Main virulence factors of *B. pertussis*. Adhesins: filamentous

### CyaA targets CD11b-expressing myeloid cells

CyaA promiscuously binds to and detectably raises cAMP levels in several cell types *in vitro* [8]. *In vivo* studies, however, indicate that CyaA exerts its activity primarily on myeloid phagocytes, such as alveolar macrophages and neutrophils [22,23]. CyaA was found to bind with high affinity to the  $\alpha_M\beta_2$  integrin, CD11b/CD18 (also known as CR3 or Mac-1) expressed on myeloid cells, such as macrophages, neutrophils and dendritic cells, and on natural killer cells [24]. The main receptor-interacting domain of CyaA is located within the glycine and aspartate-rich repeat region (Figure 1), and calcium binding and post-translational acylation of CyaA were both shown to be required for a tight and productive interaction of CyaA with cells expressing the CD11b/CD18 receptor [25]. Although acylation of lysine residue 983 (Lys<sup>983</sup>) of CyaA is both necessary and sufficient for toxin activity on CD11b<sup>-</sup> cells [26], covalent palmitoylation of either of the  $\epsilon$ -amino groups of the internal residues Lys<sup>860</sup> and Lys<sup>983</sup> enables CyaA to tightly engage the CD11b/CD18 receptor and exert toxin activity on CD11b<sup>+</sup> cells [27\*].

### Immunomodulatory effects of CyaA activity on dendritic cells

Aside from inhibiting the bactericidal activities of phagocytic cells by suppressing superoxide production, chemotaxis or phagocytosis [28–32], CyaA might play an important pathophysiological role in *Bordetella* infections by acting on dendritic cells and affecting secretion of cytokines, thereby modulating the polarity of induced T-lymphocyte responses (Figure 2). Bagley *et al.* [33\*] demonstrated that, *in vitro*, the cAMP-elevating activity of CyaA promoted increased expression of the MHC class II and co-stimulatory molecules, CD80, CD83 and CD86, in human monocyte-derived dendritic cells and also suppresses production of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-12 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . It does this through cAMP-regulated protein kinase A-dependent signaling pathways. Subsequent studies confirmed that cAMP-elevating activity of CyaA influences maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) and up-modulates lipopolysaccharide-induced production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and anti-inflammatory cytokine IL-10, while simultaneously inhibiting pro-inflammatory lipopolysaccharide-driven TNF- $\alpha$ , IL-12 and CCL3 chemokine production by BMDCs and

macrophages [34\*,35\*]. In a recent study with live *B. bronchiseptica* bacteria, Skinner *et al* [36\*\*] demonstrated that CyaA cooperates with effectors injected into the cells by the T1SS (see glossary), driving murine BMDCs into a semi-mature state. This results in upregulated production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and in decreased production of the pro-inflammatory cytokines IL-12 and TNF- $\alpha$ . Semi-mature dendritic cells, unable to secrete pro-inflammatory cytokines appear, indeed, to promote the expansion of regulatory T (Tr) cells [37]. Hence, manipulation of the maturation status of dendritic cells (see glossary) by the concerted action of CyaA and T1SS effectors might promote tolerogenic immune responses that would enable persistent colonization of the host respiratory tract by *B. bronchiseptica* [36\*\*]. Altogether, the current data suggest that CyaA has potential to alter host immune responses through cAMP-elevation in CD11b<sup>+</sup> dendritic cells, and that this toxin activity might be of particular importance during *Bordetella* infections of the respiratory epithelium, where intra-epithelial dendritic cells reside (Figure 2). Interaction of CyaA with dendritic cells, hence, deserves detailed examination.

### Potential effects of CyaA on epithelial cells

Many reports indicate that *Bordetella* not only adhere to but can also invade epithelial cells [38], however, the cell invasion appears to be followed by efficient killing of the bacteria [38,39\*], and so the biological significance of epithelial cell invasion by *Bordetella* spp remains unclear. *B. pertussis* mutants deficient in CyaA were previously found to be more invasive into human tracheal epithelial cells than the wildtype, and so it was hypothesized that expression of CyaA could be an anti-invasive mechanism (Figure 2), enabling *B. pertussis* to avoid destruction within tracheal epithelial cells [38]. More importantly, CyaA action appears to account for induction of pro-inflammatory cytokine IL-6 production in human tracheal epithelial cells (Figure 2) in response to colonization by *Bordetella* [40\*\*]. The biological consequences of epithelial cell stimulation by CyaA (i.e. of indirect modulation of immune cells through cytokine production by epithelial cells) have yet to be investigated.

### Conclusions

In the past five years, significant progress has been made in understanding the interaction of CyaA with target cells.

**Figure 2 Legend (continued)** hemagglutinin (FHA), fimbriae and pertactin. Toxins: pertussis toxin (PT), adenylate cyclase toxin (CyaA), dermonecrotic toxin (DNT) and tracheal cytotoxin (TCT). **(c)** Enlarged section schematically depicts the reported effects of CyaA action on macrophages, neutrophils and dendritic cells. Upon CyaA secretion by the Type I secretion system, an atmosphere of toxin molecules forms around bacteria. Most of the produced toxin molecules remain attached on bacterial surface (pink border), as a result of the interaction with filamentous hemagglutinin (blue hairpin), while some toxin molecules are released into the bacterial surroundings and are capable of binding host cells. CyaA binds myeloid phagocytes through their  $\alpha_M\beta_2$  integrin (CD11b/CD18) receptor molecule, and, upon insertion into membrane, the toxin can translocate its AC domain into the cytosol and catalyze formation of cAMP and/or form cation-selective pores in the cell membrane and perturb cellular ion homeostasis. These activities can individually, or in synergy, influence the various cellular signal transduction cascades, modulate or paralyze cellular bactericidal and antigen-presenting functions, or induce apoptotic cell death and lysis. **(d)** Enlarged section of CyaA interaction with ciliated epithelial cells. CyaA action accounts for induction of production of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by tracheal epithelial cells upon interaction with *B. pertussis* and for inhibition of bacterial uptake into epithelial cells.

The most important new insights are; description of a specific protein receptor (CD11b/CD18) for CyaA on myeloid phagocytic cells, determination of the AC domain structure in complex with calmodulin, and the finding that only newly synthesized and secreted toxin and not the bacterial-cell-associated CyaA, is effective in elevating intracellular cAMP concentrations in CD11b<sup>+</sup> target cells. An important new focus of research on CyaA is the significant potential of the toxin to exert immunomodulatory activity through action on CD11b<sup>+</sup> dendritic cells, and by inducing secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 from tracheal epithelial cells. Discovery of the physiological consequences of this modulatory action of CyaA on immune and epithelial cells holds the promise of yielding novel insights into the cross-talk of *Bordetella* with host tissues.

### Acknowledgements

The authors thank W-J Tang for sharing data before publication and for providing a model of AC domain structure. Expert advice of D Obitkova on structure of human tracheal epithelia is gratefully acknowledged. The research of the authors is supported by funds from the Research Concept AVOZ50200510, grants No. IAA5020406 and 1M6837805001 and a Howard Hughes Medical Institute International Research Scholarship award NO. 55000334 to PS.

### References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
  - of outstanding interest
1. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J: **Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives.** *Pediatr Infect Dis J* 2005, **24**:S25-S34.
  2. Rothstein E, Edwards K: **Health burden of pertussis in adolescents and adults.** *Pediatr Infect Dis J* 2005, **24**:S44-S47.
  3. Parkhill J, Sebaihia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MT, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL *et al.*: **Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*.** *Nat Genet* 2003, **35**:32-40.
  4. Preston A, Parkhill J, Maskell DJ: **The *Bordetellae*: lessons from genomics.** *Nat Rev Microbiol* 2004, **2**:379-390.  
This review highlights new findings resulting from comparative analysis of three sequenced genomes of *Bordetella* species, pathogenic to man and mammals, with respect to key aspects of *Bordetella* biology.
  5. Cotter P, Miller J: ***Bordetella*.** In *Principals of Bacterial Pathogenesis*. Edited by Groisman E. Academic Press; 2001: 619-674.
  6. Loch C, Antoine R, Jacob-Dubuisson F: ***Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects.** *Curr Opin Microbiol* 2001, **4**:82-89.
  7. Mattoo S, Cherry JD: **Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies.** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**:326-382.
  8. Ladant D, Ullmann A: ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents.** *Trends Microbiol* 1999, **7**:172-176.
  9. Welch RA: **RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2001, **257**:85-111.
  10. Shen Y, Lee YS, Soelaiman S, Bergson P, Lu D, Chen A, Beckingham K, Grabarek Z, Mrksich M, Tang WJ: **Physiological calcium concentrations regulate calmodulin binding and catalysis of adenylate cyclase exotoxins.** *EMBO J* 2002, **21**:6721-6732.
  11. Guo Q, Shen Y, Lee YS, Gibbs CS, Mrksich M, Tang WJ: **Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin.** *EMBO J* 2005.  
The study provides key insights into the mechanism of toxin activation by calmodulin and provides a rational basis for understanding the tremendous catalytic potency of the toxin in converting ATP to cAMP.
  12. Guo Q, Shen Y, Zhukovskaya NL, Florian J, Tang WJ: **Structural and kinetic analyses of the interaction of anthrax adenylate cyclase toxin with reaction products cAMP and pyrophosphate.** *J Biol Chem* 2004, **279**:29427-29435.
  13. Schlecht G, Loucka J, Najjar H, Sebo P, Leclerc C: **Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and *in vivo* Th1-polarized T cell priming.** *J Immunol* 2004, **173**:6089-6097.  
This study unequivocally established that penetration of the AC domain into cytosolic compartment of CD11b-expressing professional antigen-presenting cells and delivery of inserted passenger-antigens into the cytosolic MHC class I presentation pathway occurs directly across the cytoplasmic membrane of cells, without the need for receptor-mediated endocytosis.
  14. Collier RJ, Young JA: **Anthrax toxin.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003, **19**:45-70.
  15. Koronakis V, Andersen C, Hughes C: **Channel-tunnels.** *Curr Opin Struct Biol* 2001, **11**:403-407.
  16. Hewlett EL, Urban MA, Manclark CR, Wolff J: **Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, **73**:1926-1930.
  17. Zaretsky FR, Gray MC, Hewlett EL: **Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction.** *Mol Microbiol* 2002, **45**:1589-1598.
  18. Gray MC, Donato GM, Jones FR, Kim T, Hewlett EL: **Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*.** *Mol Microbiol* 2004, **53**:1709-1719.  
This study shows that close association of live *B. pertussis* bacteria with host cells and ongoing active synthesis and secretion of the CyaA, is required for delivery of the toxin into target cells. The bacterial surface-associated toxin was found to be unable to penetrate host cells, showing that active toxin is a short-lived proximity 'weapon'.
  19. Carbonetti NH, Artamonova GV, Andreassen C, Bushar N: **Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin provide a one-two punch for establishment of *Bordetella pertussis* infection of the respiratory tract.** *Infect Immun* 2005, **73**:2698-2703.
  20. Rogel A, Meller R, Hanski E: **Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis.** *J Biol Chem* 1991, **266**:3154-3161.
  21. Edwards JA, Grothouse NA, Boitano S: ***Bordetella bronchiseptica* adherence to cilia is mediated by multiple adhesin factors and blocked by surfactant protein A.** *Infect Immun* 2005, **73**:3618-3626.  
The study shows that *B. bronchiseptica*, that are defective in production of CyaA, exhibit significantly reduced binding to ciliated epithelial cells, thereby providing the first evidence for a direct contribution of the surface-associated CyaA to *Bordetella* adhesion to ciliated respiratory mucosa.
  22. Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, Guiso N: **Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection *in vivo*.** *Infect Immun* 1998, **66**:1718-1725.
  23. Harvill ET, Cotter PA, Yuk MH, Miller JF: **Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity.** *Infect Immun* 1999, **67**:1493-1500.
  24. Gueronprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi-Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, Leclerc C: **The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18).** *J Exp Med* 2001, **193**:1035-1044.



25. El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, Leclerc C: **Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain.** *J Biol Chem* 2003, **278**:38514-38521.
26. Basar T, Havlicek V, Bezouskova S, Hackett M, Sebo P: **Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC.** *J Biol Chem* 2001, **276**:348-354.
27. Masin J, Basler M, Knapp O, El-Azami-El-Idrissi M, Maier E,  
 • Konopasek I, Benz R, Leclerc C, Sebo P: **Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells.** *Biochemistry* 2005, **44**:12759-12766.
- In this study, it is shown that covalent fatty acylation of either of the  $\epsilon$ -amino groups of the internal residues Lys<sup>860</sup> and Lys<sup>983</sup> enables CyaA to tightly engage the CD11b/CD18 receptor and exert toxin activity on CD11b<sup>+</sup> cells.
28. Confer DL, Eaton JW: **Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase.** *Science* 1982, **217**:948-950.
29. Pearson RD, Symes P, Conboy M, Weiss AA, Hewlett EL: **Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin.** *J Immunol* 1987, **139**:2749-2754.
30. Friedman RL, Fiederlein RL, Glasser L, Galgiani JN: ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions.** *Infect Immun* 1987, **55**:135-140.
31. Weingart CL, Weiss AA: ***Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils.** *Infect Immun* 2000, **68**:1735-1739.
32. Weingart CL, Mobberley-Schuman PS, Hewlett EL, Gray MC, Weiss AA: **Neutralizing antibodies to adenylate cyclase toxin promote phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils.** *Infect Immun* 2000, **68**:7152-7155.
33. Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Fouts TR, Lewis GK: ***Pertussis* toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway.** *J Leukoc Biol* 2002, **72**:962-969.
34. Ross PJ, Lavelle EC, Mills KH, Boyd AP: **Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* synergizes with lipopolysaccharide to promote innate interleukin-10 production and enhances the induction of Th2 and regulatory T cells.** *Infect Immun* 2004, **72**:1568-1579.
- See anotation to [35\*].
35. Boyd AP, Ross PJ, Conroy H, Mahon N, Lavelle EC, Mills KH:  
 • ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death.** *J Immunol* 2005, **175**:730-738.
- These studies [34\*,35\*] confirmed that the cAMP-elevating activity of the toxin prevents complete maturation of BMDCs and up-modulates lipopolysaccharide-induced production of IL-6 and IL-10, while inhibiting lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$ , IL-12 and CCL3 production by BMDCs and macrophages.
36. Skinner JA, Reissinger A, Shen H, Yuk MH: ***Bordetella* type III secretion and adenylate cyclase toxin synergize to drive dendritic cells into a semimature state.** *J Immunol* 2004, **173**:1934-1940.
- In this study it is shown that *B. bronchiseptica* CyaA and TTSS effectors jointly drive dendritic cells into a semi-mature phenotype that may promote tolerogenic immune responses and enable persistent colonization of the host respiratory tract by *B. bronchiseptica*.
37. Lutz MB, Schuler G: **Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?** *Trends Immunol* 2002, **23**:445-449.
38. Bassinet L, Gueirard P, Maitre B, Housset B, Gounon P, Guiso N: **Role of adhesins and toxins in invasion of human tracheal epithelial cells by *Bordetella pertussis*.** *Infect Immun* 2000, **68**:1934-1941.
39. Gueirard P, Bassinet L, Bonne I, Prevost MC, Guiso N:  
 • **Ultrastructural analysis of the interactions between *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* and human tracheal epithelial cells.** *Microb Pathog* 2005, **38**:41-46.
- Using transmission electron microscopy and invasion and persistence assays, the authors demonstrate that *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* are rapidly degraded upon uptake by human tracheal epithelial cells.
40. Bassinet L, Fitting C, Housset B, Cavaillon JM, Guiso N:  
 • ***Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin induces interleukin-6 secretion by human tracheal epithelial cells.** *Infect Immun* 2004, **72**:5530-5533.
- This study revealed that CyaA accounts for the capacity of *B. pertussis* to induce production of high levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by human epithelial cells.

## 9.2. Publikace 2

**Vojtová, J.**, Kofroňová, O., Šebo, P. and Benada, O. (2006) Bordetella adenylate cyclase toxin induces a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes and localizes into clusters in erythrocyte membranes. *Microsc Res Tech*, **69**, 119-129.

(FEI Company<sup>TM</sup>, Hillsboro, USA, previously Philips EO, Eindhoven, The Netherlands). Images were recorded either onto Kodak 4489 film or digitally recorded using slow scan camera Mega View II (Soft Imaging System, GmbH, Germany).

For scanning electron microscopy, the toxin-treated erythrocytes were fixed with 3% glutaraldehyde, washed with a cacodylate buffer, and allowed to sediment for 48 h at 4 C onto SPI-pore filter (0.2  $\mu$ m) treated with poly-L-lysine (Sanders et al., 1975). The samples were dehydrated in alcohol series followed by absolute acetone, and dried in a critical-point device (Balzers 010). Finally, the samples were sputter-coated with gold in a Polaron sputter-coater (Series 11HD) and examined in a Philips CM12/STEM electron microscope (FEI Company<sup>TM</sup>, Hillsboro, USA) at 80 kV.

### Immunolabeling with IgG-Gold

Sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/mL) were treated with CyaA-232/FLAG (80  $\mu$ g/mL, 30 min, 37 C) in 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 1% BSA containing either 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mM EDTA (negative control), and supplemented with 75 mM sucrose to avoid erythrocyte lysis (Ehrmann et al., 1991). Then the erythrocytes were washed with 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 75 mM sucrose, and 5 mM EDTA, and stripped with 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 11.5) and 150 mM NaCl to remove loosely bound toxin molecules that were not integrated into the membrane (Fujiki et al., 1982; Rogel and Hanski, 1992). The membrane inserted CyaA-232/FLAG molecules were immunolabeled with specific mouse anti-FLAG antibody (1:100, 60 min, 4 C) and then decorated by IgG coupled to 5 nm gold particles (1:20, 60 min, 4 C) in 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 75 mM sucrose, and 1% BSA. The control erythrocytes incubated with CyaA-232/FLAG in the presence of EDTA were treated in the same way. After immunolabeling, the erythrocytes were hypotonically lysed in 10 mM HEPES (pH 7.4). The erythrocyte ghosts were deposited onto glow-discharge activated grids coated with formvar-carbon film and unstained samples were examined in a Philips CM 100 electron microscope. When samples were stained with 2% uranyl acetate to check the quality of erythrocyte ghosts, we first performed postfixation of erythrocyte ghosts with 0.1% glutaraldehyde to prevent dissociation of IgG-gold particles upon negative staining.

### Immunofluorescence Microscopy and Confocal Microscopy

Sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/mL) were treated with CyaA-232/FLAG (25  $\mu$ g/mL, 30 min) at 4 C or 37 C and washed with 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH 11.5) as described earlier. An aliquot of toxin-treated erythrocytes was fixed with 0.1% glutaraldehyde (10 min, 4 C) and then incubated with  $\text{NaBH}_4$  (0.5 mg/mL, 10 min, 4 C) to reduce free glutaraldehyde groups (Weber et al., 1978), prior to immunolabeling with specific mouse anti-FLAG antibody (1:100, 60 min, 4 C) and subsequent decoration by IgG-FITC. Another aliquot of the sample was not fixed by glutaraldehyde and was subjected to immunolabeling of CyaA in parallel as described earlier. The fixed erythrocytes were mounted in moviol + DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane) and samples

were examined in an Olympus fluorescence microscope BX60 equipped with an F-View CCD camera (Soft Imaging System).

For confocal microscopy, sheep erythrocytes were incubated with CyaA-232/FLAG (65  $\mu$ g/mL, 37 C) for 10, 20, and 30 min in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mM EDTA as described earlier. The bound CyaA molecules were immunolabeled with anti-FLAG mouse M2 antibody (1:100, 4 C, 1 h) and antimouse IgG-Cy3 (1:100, 4 C, 1 h) and the erythrocytes were then fixed with 0.1% glutaraldehyde as described earlier. Samples were examined in a Leica TCS NT confocal microscope using a helium-neon laser at 543 nm, an oil-immersion lens (PL APO, 100 $\times$ , NA 1.4), and a pinhole size of 0.7 Airy. Ten randomly selected erythrocytes from each sample were optically sectioned and the number of spots per erythrocyte and the diameter of spots were analyzed in AnalySIS 3.1 software (Soft Imaging System).

### Depletion of Cholesterol From Erythrocyte Membranes

Sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/mL) were incubated with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (1, 2, or 4 mM) in 10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 75 mM sucrose at 37 C on a rocking plate for 30 min. After treatment, the erythrocytes were washed, incubated with CyaA-232/FLAG (65  $\mu$ g/mL, 30 min, 37 C), and the amount of bound CyaA was determined by the assay for the adenylate cyclase enzyme activity.

### Binding of CyaA to Liposomes

Liposomes from pure lipids (2 mg/mL) were prepared by sonication (Stolz et al., 1994) of multilamellar hand-shaken liposome vesicles in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 150 mM NaCl. The liposomes were incubated with CyaA (1  $\mu$ g/mL) in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  or 5 mM EDTA for 30 min at room temperature. Upon incubation, 3 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 5 mM EDTA was added to 1 mL of the CyaA-treated liposomes and the liposomes were collected by centrifugation for 40 min at 16,000 $\times$ g at 4 C. The same washing steps were then repeated two times using 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11.5 (Fujiki et al., 1982). Potential sedimentation and carry-over of aggregated CyaA was controlled by omitting the liposomes and it was found to be nil. The amount of membrane associated CyaA was determined by the assay for adenylate cyclase enzyme activity as described previously (Ladant, 1988; Masin et al., 2004).

## RESULTS

### Adenylate Cyclase Toxin Induces Morphological Changes of Sheep Erythrocytes

We have investigated the effect of the CyaA on the morphology of sheep erythrocytes during the early phases preceding cell lysis. Scanning electron microscopy (SEM) revealed an induction of morphological changes of toxin-treated erythrocytes, such as formation of membrane projections and erythrocyte swelling (Fig. 1). The occurrence of the morphological changes of erythrocytes was dependent on the number of repeated incubation steps with toxin and did not occur in the negative control experiment, where the erythrocytes were treated with CyaA in the presence of EDTA

# Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Induces a Cascade of Morphological Changes of Sheep Erythrocytes and Localizes Into Clusters in Erythrocyte Membranes

JANA VOJTOVÁ, OLGA KOFROŇOVÁ, PETER ŠEBO, AND OLDŘICH BENADA\*

*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 142 20, Prague 4, Czech Republic*

**KEY WORDS** CyaA; scanning electron microscopy; transmission electron microscopy; immunolabeling; membrane projection; membrane protrusions

**ABSTRACT** Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis* penetrates the membrane of eukaryotic cells, producing high levels of intracellular cAMP, as well as hemolysis that results from the formation of cation-selective toxin channels in the membrane. Using several microscopical approaches we studied the effects of CyaA action on the morphology of sheep erythrocytes during early phases preceding lysis and examined localization of CyaA molecules within the erythrocyte membrane. CyaA induced a cascade of morphological changes of erythrocytes, such as shrinkage, formation of membrane projections, and blebs and swelling. The use of an enzymatically inactive CyaA-AC toxoid that is unable to produce cAMP and of a CyaA-E581K mutant exhibiting higher hemolytic activity than with CyaA showed that the hemolytic activity is responsible for the induction of morphological changes of erythrocytes. Further, immunolabeling of inserted CyaA-232/FLAG molecules with specific anti-FLAG antibodies and IgG-gold particles indicated a clustered distribution of CyaA molecules in erythrocyte membrane. This was confirmed by immunofluorescence and confocal microscopy, which revealed uniform stoichiometry of CyaA clusters, suggesting CyaA binding into specific domains in erythrocyte membrane. Indeed, a decrease of CyaA binding after cholesterol depletion of erythrocytes suggests toxin targeting and binding to membrane microdomains (rafts). *Microsc. Res. Tech.* 69:119–129, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

The adenylate cyclase toxin (CyaA, referred to also as ACT, AC-toxin, or AC-Hly) is produced by *Bordetella pertussis*, the etiological agent of whooping cough. CyaA plays an important role in the early stages of bacterial infection, since it paralyzes the host immune defense by inhibiting bactericidal functions of phagocytes and allows *Bordetella* to colonize the respiratory tract epithelium (Confer and Eaton, 1982; Goodwin and Weiss, 1990; Harvill et al., 1999; Khelef et al., 1992).

CyaA is a 1706 residue-long bifunctional protein exhibiting a cell-invasive enzymatic adenylate cyclase activity and a hemolytic activity (Bellalou et al., 1990; Confer and Eaton, 1982; Glaser et al., 1988). It is synthesized as an inactive precursor, which is converted to the active toxin by palmitoylation of the Lys<sup>983</sup> (Hackett et al., 1994) and Lys<sup>860</sup> residues (Havlicek et al., 2001). CyaA consists of an amino-terminal adenylate cyclase (AC) domain, comprising about 400 N-terminal residues, and of a hemolysin moiety of about 1306 residues (Glaser et al., 1988). The toxin can translocate its AC domain into the cytosol of target cell (a cell-invasive activity) by a poorly understood mechanism that requires the intact hemolysin moiety. In the cytosol the AC domain binds calmodulin and catalyzes the conversion of ATP to cAMP, thereby subverting cellular signaling (Confer and Eaton, 1982; Guiso et al., 1991). The hemolysin moiety displays structural characteristics that link CyaA to the family of bacterial pore-forming toxins known as the RTX (Repeat in ToXin) family,

the prototype of which is HlyA, the *Escherichia coli*  $\alpha$ -hemolysin (Welch, 1991). Upon insertion of CyaA into the target membrane, the hemolysin moiety can form small cation-selective channels of 0.6–0.8 nm in diameter (Benz et al., 1994; Szabo et al., 1994), which can cause colloid-osmotic lysis of erythrocytes (Bellalou et al., 1990; Glaser et al., 1988). This results from the formation of pores that allow free movement of solutes across cell membrane and influx of water, inducing cell swelling and lysis (Chou and Fitch, 1981; Harris et al., 1991). Both the translocation of the AC domain into the cytosol (cell-invasive activity) and formation of hemolytic channels (hemolytic or channel-forming activity) absolutely require binding of calcium ions into the RTX-hemolysin moiety and the subsequent conformational changes that promote the penetration of CyaA into cells (Hewlett et al., 1991; Rose et al., 1995).

The toxin binds to target cells primarily via the CD11b/CD18 ( $\alpha_M\beta_2$ ) integrin receptor (Guermontprez et al., 2001), which is expressed by myeloid phagocytic

\*Correspondence to: Oldřich Benada, Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic. E-mail: benada@biomed.cas.cz

Received 1 September 2005; accepted in revised form 5 December 2005

Contract grant sponsor: EU; Contract grant numbers: LSMB-CT-2003-503582, AVZ50200510; Contract grant sponsor: Academy of Sciences; Contract grant number: A5020406 of the Academy of Sciences; Contract grant sponsor: Howard Hughes Medical Institute; Contract grant number: 55000334.

DOI 10.1002/jemt.20277

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

cells. However, CyaA can also bind to and penetrate, to a lower extent, a variety of other cell types lacking the protein receptor or endocytic mechanisms, such as mammalian erythrocytes (Bellalou et al., 1990; Gordon et al., 1989; Hanski, 1989). This shows that the toxin is capable of a direct translocation of the AC domain across the cytoplasmic membrane. While translocation of the AC domain (cell-invasive activity) appears to be a monomolecular process, formation of the CyaA channels likely involves oligomerization of several CyaA monomers (Bejerano et al., 1999; Betsou et al., 1993; Gray et al., 1998; Iwaki et al., 1995; Osickova et al., 1999; Szabo et al., 1994). This and also other results suggest that translocation of the AC domain across the membrane and formation of the CyaA channels are two independent and separable membrane activities resulting from the membrane insertion of CyaA (Betsou et al., 1993; Gray et al., 1998; Osickova et al., 1999; Rogel and Hanski, 1992; Rogel et al., 1989, 1991; Rose et al., 1995; Schlecht et al., 2004; Szabo et al., 1994). Membrane insertion, translocation of the AC domain into cytosol, and formation of cation-selective channels in the membrane remain, however, poorly understood.

Here we used several microscopical approaches to investigate the effect of CyaA activity on the morphology of sheep erythrocytes and to examine the localization of CyaA molecules in erythrocyte membrane. Our results show that the hemolytic activity, not the adenylate cyclase activity, of CyaA accounts for the induction of morphological changes of erythrocytes and that CyaA molecules are localized in clusters in erythrocyte membranes.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Antibodies

NaBH<sub>4</sub>, methyl- $\beta$ -cyclodextrin, mouse monoclonal M2 anti-FLAG antibody, antimouse IgG-FITC, antimouse IgG-Cy3 and antimouse IgG-gold 5 nm particles, PC (egg phosphatidylcholine), cholesterol, and sphingomyelin (from egg yolk) were purchased from Sigma. F(ab)<sub>2</sub>-FITC was purchased from KPL Laboratories and glutaraldehyde (electron microscopy grade) was purchased from Merck.

### Production and Purification of the CyaA-Derived Proteins

The wild-type CyaA, CyaA-AC<sup>-</sup>, CyaA-E581K, and CyaA-232/FLAG were produced in the presence of the activating protein CyaC, using the *E. coli* strain XL1-Blue (Stratagene) transformed with the appropriate plasmid, derived from pCACT3 (wt CyaA and CyaA-E581K) or pT7CACT1 (CyaA-232/FLAG and CyaA-AC<sup>-</sup>), respectively (Basler et al., submitted; El-Azami-El-Idrissi et al., 2003; Osicka et al., 2000). Exponential 500-mL cultures were induced with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (1 mM), cells were disrupted by ultrasound, and the insoluble cell debris was extracted with 8 M urea, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), and 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, as described previously (Sebo et al., 1991). The proteins were purified by ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose and by hydrophobic chromatography on Phenyl Sepharose as previously described (Karimova et al., 1998). In the final step, the proteins were eluted with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 M urea, and 2 mM EDTA and stored at -20 °C.

### Preparation of Sheep Erythrocytes

Fresh sheep blood (BioTest, Konarovice, Czech Republic) was drawn into flasks containing Alsever's anticoagulant solution (1 part blood to 1 part Alsever's solution) and stored at 4 °C. The blood was centrifuged to remove serum and buffy coat and the erythrocytes were washed five times with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 150 mM NaCl, and resuspended at  $5 \times 10^8$  erythrocytes/mL.

### Assay of Adenylate Cyclase (AC), Binding, Cell-invasive and Hemolytic Activities

Adenylate cyclase activity was determined in the presence of 1  $\mu$ M calmodulin as described previously (Ladant, 1988). One unit (U) of AC activity corresponds to the formation of 1  $\mu$ mol of cAMP formed per minute at 30 °C at pH 8.0. Binding activity was determined after incubation of washed sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/mL) with 1 U/mL of purified toxin for 30 min at 37 °C in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Under these conditions no hemolysis of sheep erythrocytes was observed. The cell-associated AC activity was determined as described previously (Masin et al., 2004). The number of bound CyaA molecules per erythrocyte (*N*) was calculated according to the formula:  $N = ((AC_{\text{bound}}/AC_{\text{specific}}) \times N_A)/(M \times N_{\text{ery}})$ , where AC<sub>bound</sub> corresponds to cell-associated AC activity (U/mL), AC<sub>specific</sub> to specific AC activity of used CyaA (U/g), N<sub>A</sub> to Avogadro's constant ( $6.022 \times 10^{23}$  mol<sup>-1</sup>), M to molar mass of acylated CyaA (178 017 g.mol<sup>-1</sup>) and N<sub>ery</sub> to number of erythrocytes per mL ( $5 \times 10^8$  cells/mL). The cell-invasive enzymatic AC activity was determined as the capacity to raise intracellular cAMP level in sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$ /mL) upon incubation with 1 U/mL of purified CyaA at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by addition of 0.2% Tween-20 in 100  $\mu$ M HCl and the samples were boiled for 15 min at 100 °C (cAMP is heat and acid resistant). The samples were neutralized by the addition of 150  $\mu$ L of unbuffered imidazole and cAMP concentration was determined by an antibody competition immunoassay as described previously (Karimova et al., 1998). The hemolytic activity was measured by photometric (A<sub>541</sub>) determination of the amount of hemoglobin released upon incubation of washed sheep erythrocytes with the toxin (5  $\mu$ g/mL) in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, and 2 mM Ca<sup>2+</sup> at 37 °C as described by Iwaki et al., 1995.

### Transmission and Scanning Electron Microscopy

Sheep erythrocytes ( $5 \times 10^8$  cells/mL) were incubated with CyaA (25  $\mu$ g/mL, 30 min, 37 °C) in 10 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, and 1% BSA in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup> or 5 mM EDTA. Then the erythrocytes were washed and incubated with a fresh input of the toxin (25  $\mu$ g/mL, 30 min, 37 °C) to raise the amount of bound CyaA. This step was repeated two times, since sheep erythrocytes do not have the CD11b/CD18 receptor for CyaA and CyaA loses its activity in solution. The erythrocytes were then hypotonically lysed with 10 mM HEPES (pH 7.4) and erythrocyte ghosts were deposited onto glow-discharge activated grids coated with formvar-carbon film (Benada and Pokorny, 1990). Samples were negatively stained with 2% uranyl acetate and examined using a Philips CM 100 electron microscope.

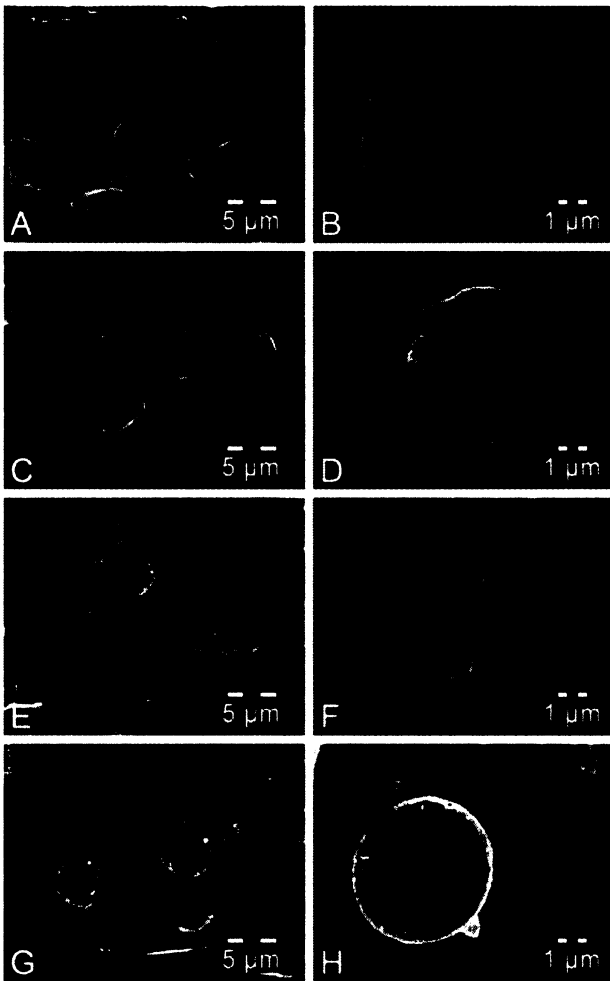


Fig. 1. Scanning electron microscopy of CyaA-induced erythrocyte swelling and formation of membrane projections. **A, B:** Morphology of control erythrocytes treated with CyaA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of 5 mM EDTA. **C, D:** Erythrocytes after incubation with CyaA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . **E, F:** Erythrocytes after a second incubation with CyaA (60 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ). **G, H:** Erythrocytes after a third incubation with CyaA (90 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ). The experiment was repeated three times with the same result.

(Figs. 1A and 1B), to chelate  $\text{Ca}^{2+}$  ions required for toxin binding. After the first incubation with CyaA, the sheep erythrocytes exhibited “echinocyte”-like shape because of shrinkage of erythrocytes and formation of membrane projections (Figs. 1C and 1D). After the second incubation with freshly added CyaA, the toxin induced erythrocyte swelling (Figs. 1E and 1F) and upon third incubation with CyaA, the majority of erythrocytes lysed and the erythrocyte ghosts were globular with membrane projections and vesicles protruding out of the membrane (Figs. 1G and 1H). Interestingly, also small blebs were observed at the ends of some membrane projections (Fig. 2), which were formed during the first and primarily during the second incubation with CyaA.

Transformation of erythrocytes to echinocytes has been reported to be associated with ATP depletion (Backman, 1986; Palek et al., 1978). Besides the chan-

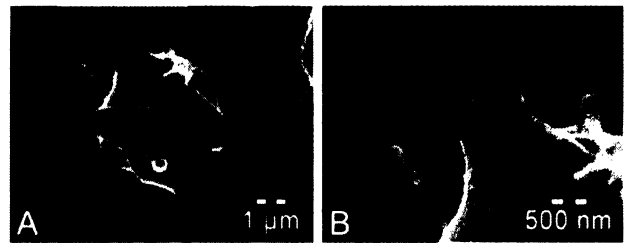


Fig. 2. CyaA-induced formation of blebs at the ends of membrane projections. **A:** Scanning electron micrograph of a sheep erythrocyte after second incubation with CyaA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . **B:** Magnified view of the rectangular region in A.

nel-forming activity, CyaA also has an adenylate cyclase enzymatic activity that was shown to induce ATP depletion (Bachelet et al., 2002). To test whether the adenylate cyclase activity of CyaA had any impact on morphological changes of erythrocytes we used an enzymatically inactive CyaA-AC toxoid that fully retained the capacity to lyse erythrocytes (Table 1). In addition, a CyaA-E581K mutant was used that exhibits a several-fold higher specific hemolytic activity than wt CyaA, while having a specifically reduced capacity to deliver the AC domain into cell cytosol and to elevate intracellular cAMP (Basler et al. submitted). As shown in Figure 3, in contrast to untreated sheep erythrocytes that preserved a biconcave shape (Fig. 3A), the sheep erythrocytes treated with the CyaA-AC toxoid (Fig. 3B) exhibited morphological changes that were similar to those induced by wild type CyaA (Fig. 3C). On the other hand, sheep erythrocytes treated with the superhemolytic CyaA-E581K mutant (Fig. 3D) exhibited an enhanced formation of membrane projections and swelling, compared with erythrocytes treated with wild type CyaA (Fig. 3C). Altogether, these results demonstrate that the hemolytic (channel-forming) activity of CyaA (and not the enzymatic activity) accounts for the morphological changes of toxin-treated sheep erythrocytes.

#### CyaA Molecules are Nonrandomly Distributed in Erythrocyte Membranes

The SEM observations showed that CyaA induced the formation of membrane projections in sheep erythrocyte membranes because of its channel-forming activity. Since pore-forming toxins were shown to induce direct damage of membrane by formation of clusters of pores (Nguyen et al., 2003; Yamaji-Hasegawa et al., 2003), we next examined the morphology of CyaA-induced erythrocyte ghosts and distribution of CyaA molecule in the membrane by negative staining transmission electron microscopy (TEM). As shown in Figures 4A and 4B, control erythrocytes that were treated with CyaA in the presence of EDTA exhibited a smooth shape. However, in the membranes of sheep erythrocytes treated with CyaA in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  (containing inserted toxin) we observed compact globular structures termed here “membrane protrusions” (Figs. 4C and 4D, indicated by arrows) according to denomination used for very similar structures observed in erythrocytes treated with another pore-forming toxin, lysenin (Yamaji-Hasegawa et al., 2003). In addition to the membrane protrusions, membrane projections

TABLE 1. Specific activities of the toxins on sheep erythrocytes

Protein	Specific AC activity <sup>b</sup> (U/mg)	% Activity of wild-type CyaA <sup>a</sup>		
		Binding activity <sup>c</sup>	Cell-invasive activity <sup>d</sup>	Hemolytic activity <sup>e</sup>
CyaA	357	100 ± 10	100 ± 15	100 ± 8
CyaA-AC <sup>f</sup>	0.01	nd	nd	100 ± 11
CyaA-E581K <sup>g</sup>	334	72 ± 5	15 ± 5	320 ± 11

<sup>a</sup>The activities expressed as percentages of wild-type CyaA activity and represent average values ± standard deviations ( $n = 6$ ) from at least three independent determinations performed in duplicate.

<sup>b</sup>Specific AC (adenylate cyclase) activity was measured by the assay of adenylate cyclase enzyme activity. One unit (U) of AC activity corresponds to the formation of 1 μmol of cAMP formed per min at 30 °C and at pH 8.0.

<sup>c</sup>Sheep erythrocytes ( $5 \times 10^7$  mL) were incubated at 37 °C with 1 U/mL of purified CyaA proteins and, after 30 min, aliquots were taken for determination of the cell-associated AC activity by the assay for adenylate cyclase activity. nd, not detectable due to ablated enzymatic adenylate cyclase activity.

<sup>d</sup>Invasive activity was determined as the capacity of CyaA to penetrate cells and raise the intracellular cAMP levels in sheep erythrocytes upon incubation with 1 U/mL of intact CyaA or its derivatives for 30 min at 37 °C.

<sup>e</sup>The hemolytic activity was measured photometrically at 541 nm, as the amount of hemoglobin released after 270 min of incubation of the toxin (5 μg/mL) with sheep erythrocytes (Iwaki et al., 1995).

<sup>f</sup>CyaA-AC<sup>-</sup>, CyaA toxoid in which the enzymatic activity was ablated by a Cys/Thr dipeptide insertion between residues Asp<sup>185</sup> and Ile<sup>196</sup> of the ATP binding site within the AC catalytic domain (Osicka et al., 2000).

<sup>g</sup>The CyaA-E581K mutant was constructed and characterized by Basler et al. (submitted).

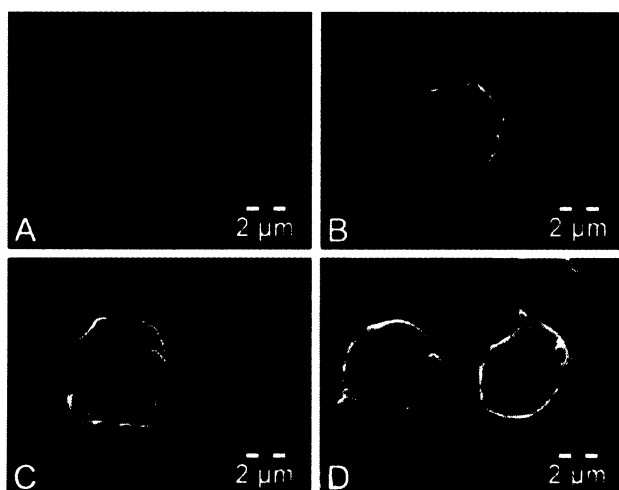


Fig. 3. Morphological changes of sheep erythrocytes are induced by hemolytic (channel-forming) activity of CyaA. **A:** An example of an untreated control erythrocyte. **B:** An example of a sheep erythrocyte after treatment with enzymatically inactive CyaA-AC<sup>-</sup> toxoid (25 μg/mL, 30 min, 37 °C). **C:** An example of a sheep erythrocyte after treatment with wt CyaA (25 μg/mL, 30 min, 37 °C). **D:** Morphology of sheep erythrocytes after treatment with the superhemolytic mutant protein CyaA-E581K (25 μg/mL, 30 min, 37 °C). Erythrocytes were incubated in the presence of 2 mM Ca<sup>2+</sup>. Scanning electron micrographs. The experiment was repeated twice with the same result.

protruding out of the edge of some ghosts were also observed (Fig. 4E, indicated by asterisks). While the membrane projections appear to correspond to the projections observed by SEM (Fig. 1), the globular membrane protrusions (Figs. 4C and 4D) likely represent different structures, since they have an apparently more compact structure than membrane projections. When the distribution of CyaA molecules was examined in the erythrocyte membranes, no CyaA molecules could be visualized by negative staining in high-magnification images (data not shown), therefore, immunodetection of CyaA was performed. Sheep erythrocytes were treated in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> with CyaA-232/FLAG possessing an inserted FLAG epitope



Fig. 4. TEM of CyaA-induced erythrocyte ghosts. **A:** Electron micrograph of a negatively stained ghost of control sheep erythrocyte repeatedly (3 ×) treated with CyaA (25 μg/mL, 30 min, 37 °C) in the presence of EDTA. **B:** Enlarged section of the erythrocyte membrane shown in A. **C:** An example of erythrocyte repeatedly (3 ×) treated with CyaA (25 μg/mL, 30 min, 37 °C) in the presence of Ca<sup>2+</sup>. **D:** Enlarged section of the erythrocyte membrane shown in C. Arrows indicate globular membrane protrusions. **E:** Example of the ghost membrane of an erythrocyte treated with CyaA in the presence of Ca<sup>2+</sup> as indicated earlier. Asterisks indicate membrane projections protruding at the edge of the ghost.

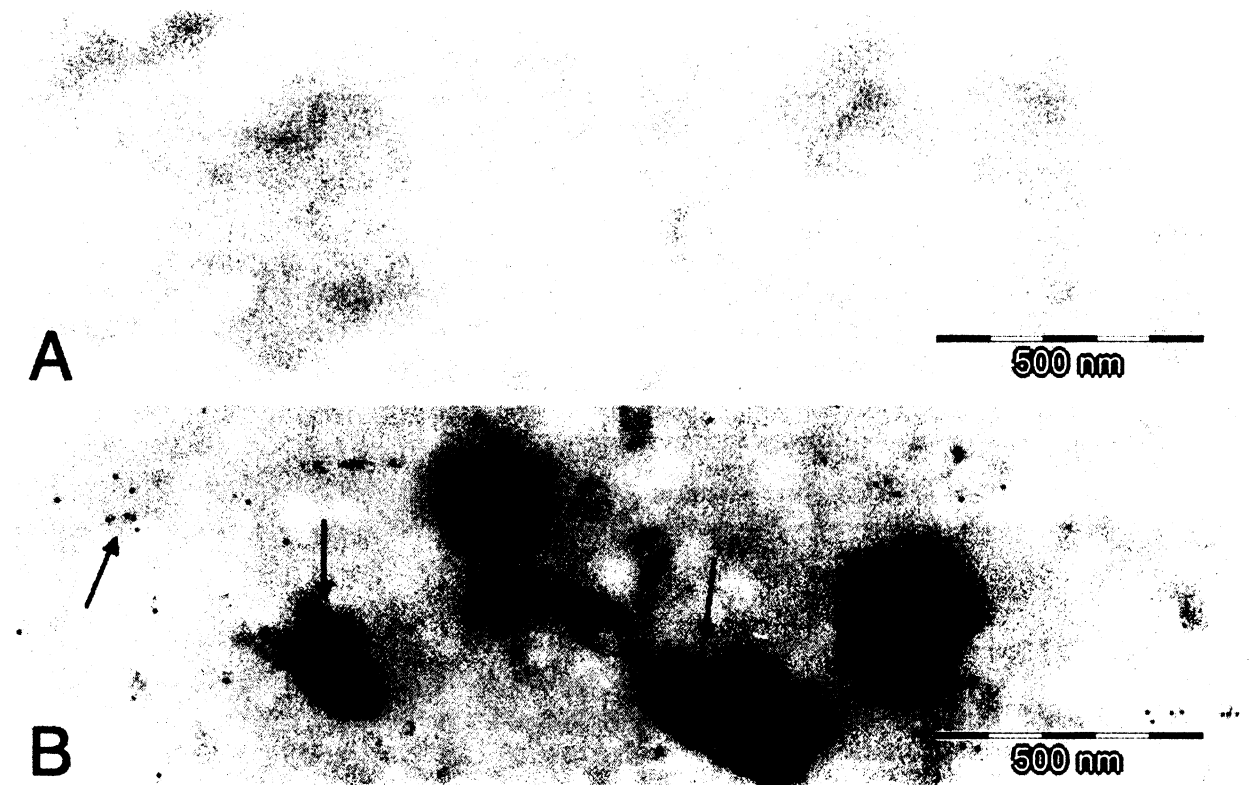


Fig. 5. CyaA molecules are distributed in clusters in the erythrocyte membrane **A**: Negative control of immunodetection. Sheep erythrocytes were treated with CyaA-232/FLAG (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of EDTA and immunolabeled with anti-FLAG antibody and IgG-5 nm gold particles. Unstained sample. **B**: Indirect

immunodetection of CyaA in erythrocyte membrane. Sheep erythrocytes were treated with CyaA-232/FLAG (80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and immunolabeled as described earlier. Arrows indicate clusters of gold particles. Unstained sample. The experiment was repeated twice with the same result.

in the adenylate cyclase domain (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003) and upon thorough washing-out of unbound toxin molecules, the membrane-inserted CyaA molecules were labeled with a specific mouse anti-FLAG antibody and antimouse IgG coupled to 5 nm gold particles. As shown in Figure 5, no gold particles were detected on control erythrocyte membranes (Fig. 5A), while in the membrane of erythrocytes treated with the toxin in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ , the gold particles, decorating the CyaA molecules, were distributed in clusters (Fig. 5B, indicated by arrows). Moreover, some clusters of gold particles were also found in membrane structures that appeared dark in unstained specimens (Fig. 5B) and likely represented damaged areas of erythrocyte membranes.

#### Clusters of CyaA Molecules in Erythrocyte Membranes Appear to Have a Uniform Stoichiometry

Clustered distribution of CyaA molecules in sheep erythrocyte membranes was further examined by indirect immunofluorescence microscopy. Sheep erythrocytes were treated with CyaA-232/FLAG and bound CyaA molecules were immunolabeled with specific mouse anti-FLAG antibodies that were subsequently decorated by antimouse IgG-FITC. As shown in Figure 6, in contrast to control erythrocytes that were treated with CyaA-232/FLAG in the presence of 5 mM EDTA

and exhibited no fluorescence (Fig. 6A), the erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  exhibited a "spotty" fluorescence pattern (Fig. 6B) indicating a clustered distribution of CyaA. However, it was shown previously that clustered distribution of membrane proteins observed by an indirect immunofluorescence microscopy may result from an antibody-induced patching (Santoso et al., 1986). Therefore, prior to labeling, erythrocytes were fixed with glutaraldehyde and then immunolabeling was applied in the same way as described earlier. Again, no fluorescence was observed on control erythrocytes that were treated with CyaA-232/FLAG in the presence of 5 mM EDTA (Fig. 6C), while the spotty fluorescence pattern was observed also on erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG in the presence of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and fixed prior to labeling (Fig. 6D). Moreover, the spotty distribution of CyaA in the membrane was also observed when the erythrocytes were treated with CyaA at 4  $^{\circ}\text{C}$  (data not shown). Altogether, these results demonstrate that CyaA molecules formed clusters in the erythrocyte membrane and that CyaA clustering was not induced by an antibody-induced patching.

Next, we studied the formation and size of CyaA spots in erythrocyte membrane over the time of incubation with toxin. Sheep erythrocytes were incubated with CyaA-232/FLAG at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 0, 10, 20, and 30 min in the presence EDTA or  $\text{Ca}^{2+}$  and the amount of bound



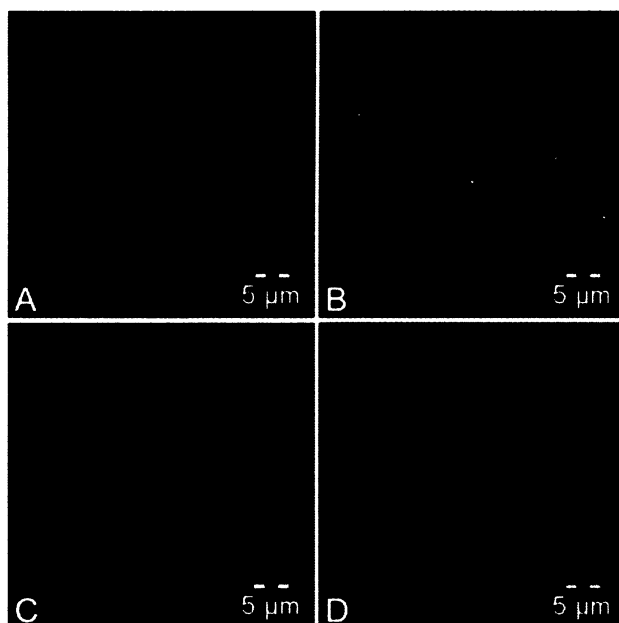


Fig. 6. CyaA exhibits "spotty" pattern in erythrocyte membrane as revealed by immunofluorescence microscopy. **A:** Sheep erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of EDTA. Immunolabeling of CyaA was performed on nonfixed cells. **B:** Sheep erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ . Immunolabeling of CyaA was performed on nonfixed cells. **C:** Sheep erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of EDTA and fixed with glutaraldehyde prior to immunolabeling of CyaA. **D:** Sheep erythrocytes treated with CyaA-232/FLAG (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and fixed with glutaraldehyde prior to immunolabeling of CyaA.

CyaA was determined by the assay of cell-associated adenylate cyclase enzyme activity. Bound CyaA molecules were immunolabeled as described in Material and Methods section and the erythrocytes were examined in a Leica confocal microscope. As shown in Figure 7A, CyaA molecules were detected in distinct spots spread over the erythrocyte membrane. The number of the spots increased with incubation time, as shown in individual panels of Figure 7A. Moreover, as documented in Figure 7B, the number of the CyaA spots per erythrocyte correlated well with the total amount of CyaA bound per erythrocyte. Using the known specific enzymatic activity of cell-associated CyaA molecules, the number of CyaA molecules bound per erythrocyte could be determined (see Material and Methods section). Thus, determining the average number of CyaA spots per erythrocyte allowed to estimate the average number of CyaA molecules per spot. Interestingly, this number appeared to be independent of time and corresponded on average to  $\sim 20$  CyaA molecules per spot. Indeed, also the average size of the Cy3-antibody-decorated CyaA spots appeared to be independent of the incubation time (Fig. 6C) and the spots were found to have an average diameter of  $\sim 270$  nm. However, it cannot be excluded that some time-dependent changes in size of the spots were not detected because of the limited resolution of confocal microscope, which is in the range of 200–300 nm (Diaspro et al., 2000,

2002). The apparently uniform stoichiometry of the CyaA spots could either be due to insertion of preformed large CyaA complexes into the membrane or it might have resulted from preferential binding, and insertion and clustering of CyaA within specific regions of the erythrocyte membrane.

#### Depletion of Cholesterol Decreases CyaA Binding

Binding and clustering of the CyaA molecules into specific regions in the erythrocyte membrane would facilitate oligomerization of CyaA, which seems to be required for channel formation (Iwaki et al., 1995; Osickova et al., 1999). To examine the binding of CyaA molecules into specific regions of erythrocyte membrane we studied the effect of cholesterol depletion on CyaA binding, since cholesterol is an important component of membrane rafts. Membrane rafts are membrane microdomains enriched with gangliosides/sphingomyelin and cholesterol (Simons and Ikonen, 1997) and depletion of cholesterol induces disruption of these microdomains (Moran and Miceli, 1998; Xavier et al., 1998). Therefore, sheep erythrocytes were treated with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (m $\beta$ CD), the agent sequestering membrane cholesterol, washed and then incubated with CyaA in the presence of EDTA or  $\text{Ca}^{2+}$ . As shown in Figure 8, irrespective of pretreatment with m $\beta$ CD, the control erythrocytes incubated with CyaA in the presence of EDTA bound very low amount of CyaA. The erythrocytes incubated with CyaA in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  bound CyaA and importantly the binding of the toxin decreased when the erythrocytes were pretreated with m $\beta$ CD, demonstrating that cholesterol depletion reduces toxin binding. Further, a decrease in the number of CyaA spots when compared with untreated erythrocytes was observed in cholesterol depleted erythrocyte membranes, as determined upon immunolabeling of CyaA (data not shown). Taken together, these results indicate that membrane rafts may be involved in CyaA binding to erythrocyte membranes.

It has been recently reported that sheep erythrocyte rafts are predominantly composed of sphingomyelin and cholesterol (Koumanov et al., 2005). Using artificially prepared liposomes composed either from pure sphingomyelin, or phosphatidylcholine, or mixes of the lipids with cholesterol, respectively, we examined the effect of sphingomyelin and cholesterol on CyaA binding to membranes. Liposomes prepared from phosphatidylcholine were used as negative control, since this lipid is not present in membrane rafts (Koumanov et al., 2005), while it has an identical polar group with sphingomyelin. The liposomes were incubated with CyaA in the presence of EDTA or  $\text{Ca}^{2+}$  and the amount of bound CyaA was determined by the assay of adenylate cyclase enzyme activity. As shown in Figure 9, very low CyaA binding was detected when the liposomes were incubated with CyaA in the presence of EDTA (negative control), while in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  the toxin bound with a higher efficiency to liposomes formed from sphingomyelin than to liposomes made of phosphatidylcholine. Moreover, binding of CyaA was even enhanced if the sphingomyelin was mixed with cholesterol (Fig. 9). These results demonstrate that sphingomyelin and cholesterol account for CyaA binding in the liposome model. Whether sphingomyelin is

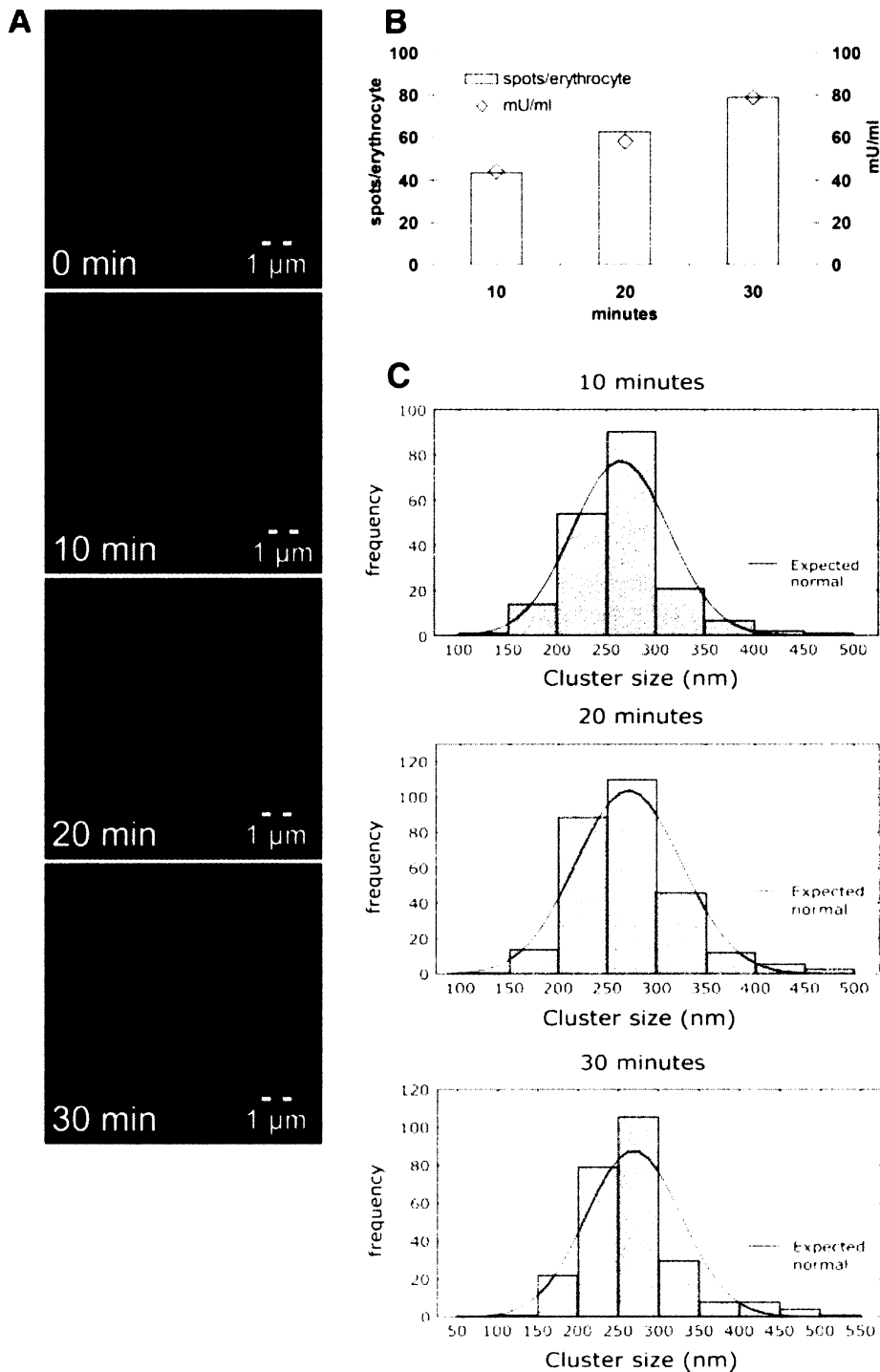


Fig. 7. The number of CyaA spots increases with time while their size is independent of time. **A:** An example of total projection of a sheep erythrocyte upon incubation with CyaA-232/FLAG (65 µg/mL, 37 °C) for 0, 10, 20 and 30 min in the presence of  $Ca^{2+}$ . Indirect immunofluorescence confocal microscopy. **B:** Number of CyaA spots and the amount of bound CyaA increased with time. The number of spots per erythrocyte was counted on confocal sections of ten randomly selected erythrocytes and the mean values are given. The amount of bound CyaA was determined by the assay for adenylate cyclase enzyme activity. **C:** Size distribution of CyaA spots. The sizes of spots were determined on total projections of ten randomly selected erythrocytes incubated for 10, 20, and 30 min with CyaA, respectively. The experiment was repeated twice with the same result.

also involved in CyaA binding in erythrocyte membranes remains, however, to be determined.

#### DISCUSSION

The adenylate cyclase toxin (CyaA) can form cation-selective channels in target membranes, which may induce colloid-osmotic lysis of sheep erythrocytes. Here,

we show that hemolytic (channel-forming) activity of CyaA is responsible for the induction of several morphological changes of sheep erythrocytes and that the CyaA molecules are localized in clusters in erythrocyte membranes, possibly in membrane microdomains.

CyaA induced a cascade of morphological changes of sheep erythrocytes including shrinkage, formation of

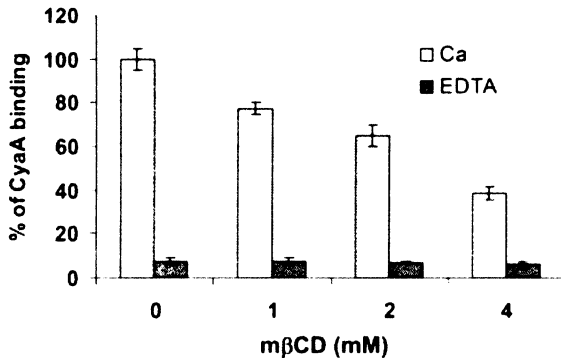


Fig. 8. The binding of CyaA is affected by depletion of cholesterol from erythrocyte membranes. Sheep erythrocytes pretreated with the indicated concentrations of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (m $\beta$ CD, x-axis) were washed and incubated with CyaA-232/FLAG (65  $\mu$ g/mL, 30 min, 37 °C) in the presence of Ca<sup>2+</sup> or EDTA. The amount of associated CyaA was determined by the assay for adenylate cyclase activity. The results expressed are means  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ) of two independent experiments, which were performed in duplicates.

membrane projections, swelling, and lysis. We also observed the formation of small blebs at the ends of some membrane projections, suggesting vesiculation of erythrocyte membrane. It has been previously shown that membrane vesiculation protects human erythrocytes from destruction by complement (Iida et al., 1991). In our case, however, formation of the blebs on CyaA-treated sheep erythrocytes did not prevent their lysis. We cannot, however, exclude the possibility that some CyaA molecules were eliminated from erythrocyte membranes in the form of vesicles.

Using enzymatically inactive CyaA-AC<sup>-</sup> toxoid and a CyaA-E581K variant with selectively enhanced specific hemolytic activity, we could exclude the effect of enzymatic adenylate cyclase activity (cAMP) on erythrocyte morphology. The morphological changes of the erythrocytes were due to the activity of cation-selective channels formed by CyaA, or due to some earlier step of toxin interaction with membrane, preceding the channel formation and lysis. It was previously shown that K<sup>+</sup> efflux can account for shrinkage of human erythrocytes and may lead to their vesiculation in the presence of increased intracellular concentrations of Ca<sup>2+</sup> (Allan and Thomas, 1981). In fact, it has been already demonstrated that insertion of CyaA monomers into the erythrocyte membrane caused efflux of intracellular K<sup>+</sup> (Gray et al., 1998, 2001). Moreover, the related hemolysis of *E. coli* (HlyA) that induced formation of small projections in sheep erythrocytes (Jorgensen et al., 1980), caused a rapid depletion of intracellular K<sup>+</sup> and calcium accumulation prior to erythrocyte lysis (Jorgensen et al., 1983). Therefore, it is likely that K<sup>+</sup> efflux also accounts for the initial CyaA-induced erythrocyte shrinkage. It remains to be investigated whether calcium influx contributes to the morphological changes observed on CyaA-treated erythrocytes, since calcium influx due to CyaA action has not yet been demonstrated in erythrocytes.

In agreement with previous observation by Gray et al. (1999), the results further revealed that CyaA molecules were localized in clusters in erythrocyte

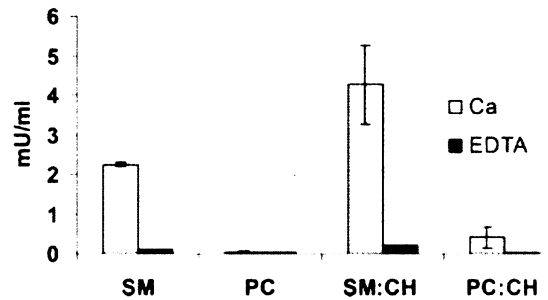


Fig. 9. Sphingomyelin and cholesterol affect binding of CyaA to liposomes. Liposomes were prepared from pure lipids (2 mg/mL) by sonication and incubated with CyaA (1  $\mu$ g/mL; 30 min; 25 °C) in the presence of Ca<sup>2+</sup> or EDTA. The amount of CyaA associated with liposomes was determined by the assay for adenylate cyclase activity. The results expressed are means  $\pm$  standard deviations ( $n = 4$ ) of two independent experiments, which were performed in duplicates. PC, phosphatidylcholine; PC:CH, phosphatidylcholine and cholesterol (1:1); SM, sphingomyelin; SM:CH, sphingomyelin and cholesterol (1:1).

membranes, yielding a "spotty" pattern of labeling, as observed by immunoelectron and immunofluorescence microscopy. Clusters of pores have previously been observed with other pore-forming toxins (Nguyen et al., 2003; Wallace et al., 2000; Yamaji-Hasegawa et al., 2003) and cell membranes were found to be prominently disrupted in areas surrounding these clusters (Nguyen et al., 2003; Yamaji-Hasegawa et al., 2003). Our results also indicate that clusters of CyaA may directly disrupt erythrocyte membrane, since CyaA clusters were detected also in damaged areas of the erythrocyte membrane. In fact, CyaA was previously shown to be able to induce a nonlamellar lipid structure upon insertion into lipid bilayers (Martin et al., 2004), which may also contribute to membrane damage.

A striking finding was that the clusters of CyaA molecules exhibited a fairly uniform stoichiometry, corresponding on average to  $\sim 20$  CyaA molecules per cluster (spot). It is unlikely that these clusters may correspond to CyaA aggregates attached to erythrocyte membranes. This possibility appears to be ruled out by several observed properties of CyaA: (i) CyaA aggregates are unable to penetrate erythrocyte membrane (Rogel et al., 1989, 1991), while our results indicate that the bound CyaA molecules were biologically active and produced erythrocyte lysis; (ii) we performed carbonate stripping at pH 11.5 to wash-off CyaA molecules loosely associated with cells and not inserted into the membrane (Fujiki et al., 1982; Rogel and Hanski, 1992); (iii) CyaA clusters could be observed in erythrocyte membranes using a wide range of toxin concentrations, starting as low as 5  $\mu$ g/mL and the cluster size appeared to be independent of time of exposure to toxin (Fig. 7) or of the used toxin concentration (data not shown). The uniform stoichiometry of the CyaA clusters indicated that the CyaA molecules were preferentially bound to distinct regions in erythrocyte membranes, each of a distinct size or containing a distinct number of possible toxin binding sites. These regions may correspond to the sites of accumulation of some rather abundant non-proteinaceous toxin receptor, since the binding of CyaA to erythrocytes is essentially unsaturable (Gray et al., 1999; Masin et al., 2004) and is not reduced by pre-

treatment of the erythrocytes with proteases (Masin et al., 2004). Previously, a role of lipids (or glycolipids) in the interaction of CyaA with cell membranes has been suggested (Gordon et al., 1989). These authors demonstrated that the incubation of CyaA with gangliosides prior to addition to target cells inhibited CyaA-mediated cAMP accumulation in cells (Gordon et al., 1989). Our results show that binding of CyaA to cells decreases upon cholesterol depletion from erythrocyte membranes. This suggests that CyaA may bind into membrane microdomains (rafts) that are typically enriched in gangliosides, sphingomyelin, and cholesterol (Simons and Ikonen, 1997) and are disrupted upon cholesterol extraction. Role of microdomains in CyaA binding would further be supported by the observation that liposomes formed from sphingomyelin (SM) and cholesterol, the two most abundant lipids of sheep erythrocyte microdomains (Koumanov et al., 2005), bind CyaA with a much higher efficiency than liposomes made of pure phospholipids, such as phosphatidylcholine.

Taken together, the results would suggest that the targeting of CyaA to specific domains in erythrocyte membranes may favor protein-protein interactions among CyaA molecules and hence facilitate toxin oligomerization and channel formation. Further, morphological changes of sheep erythrocytes resulting from CyaA hemolytic (channel-forming) activity tend to suggest that fluxes of  $K^+$  and possibly also fluxes of  $Ca^{2+}$  ions are the early steps preceding colloid-osmotic swelling and lysis of erythrocytes induced by CyaA.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Marek Basler for the gift of the CyaA-E581K construct.

#### REFERENCES

- Allan D, Thomas P. 1981.  $Ca^{2+}$ -induced biochemical changes in human erythrocytes and their relation to microvesiculation. *Biochem J* 198:433-440.
- Bachelet M, Richard MJ, Francois D, Polla BS. 2002. Mitochondrial alterations precede *Bordetella pertussis*-induced apoptosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 32:125-131.
- Backman L. 1986. Shape control in the human red cell. *J Cell Sci* 80:281-298.
- Bejerano M, Nisan I, Ludwig A, Goebel W, Hanski E. 1999. Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* 31:381-392.
- Bellalou J, Ladant D, Sakamoto H. 1990. Synthesis and secretion of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase as a 200-kilodalton protein. *Infect Immun* 58:1195-1200.
- Benada O, Pokorny V. 1990. Modification of the Polaron sputter-coater unit for glow-discharge activation of carbon support films. *J Electron Microsc Tech* 16:235-239.
- Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A, Sebo P. 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269:27231-27239.
- Betsou F, Sebo P, Guiso N. 1993. CyaC-mediated activation is important not only for toxic but also for protective activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun* 61:3583-3589.
- Chou AC, Fitch CD. 1981. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *J Clin Invest* 68:672-677.
- Confer DL, Eaton JW. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science* 217:948-950.
- Diaspro A, Annunziata S, Robello M. 2000. Single-pinhole confocal imaging of sub-resolution sparse objects using experimental point spread function and image restoration. *Microsc Res Tech* 51:464-468.
- Diaspro A, Federici F, Robello M. 2002. Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy. *Appl Opt* 41:685-690.
- Ehrmann IE, Gray MC, Gordon VM, Gray LS, Hewlett EL. 1991. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett* 278:79-83.
- El-Azami-El-Idrissi M, Bauche C, Loucka J, Osicka R, Sebo P, Ladant D, Leclerc C. 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J Biol Chem* 278:38514-38521.
- Fujiki Y, Hubbard AL, Fowler S, Lazarow PB. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 93:97-102.
- Glaser P, Sakamoto H, Bellalou J, Ullmann A, Danchin A. 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-hemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *Embo J* 7:3997-4004.
- Goodwin MS, Weiss AA. 1990. Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by *Bordetella pertussis* in infant mice. *Infect Immun* 58:3445-3447.
- Gordon VM, Young WW, Jr, Lechler SM, Gray MC, Leppla SH, Hewlett EL. 1989. Adenylate cyclase toxins from *Bacillus anthracis* and *Bordetella pertussis*. Different processes for interaction with and entry into target cells. *J Biol Chem* 264:14792-14796.
- Gray M, Szabo G, Otero AS, Gray L, Hewlett E. 1998. Distinct mechanisms for  $K^+$  efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *J Biol Chem* 273:18260-18267.
- Gray MC, Ross W, Kim K, Hewlett EL. 1999. Characterization of binding of adenylate cyclase toxin to target cells by flow cytometry. *Infect Immun* 67:4393-4399.
- Gray MC, Lee SJ, Gray LS, Zaretzky FR, Otero AS, Szabo G, Hewlett EL. 2001. Translocation-specific conformation of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* inhibits toxin-mediated hemolysis. *J Bacteriol* 183:5904-5910.
- Guermontprez P, Khelef N, Blouin E, Rieu P, Ricciardi Castagnoli P, Guiso N, Ladant D, Leclerc C. 2001. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha4beta2 integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193:1035-1044.
- Guiso N, Szatanik M, Rocancourt M. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase-hemolysin against bacterial colonization. *Microb Pathog* 11:423-431.
- Hackett M, Guo L, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266:433-435.
- Hanski E. 1989. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem Sci* 14:459-463.
- Harris RW, Sims PJ, Tweten RK. 1991. Evidence that *Clostridium perfringens* theta-toxin induces colloid-osmotic lysis of erythrocytes. *Infect Immun* 59:2499-2501.
- Harvill ET, Cotter PA, Yuk MH, Miller JF. 1999. Probing the function of *Bordetella bronchiseptica* adenylate cyclase toxin by manipulating host immunity. *Infect Immun* 67:1493-1500.
- Havlicek V, Higgins L, Chen W, Halada P, Sebo 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.
- Hewlett EL, Gray L, Allietta M, Ehrmann I, Gordon VM, Gray MC. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem* 266:17503-17508.
- Iida K, Whitlow MB, Nussenzweig V. 1991. Membrane vesiculation protects erythrocytes from destruction by complement. *J Immunol* 147:2638-2642.
- Iwaki M, Ullmann A, Sebo P. 1995. Identification by *in vitro* complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol* 17:1015-1024.
- Jorgensen SE, Hammer RF, Wu GK. 1980. Effects of a single hit from the alpha hemolysin produced by *Escherichia coli* on the morphology of sheep erythrocytes. *Infect Immun* 27:988-994.
- Jorgensen SE, Muleahy PF, Wu GK, Louis CF. 1983. Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by *Escherichia coli* hemolysin. *Toxicol* 21:717-727.
- Karimova G, Fayolle C, Gmira S, Ullmann A, Leclerc C, Ladant D. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the *in vivo* delivery of CD8+ T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12532-12537.
- Khelef N, Sakamoto H, Guiso N. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog* 12:227-235.
- Koumanov KS, Tessier C, Momchilova AB, Rainteau D, Wolf C, Quinn PJ. 2005. Comparative lipid analysis and structure of detergent-

- resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 434:150–158.
- Ladant D. 1988. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem* 263:2612–2618.
- Martin C, Requero MA, Masin J, Konopasek I, Goni FM, Sebo P, Ostolaza H. 2004. Membrane restructuring by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin, a member of the RTX toxin family. *J Bacteriol* 186:3760–3765.
- Masin J, Konopasek I, Svobodova J, Sebo P. 2004. Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes. *Biochim Biophys Acta* 1660:144–154.
- Moran M, Miceli MC. 1998. Engagement of GPI-linked CD48 contributes to TCR signals and cytoskeletal reorganization: a role for lipid rafts in T cell activation. *Immunity* 9:787–796.
- Nguyen VT, Kamio Y, Higuchi H. 2003. Single-molecule imaging of cooperative assembly of gamma-hemolysin on erythrocyte membranes. *Embo J* 22:4968–4979.
- Osicka R, Osickova A, Basar T, Guernonprez P, Rojas M, Leclerc C, Sebo P. 2000. Delivery of CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 68: 247–256.
- Osickova A, Osicka R, Maier E, Benz R, Sebo P. 1999. An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* 274:37644–37650.
- Palek J, Liu SC, Snyder LM. 1978. Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. I. Analysis of spectrin-rich complexes in ATP-depleted red cells. *Blood* 51:385–395.
- Rogel A, Hanski E. 1992. Distinct steps in the penetration of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* into sheep erythrocytes. Translocation of the toxin across the membrane. *J Biol Chem* 267: 22599–22605.
- Rogel A, Schultz JE, Brownlie RM, Coote JG, Parton R, Hanski E. 1989. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J* 8:2755–2760.
- Rogel A, Meller R, Hanski E. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem* 266:3154–161.
- Rose T, Sebo P, Bellalou J, Ladant D. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem* 270:26370–26376.
- Sanders SK, Alexander EL, Braylan RC. 1975. A high-yield technique for preparing cells fixed in suspension for scanning electron microscopy. *J Cell Biol* 67(2Pt. 1):476–480.
- Santoso S, Zimmermann U, Neppert J, Mueller-Eckhardt C. 1986. Receptor patching and capping of platelet membranes induced by monoclonal antibodies. *Blood* 67:343–349.
- Schlecht G, Loucka J, Najjar H, Sebo P, Leclerc C. 2004. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. *J Immunol* 173:6089–6097.
- Sebo P, Glaser P, Sakamoto H, Ullmann A. 1991. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene* 104:19–24.
- Simons K, Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569–572.
- Stolz J, Stadler R, Opekarova M, Sauer N. 1994. Functional reconstitution of the solubilized Arabidopsis thaliana STP1 monosaccharide-H<sup>+</sup> symporter in lipid vesicles and purification of the histidine tagged protein from transgenic *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant J* 6:225–233.
- Szabo G, Gray MC, Hewlett EL. 1994. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* produces ion conductance across artificial lipid bilayers in a calcium- and polarity-dependent manner. *J Biol Chem* 269:22496–22499.
- Wallace AJ, Stillman TJ, Atkins A, Jamieson SJ, Bullough PA, Green J, Artymiuk PJ. 2000. E. coli hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100:265–276.
- Weber K, Rathke PC, Osborn M. 1978. Cytoplasmic microtubular images in glutaraldehyde-fixed tissue culture cells by electron microscopy and by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1820–1824.
- Welch RA. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 5:521–528.
- Xavier R, Brennan T, Li Q, McCormack C, Seed B. 1998. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity* 8:723–732.
- Yamaji-Hasegawa A, Makino A, Baba T, Senoh Y, Kimura-Suda H, Sato SB, Terada N, Ohno S, Kiyokawa E, Umeda M, Kobayashi T. 2003. Oligomerization and pore formation of a sphingomyelin-specific toxin, lysenin. *J Biol Chem* 278:22762–22770.

### 9.3. Publikace 3

Loucká, J., Schlecht, G., **Vodolánová, J.**, Leclerc, C. and 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.

## Delivery of a MalE CD4<sup>+</sup>-T-Cell Epitope into the Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation Pathway by *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase

Jiřina Loucká,<sup>1</sup> Géraldine Schlecht,<sup>2</sup> Jana Vodolánová,<sup>1</sup> Claude Leclerc,<sup>2</sup> and Peter Šebo<sup>1\*</sup>

Laboratory of Molecular Biology of Bacterial Pathogens, Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic,<sup>1</sup> and Unité de Biologie des Régulations Immunitaires, Institut Pasteur, 75724 Paris, France<sup>2</sup>

Received 20 June 2001/Returned for modification 7 August 2001/Accepted 6 November 2001

**Recombinant adenylate cyclase toxoids are shown to deliver inserted foreign CD4<sup>+</sup>-T-cell epitopes into the major histocompatibility complex class II presentation pathway, inducing a specific CD4<sup>+</sup>-T-cell response in vivo and yielding in vitro stimulation of specific CD4<sup>+</sup> T cells at a 100-times-higher molar efficiency than the free peptide containing the epitope.**

The *Bordetella pertussis* adenylate cyclase (AC) toxin (ACT or CyaA) can penetrate a variety of cells, and upon reaching their cytosol, it perturbs cellular physiology by unregulated conversion of ATP to cyclic AMP (10). Genetic ablation of the AC activity, however, does not affect cell invasiveness of ACT (12). AC toxoids can hence be used as a potent new tool for delivery of vaccinal CD8<sup>+</sup>-T-cell epitopes into the cytosolic major histocompatibility complex (MHC) class I antigen presentation pathway (5). Moreover, it was recently found that ACT specifically targets the  $\beta_2$  integrin molecule CD11b, which is present on cells of the myeloid lineage and in particular on professional antigen-presenting cells (APCs), such as dendritic cells (6). This opens appealing possibilities of using the ACT toxoid as a nonreplicative vector for antigen delivery aiming at stimulation of specific cellular immune responses. We have, indeed, recently used recombinant ACT for delivery of foreign epitopes and for induction of protective antiviral, as well as therapeutic antitumoral CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell responses in mice (1, 2, 4, 7, 12, 13, 15, 16).

In certain cases, such as particularly for antitumor immunity, activation of CD4<sup>+</sup> T-helper cells in parallel to induction of CD8<sup>+</sup> T cytotoxic cells appears, however, necessary for optimal and long-lasting immune responses (9, 14, 17). The CD4<sup>+</sup> T-helper cells are generally activated by exogenous antigens that have been taken up by APCs via phagocytosis or endocytosis and processed through the MHC class II antigen presentation pathway. After processing, antigenic peptides bound to MHC class II molecules are presented at the cell surface and are recognized by T-cell receptors of CD4<sup>+</sup> T cells. Therefore, we tested whether ACT can deliver CD4<sup>+</sup>-T-cell epitopes for efficient endosomal processing and MHC-class II-restricted presentation, yielding specific stimulation of CD4<sup>+</sup>-T-cell responses.

We used the previously defined permissive insertion sites along the ACT molecule (12) and generated a set of 11 ACT

constructs, which carried an *H-2<sup>b</sup>/H-2<sup>d</sup>*-restricted CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope NGKLIAYPIAVEALS from the *Escherichia coli* maltose binding protein MalE (11). The recombinant ACT molecules were expressed in *E. coli* and purified, and their cell-invasive capacity was characterized, using sheep erythrocytes as the surrogate target cell model (Table 1). As expected, 9 of the 11 ACT/MalE constructs exhibited over 60% of membrane insertion (binding) and hemolytic capacity, and seven of these constructs conserved over 90% of the cell-invasive capacity of wild-type ACT. The capacity to bind and penetrate erythrocytes was nil for the ACT926/MalE construct, whereas the ACT594/MalE and ACT607/MalE proteins exhibited reduced hemolytic and cell-invasive activities. The ACT336/MalE construct did not exhibit any measurable AC activity, and its cell-binding and invasive activity could not be quantified. The full hemolytic activity, however, indicated that its cell-targeting capacity was intact.

To avoid interference of the toxin activity of ACT (conversion of intracellular ATP to cyclic AMP) with the physiology of the cells used for in vitro presentation assays, the AC activity of the individual ACT/MalE constructs was genetically ablated by disruption of their respective ATP binding sites (4). The obtained toxoids were purified close to homogeneity, as documented in Fig. 1, and their capacity to deliver the inserted MalE CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope into the MHC class II antigen processing and presentation pathway was first determined in vitro. This was measured as the potency of AC toxoids, incubated with mouse splenocytes as APCs, for stimulating interleukin 2 (IL-2) release from CRMC3 or FBCD1 T-cell hybridomas (11), which specifically recognize the NGKLIAYPIAVEALS peptide complexed at the surface of APCs with the MHC class II *H-2<sup>b</sup>* or *H-2<sup>d</sup>* molecules, respectively. As shown in Fig. 2, APCs incubated with up to 55 nM mock AC toxoid did not stimulate any IL-2 release from the two hybridoma T cells. In contrast, the six ACT/MalE proteins, carrying the epitope within the first 600 residues, mediated an efficient delivery and subsequent presentation of the MalE peptide to the *H-2<sup>b</sup>*-restricted CRMC3 T cells already at 0.06 nM toxoid concentrations (Fig. 2A). It should be noted that approxi-

\* Corresponding author. Mailing address: Institute of Microbiology CAS, Videnřská 1083, CZ-142 20 Prague 4, Czech Republic. Phone: (4202) 475 2762. Fax: (4202) 475 2152. E-mail: sebo@biomed.cas.cz.

TABLE 1. Characteristics of ACT constructs with MalE epitope

ACT protein <sup>a</sup>	Insertion point/flanking sequences <sup>b</sup>	Binding activity <sup>c</sup>	Invasive AC activity <sup>c,d</sup>	Hemolytic activity <sup>e</sup>
ACT wild type	None	100 ± 11	100 ± 12	100 ± 15
ACT108/MalE	AHG <sup>107</sup> <b>VL NGKLIAYPIAVEALS</b> VH <sup>108</sup> HTA	97 ± 12	99 ± 10	98 ± 13
ACT133/MalE	TGM <sup>132</sup> <b>VYG NGKLIAYPIAVEALS</b> YT <sup>134</sup> DGV	96 ± 11	98 ± 12	95 ± 17
ACT233/MalE	TGG <sup>232</sup> <b>VL NGKLIAYPIAVEALS</b> VH <sup>233</sup> LDR	100 ± 8	98 ± 13	99 ± 8
ACT336/MalE	YIG <sup>335</sup> <b>VL NGKLIAYPIAVEALS</b> VH <sup>336</sup> QQR	ND <sup>e</sup>	ND	96 ± 9
ACT424/MalE	SDM <sup>423</sup> <b>VYG NGKLIAYPIAVEALS</b> YT <sup>425</sup> AAV	90 ± 15	99 ± 6	111 ± 20
ACT594/MalE	LLA <sup>593</sup> <b>CT NGKLIAYPIAVEALS</b> GT <sup>594</sup> RGV	75 ± 23	<2	20 ± 5
ACT607/MalE	GAS <sup>606</sup> <b>VYG NGKLIAYPIAVEALS</b> YT <sup>608</sup> GAA	61 ± 18	15 ± 8	80 ± 34
ACT751/MalE	EQL <sup>750</sup> <b>VYG NGKLIAYPIAVEALS</b> YT <sup>752</sup> NS	83 ± 11	93 ± 8	99 ± 15
ACT926/MalE	NAS <sup>925</sup> <b>CT NGKLIAYPIAVEALS</b> GT <sup>926</sup> RIH	0	0	0
ACT1334/MalE	WFG <sup>1333</sup> <b>VL NGKLIAYPIAVEALS</b> VH <sup>1334</sup> NTQ	88 ± 15	90 ± 11	99 ± 8
ACT1648/MalE	WYR <sup>1647</sup> <b>VL NGKLIAYPIAVEALS</b> VH <sup>1648</sup> DAD	100 ± 9	98 ± 12	88 ± 7

<sup>a</sup> Three double-stranded synthetic oligonucleotides in the required reading frames were inserted into the unique *Bsr*GI sites located at different positions within the *cyuA* gene on a set of pT7CACT1-*Bsr*GI plasmids (12). The orientation and exact sequence of all inserted oligonucleotides were verified by DNA sequencing, and the proteins were produced and purified as previously described (8, 16).

<sup>b</sup> The MalE epitope sequence is underscored, and the flanking residues are indicated in boldface.

<sup>c</sup> Samples were tested using sheep erythrocytes as model target cells and expressed as percent wild-type ACT activity. The activities of the proteins were determined prior to ablation of the AC activity (insertion of a dipeptide insert between residues 188 and 189) as described previously (12). The activities are expressed in percent wild-type ACT activity and represent average values with standard deviations from at least three independent determinations performed in duplicates with three different toxin preparations ( $n = 6$ ).

<sup>d</sup> Invasive activity was determined as the AC activity translocated into sheep erythrocytes and protected against digestion by extracellularly added trypsin (12).

<sup>e</sup> ND, not determined because of no measurable AC activity.

mately hundred-times-higher concentrations of the free synthetic peptide were necessary to induce similar IL-2 production by the same hybridoma (Fig. 2B). The two toxoids bearing the CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope at positions 607 and 1648 induced intermediate IL-2 production. Finally, the three toxoids with the MalE peptide at positions 751, 926, and 1334 induced very low responses of the CRMC3 T-cell hybridoma, even at the highest concentration tested (0.56 nM). A similar response pattern, albeit at higher AC toxoid concentrations, was observed also for the FBCD1 T-cell hybridoma, which recognizes the same epitope complexed with *H-2<sup>d</sup>* molecules (Fig. 2C and D). It can, therefore, be concluded that the constructs with the MalE epitope inserted within the first third of the toxoid molecule were particularly efficient in delivering the epitope for endosomal proteolytic processing and subsequent MHC-class II-dependent antigenic presentation resulting in productive recognition by T-cell hybridoma. These results suggest that the

carrier ACT moiety was accounting for the delivery efficiency, by targeting the epitope into APCs.

Interestingly, there was no influence of the residues flanking the epitope on MHC class II presentation. All three insertion contexts that were used (Table 1) allowed a comparable efficiency of T-cell hybridoma stimulation by inserts located within the first 600 residues of ACT (compare Table 1 and Fig. 2). Moreover, there was no clear-cut correlation between the capacities of ACT constructs to penetrate erythrocyte membrane and their capacities to deliver the MalE epitope for presentation on MHC class II molecules of APCs. Erythrocytes lack the ACT receptor (CD11b) and endocytosis mechanisms (6). The erythrocyte invasion assay allows, hence, only characterization of the membrane penetration activity of ACT constructs, which cannot fully reflect the more complex interactions of ACT with APCs. Nevertheless, the nil erythrocyte-binding and penetration activity may explain the very



FIG. 1. SDS-PAGE analysis of the purified ACT/MalE preparations. The proteins were purified from urea extracts by DEAE- and phenyl-Sepharose chromatography as previously described (8), and 1 to 3  $\mu$ g of each was analyzed together with the wild-type ACT on a 7.5% acrylamide gel stained with Coomassie blue.



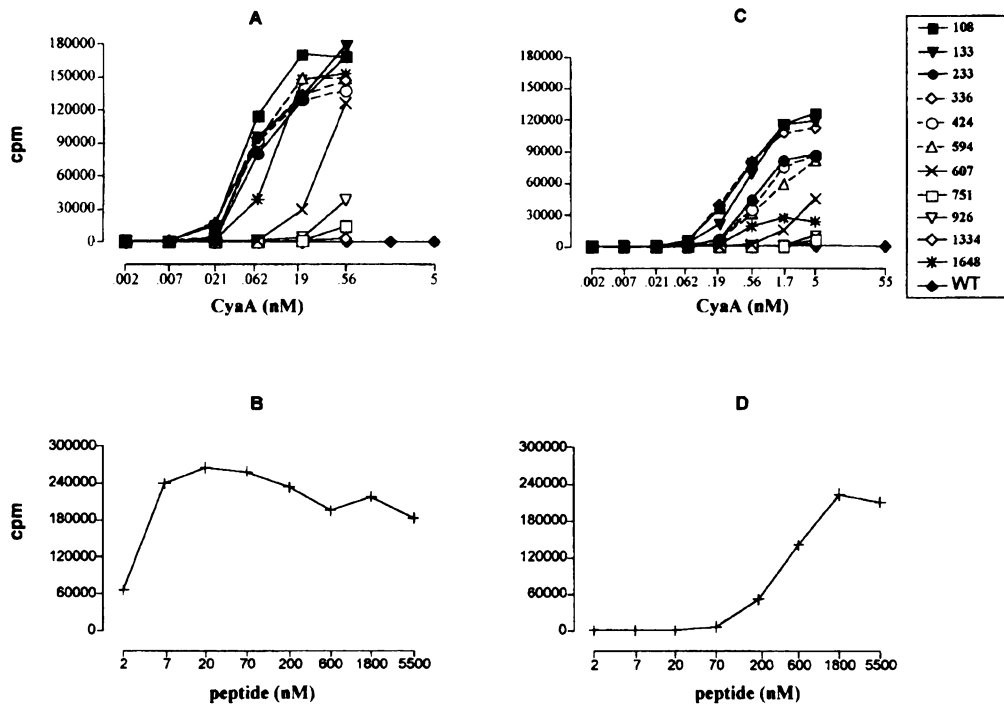


FIG. 2. Most of the ACT/MalE proteins efficiently deliver the inserted CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope for presentation to specific T cells. Splenocytes from C57BL/6 (A) or BALB/c (C) mice were used as APCs. Various concentrations of the AC toxoids, harboring the MalE CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope at different sites, were added to APCs. The APCs were then cocultured with 10<sup>5</sup> cells of CRMC3 (A) or FBCD1 (C) anti-MalE CD4<sup>+</sup>-T-cell hybridoma, which selectively recognize complexes of the *H-2<sup>b</sup>* or *H-2<sup>d</sup>* MHC class II molecules with bound MalE peptide (NGKLIAYPIAVEALS), respectively. As positive controls, C57BL/6 (B) or BALB/c (D) splenocytes were incubated with various concentrations of the MalE peptide and CRMC3 (B) or FBCD1 cells (D). After 18 h of culture, supernatants were frozen for at least 2 h at -80°C. The amount of IL-2 produced by the stimulated CRMC3 and FBCD1 cells was then determined by the CTLL proliferation method. Briefly, 10<sup>4</sup> cells of the IL-2-dependent CTLL line per well were cultured with 100  $\mu$ l of supernatant in 200  $\mu$ l of final volume. Twenty-four hours later, [<sup>3</sup>H]thymidine (50  $\mu$ Ci/well) was added and cells were harvested 6 h later with an automated cell harvester. Incorporated thymidine was detected by scintillation counting. Each point was done in duplicate, and the experiment was repeated four times. Results are expressed in change in counts per minute of incorporated [<sup>3</sup>H]thymidine (counts per minute in the presence - counts per minute in the absence of ACT). WT, wild type.

poor, if any, epitope delivery capacity of the ACT926/MalE toxoid. The ACT with the MalE insert at positions 751 and 1334 exhibited, however, full erythrocyte penetration capacity, while performing very poorly in the T-cell stimulation assay. It is possible that upon interaction with cells, only certain portions of the ACT polypeptide, such as its first 600 residues and the very C-terminal portion comprising an insert at position 1648, may effectively reach the endosomal entry of the MHC class II pathway of APCs. Presentation of the inserts at positions 751 and 1334 may also be inhibited by structural constraints preventing epitope excision within endosomes or by translocation of those ACT portions to the cytosolic side of the endosomal membrane.

The present results, however, demonstrate that 6 out of 11 constructed AC toxoids delivered a model CD4<sup>+</sup>-T-cell epitope for presentation *in vitro* with high efficiency. Two of the best-performing constructs were, therefore, tested *in vivo* for the capacity to induce specific CD4<sup>+</sup>-T-cell responses. As shown in Fig. 3, 1 week after immunization the splenocytes of mice that intravenously received a single dose of 50  $\mu$ g of the ACT108/MalE and ACT336/MalE toxoids exhibited a strong proliferative response to the cognate MalE peptide, as compared to splenocytes isolated from mice that received the same dose of mock AC toxoid. It can, hence be concluded that the

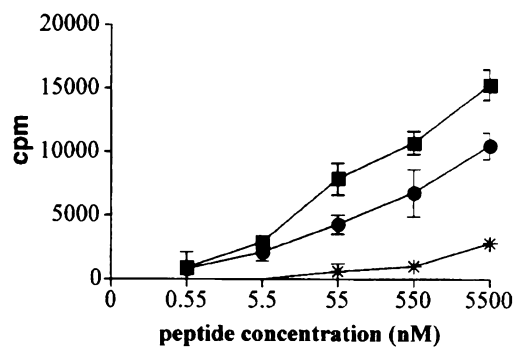


FIG. 3. *In vivo* induction of CD4<sup>+</sup>-T-cell responses by MalE/ACT proteins. C57BL/6 mice were intravenously injected with 50  $\mu$ g of MalE/ACT proteins bearing the MalE epitope at site 108 (●) or 336 (■). Mice were injected with mock AC toxoid (asterisks) as negative control. One week later, the mice were sacrificed and the splenocytes were *in vitro* stimulated with various concentrations of the MalE peptide. After 72 h of culture, [<sup>3</sup>H]thymidine (50  $\mu$ Ci/well) was added and cells were harvested 6 h later with an automated cell harvester. Incorporated thymidine was detected by scintillation counting. Results show the antigen-specific proliferation obtained for one representative mouse out of four tested in two independent experiments. Each point was done in triplicate and standard deviations are indicated by the bars ( $n = 3$ ). Results are expressed in change in counts per minute of incorporated [<sup>3</sup>H]thymidine (counts per minute in the presence of peptide - counts per minute in the absence of peptide).

ACT/MaIE toxoids induced a CD4<sup>+</sup>-T-cell response specific for the MaIE epitope.

The mechanism by which the MaIE epitope inserted into ACT reaches the MHC-class II-dependent antigen presentation pathway remains to be elucidated. It is, however, plausible to assume that ACT endocytosis may be promoted by interaction with its  $\beta_2$  integrin (CD11b) receptor (6) and that this may direct the inserted MaIE epitope to the endosomal pathway. Upon proteolytic processing, the excised epitope could then associate with MHC class II molecules, leading to presentation at the cell surface. Recently, ACT was also shown to efficiently deliver several CD8<sup>+</sup>-T-cell epitopes inserted within its AC moiety (3). These results suggest that ACT could be used for simultaneous delivery of CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-T-cell epitopes to professional APCs and for parallel induction of both T-helper and T cytotoxic responses. ACT appears, therefore, to be a promising candidate for immunotherapy protocols targeting cancer or chronic viral infections, where coactivation of specific CD4<sup>+</sup>- and CD8<sup>+</sup>-T-cell responses is required.

We thank Martina Hřibová for help with AC assays and Gilles Dadaglio for critical reading of the manuscript.

This work was supported by ANRS and by grants no. 310/01/0934, A502907, and ME167 of the Grant Agency, the Academy of Science, and the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic, respectively, and QLK2-CT-1999-00556 from the 5th Framework Program of the European Union.

#### REFERENCES

- Dadaglio, G., Z. Moukrim, R. Lo-Man, V. Sheshko, P. Sebo, and C. Leclerc. 2000. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **68**:3867-3872.
- Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying a cytotoxic T-cell epitope. *J. Immunol.* **162**:4157-4162.
- Fayolle, C., A. Osickova, R. Osicka, T. Henry, M.-J. Rojas, M.-F. Saron, P. Sebo, and C. Leclerc. 2001. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J. Virol.* **75**:7330-7338.
- Fayolle, C., P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1996. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8<sup>+</sup> T cell epitopes. *J. Immunol.* **156**:4697-4706.
- Guermonez, P., C. Fayolle, G. Karimova, A. Ullmann, C. Leclerc, and D. Ladant. 2000. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8-positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. *Methods Enzymol.* **326**:527-542.
- Guermonez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 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.
- Guermonez, P., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Direct delivery of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J. Immunol.* **162**:1910-1916.
- Karimova, G., C. Fayolle, S. Gmira, A. Ullmann, C. Leclerc, and C. Ladant. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12532-12537.
- Kern, D. E., J. P. Klarnet, M. C. Jensen, and P. D. Greenberg. 1986. Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I-restricted CTL. *J. Immunol.* **136**:4303-4310.
- Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* **7**:172-176.
- Lo-Man, R., J. P. M. Langeveld, E. Dériaud, M. Jehanno, M. Rojas, J. M. Clément, R. H. Meloen, M. Hofnung, and C. Leclerc. 2000. Extending the CD4<sup>+</sup> T-cell epitope specificity of the Th1 immune response to an antigen using a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium delivery vehicle. *Infect. Immun.* **68**:3079-3089.
- Osička, R., A. Osičkova, T. Basar, P. Guermonez, M. Rojas, C. Leclerc, and P. Sebo. 2000. Delivery of CD8<sup>+</sup> T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect. Immun.* **68**:247-256.
- Saron, M. F., C. Fayolle, P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1997. Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8<sup>+</sup> T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:3314-3319.
- Schnell, S., J. W. Young, A. N. Houghton, and M. Sadelain. 2000. Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4<sup>+</sup> T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:1243-1250.
- Šebo, P., C. Fayolle, O. d'Andria, D. Ladant, C. Leclerc, and A. Ullmann. 1995. Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *Infect. Immun.* **63**:3851-3857.
- Sebo, P., Z. Moukrim, M. Kalhous, N. Schaft, G. Dadaglio, V. Sheshko, C. Fayolle, and C. Leclerc. 1999. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying multiple copies of a viral CD8<sup>+</sup> T-cell epitope. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**:167-173.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief. 1999. CD4<sup>+</sup> T cells and their role in antitumor immune responses. *J. Exp. Med.* **189**:753-756.

Editor: J. D. Clements