

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY
KARLOVY V PRAZE**

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Vápníková signalizace v buňkách a interakce
hostitel-patogen**

Eva Pospíšilová

Školitel: RNDr. Jiří Mašín, PhD.

2007/2008

Obsah

Abstrakt	3
1) Úvod	5
2) Vápníková signalizace v buňkách	5
2.1) Úvod k vápníkové signalizaci	5
2.2) Mitochondrie	7
2.3) Endoplasmatické Retikulum (ER)	7
2.4) Vápníkové kanály a pumpy	7
2.5) Ca ²⁺ a apoptóza	9
3) Bakterie a bakteriální toxiny vyvolávající změny v intracelulární koncentraci vápenatých iontů	10
4) Adenylát cyklázový toxin	13
4.1) Bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	13
4.2) Struktura CyaA	14
4.3) Mechanismus účinku CyaA	17
4.4) Vliv toxinu na buňky	19
4.5) Doprava antigenů do antigen prezentujících buněk	19
5) Závěr	21
6) Použitá literatura	22

Abstrakt

Vápníková signalizace je zásadní pro regulaci mnoha buněčných pochodů, jakými jsou například buněčná proliferace a diferenciace, nebo buněčná smrt. Vápníková homeostáze také hraje roli v obraně hostitele proti patogenům. Některé bakterie proto vyvinuly způsoby, jak hladinu vápníku v buňce ovlivňovat a to buď přímo, nebo pomocí tzv. faktorů virulence. Mezi tyto faktory patří i adenylát cyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*, patřící mezi RTX (Repeats In Toxin) toxiny. Je to multifunkční protein, který jako jediný známý toxin translokuje svoji adenylát cyklázovou doménu do buňky bez nutnosti endocytózy. Cílovými buňkami CyaA jsou převážně profesionální antigen prezentující buňky nesoucí na membráně receptor pro CyaA - integrin CD11b/CD18. Po translokaci enzymatické adenylát cyklázové domény do cytozolu buňky a po aktivaci buněčným kalmodulinem spouští tento enzym nekontrolovatelnou přeměnu ATP na cAMP, což má za následek ztrátu baktericidních schopností infikovaných buněk, nebo i apoptózu makrofágů. Enzymaticky neaktivní CyaA má také zajímavé imunologické využití, používá se jako nástroj pro dopravu cizorodých antigenů do antigen prezentujících buněk a tím k navození T-buněčných odpovědí proti těmto antigenům.

Abstract

Calcium signalling is crucial for many cellular processes, including proliferation, differentiation and cell death. Calcium homeostasis is also involved in host defense against pathogens and some bacteria developed mechanisms and virulence factors that manipulate intracellular calcium level in host cells. One of them is the RTX toxin (Repeats In Toxin) family adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. CyaA is a multifunctional protein that can translocate its adenylate cyclase domain into the target cell cytosol directly across the cytoplasmic membrane, without the need for toxin endocytosis. The physiologically most relevant cellular targets of CyaA appear to be the professional antigen presenting cells bearing the membrane integrin CD11b/CD18 receptor for CyaA. After translocation of enzymatic adenylate cyclase domain into the cytosol and following activation by eucaryotic calmodulin, the toxin catalyzes uncontrolled conversion of ATP to cAMP. This causes loss of bactericidal functions of target cells and death of macrophages. Enzymatically inactive CyaA also has interesting immunological application. It is used for delivery of

passenger antigens into antigen presenting cells for processing and induction of specific T-cell responses.

Klíčová slova: vápníková signalizace, vápníkové pumpy a kanály, toxiny, *Bordetella pertussis*, adenylát cyklázový toxin

Key words: calcium signalling, calcium pumps and channels, toxins, *Bordetella pertussis*, adenylate cyclase toxin

1) Úvod

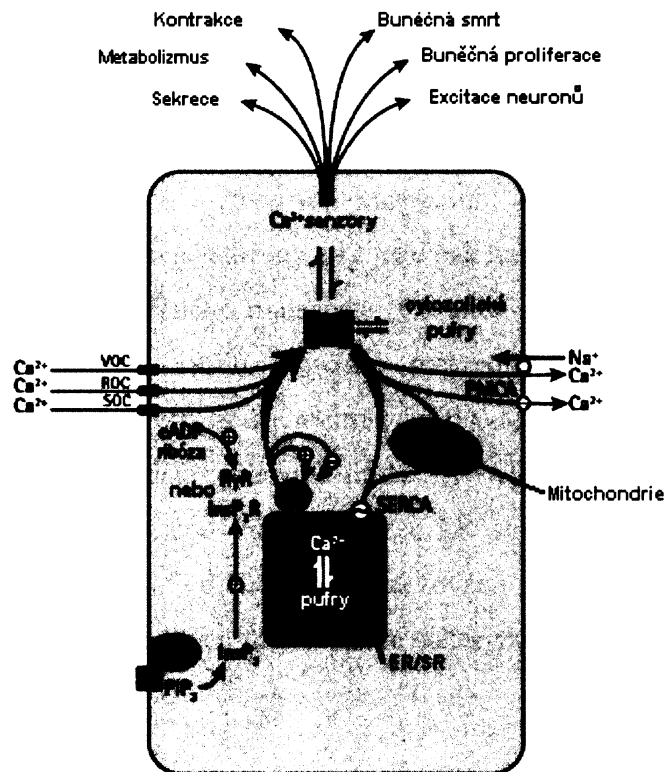
Bakterie *Bordetella pertussis* produkuje adenylát cyklázový toxin, který patří do rodiny RTX toxinů. Tento toxin interaguje s buňkami imunitního systému, nesoucími v cytoplazmatické membráně integrinový receptor CD11b/CD18, jako jsou makrofágy a neutrofilové. Tento multifunkční toxin je zajímavý z mnoha hledisek. Jako jediný známý toxin translokuje svoji adenylát cyklázovou doménu do buňky přes membránu, nezávisle na receptorem-zprostředkované endocytóze. Při tomto procesu dochází k masivnímu vstupu vápenatých iontů do cytoplazmy buňky. Je známo, že vápník hraje v buňce velmi důležitou úlohu, má funkci tzv. druhého posla a jeho koncentrace je v buněčné cytoplazmě velmi přísně regulována. Výsledky z naší laboratoře ukazují, že vstup vápníku do buňky účinkem toxinu hraje úlohu v přesunu komplexu toxin-integrin do lipidových mikrodomén, stejně tak hraje roli v následné endocytóze toxinu. Adenylát cyklázový toxin s vloženými cizorodými antigeny je také používán jako nosič pro dopravu cizorodých antigenů a následnou indukci CD4⁺ a CD8⁺ T - buněčných odpovědí proti bakteriím, virům nebo nádorům. Vstup vápenatých iontů proto může ovlivňovat i toxinem-zprostředkovanou dopravu cizorodých antigenů na MHC II, neboť k dopravě na MHC II je využívána receptorem-zprostředkovaná endocytóza závislá na klathrinu. V této bakalářské práci jsem se snažila shrnout základní pochody, které vedou k vápníkové signalizaci v buňkách a dále jsem se zabývala bakteriemi a bakteriálními toxiny, které jsou schopny narušit vápníkovou rovnováhu v buňce. Velká část práce je také věnována adenylát cyklázovému toxinu, hlavnímu předmětu zájmu naší laboratoře.

2) Vápníková signalizace v buňkách

2.1) Úvod k vápníkové signalizaci

Ion Ca²⁺ funguje v buňkách jako univerzální signální molekula, tzv. druhý posel. Pojem druhý posel vznikl s objevením cAMP a popisuje malé molekuly produkované buňkou po stimulaci, které jsou schopné regulace buněčných procesů. Všechny mají stejný, zdánlivě jednoduchý mechanismus: stimulace buňky vyvolá zvýšení koncentrace druhého posla, ten se naváže na cílové molekuly, tím modifikuje jejich aktivitu a následně vyvolá specifické odpovědi. Tímto zdánlivě jednoduchým mechanismem může Ca²⁺ regulovat celou řadu odlišných funkcí, jako je například proliferace buňek, genová exprese nebo apoptóza (Bootman et al., 2006) (viz obrázek 1). Ca²⁺ signály jsou buď elementární, založené na otevření jednoho nebo více buněčných kanálů, nebo globální, které tvoří vápníkové vlny šířící

se celou buňkou (Berridge et al., 1998). Hlavní roli v regulaci Ca^{2+} v buňce má endoplazmatické retikulum, jádro, mitochondrie a Golgiho aparát. Všechny tyto buněčné komponenty jsou úzce propojeny, což hraje klíčovou roli v regulaci vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} . Mimobuněčná koncentrace Ca^{2+} je asi 2 mM, vnitrobuněčná koncentrace vápníku v klidové buňce asi 0,1 μM . Po stimulaci může koncentrace volného Ca^{2+} v buňce vzrůst až na 1-3 μM . Eukaryotické buňky zvyšují cytoplazmatickou koncentraci Ca^{2+} dvěma způsoby: uvolněním vápenatých iontů ze zdrojů uvnitř buňky, nebo vstupem vápníku z vnějšího prostředí. Ca^{2+} z jeho zásobáren v buňce uvolňují druzí poslové. Je to buď sám Ca^{2+} , InsP_3 , cADP ribosa a nebo například nikotinamidadenin dinukleotid (Parekh and Putney, 2005).



Obrázek 1: Základní vápníková signalizace v buňce

VOC - napětím-ovládané kanály, ROC - receptorem-ovládané kanály, SOC - kanály aktivované po vyprázdnění buněčných zásobáren, ER - endoplazmatické retikulum, SR - sarkoplazmatické retikulum, cADP ribóza - cyklická Adenosin Difosfát ribóza, RyR - Ryadoninový receptor, InsP_3R - inositol 3-fosfátový receptor, PLC - fosfolipáza C, PIP_2 - fosfatidyl inositol difosfát, R - receptor, SERCA - sarkoplazmatická / endoplazmatická Ca^{2+} ATPasa, PMCA - membránová Ca^{2+} ATPasa (plasma membrane Ca^{2+} ATPase).

2.2) Mitochondrie

Mitochondrie mají velkou schopnost akumulace vápníku a vnitřek mitochondrie obsahuje pufrční systém, chránící před přílišným nárůstem koncentrace Ca^{2+} . Vápník může opustit mitochondrii pomocí tzv. „permeability transition“ pórů (PTP) (Duchen, 1999), které aktivuje sám vápník ve vnitřku mitochondrie (Ichas et al., 1997). Otevření těchto pórů může vést ke kolapsu transmembránového potenciálu mitochondrie, který vede k uvolnění cytochromu c a končí apoptózou buňky (Berridge et al., 2000). Z dosavadních výsledků vyplývá, že mitochondrie dokáže nejen vyrovnat hladinu Ca^{2+} v cytoplazmě na fyziologickou koncentraci, ale navíc mitochondrie akumulací Ca^{2+} přísně kontroluje buněčný energetický metabolismus modulací aktivity enzymů mitochondriální matrix. Mitochondrie také ovlivněním koncentrace cytozolického Ca^{2+} ovlivňuje buněčné funkce závislé na tomto iontu (Brini, 2003).

2.3) Endoplazmatické Retikulum (ER)

Mezi hlavní funkce ER patří „skladování“ Ca^{2+} , skládání, modifikace a třídění proteinů. Je zde mnoho na Ca^{2+} závislých chaperonů, které dohlíží na to, aby nově syntetizované proteiny byly správně složeny a ty jsou pak transportovány dále do svého místa určení. ER se dále účastní buněčného transportu (Gorelick and Shugrue, 2001), uvolňování stresových faktorů (Kaufman, 1999), regulace metabolismu cholesterolu (Brown and Goldstein, 1999) a apoptózy (Ferri and Kroemer, 2001). Mnoho z těchto procesů vyžaduje Ca^{2+} , apoptóza a špatné skládání proteinů může být vyvoláno dlouhodobým snížením koncentrace Ca^{2+} v ER (Parekh and Putney, 2005). ER slouží jako zásobárna pro vápník, proto je důležité aby hladina Ca^{2+} v ER nebyla udržována příliš nízká. Doplnění hladiny Ca^{2+} v ER je proto jednou z důležitých funkcí každé eukaryotické buňky.

2.4) Vápníkové kanály a pumpy

Kanálů, kterými vstupuje Ca^{2+} do buňky je několik typů (Heinemann, 2002):

Prvním typem jsou napětím-ovládané Ca^{2+} kanály. Nacházejí se hlavně ve svalových a nervových buňkách, kde jsou aktivovány depolarizací plazmatické membrány. Skládají se obvykle z pěti podjednotek (α_1 , α_2 , β , γ , δ). Podjednotka α_1 funguje jako Ca^{2+} pór a ostatní podjednotky jsou regulační. Jsou klasifikovány na základě elektrofyziologických a farmakologických vlastností. Napětím-ovládané kanály se dělí na několik skupin: jsou známy tzv. T, L, N, P/Q a R typy. T - typ kanálů, aktivovaný nízkým napětím, je důležitý pro rytmickou aktivitu buněk srdečního svalu. P/Q a N- typ se účastní přenosu nervového

vzruchu. L - typy kanálů se vyskytují v širokém spektru buněk a jsou zodpovědné za propojení excitace svalové buňky s její kontrakcí. V příčně pruhovaných svalech jsou propojeny s ryanodinovým receptorem, který zprostředkovává uvolnění Ca^{2+} ze sarkoplazmatického retikula (SR) po aktivaci L - typu Ca^{2+} kanálů.

Dalším typem vápníkových kanálů v buňkách jsou receptorem-ovládané Ca^{2+} kanály. Tvoří heterogenní skupinu, většinou se nalézají na sekrečních buňkách a nervových zakončeních. Dobře známým typem tohoto kanálu je např. nikotinový acetylcholinový receptor. Je aktivován vazbou ligandu, kterým může být ATP, serotonin, glutamát nebo acetylcholin, na extracelulární doménu kanálu.

Dalším typem vápníkových kanálů jsou mechanicky aktivované kanály. Nacházejí se na cytoplazmatické membráně mnoha typů buněk a přenášejí do buňky informace o deformaci buňky. Proteinové složení kanálu není dosud známo. Příkladem mechanicky indukované vápníkové signalizace jsou vápníkové vlny v epitelálních buňkách v průdušnici, kde například deformace jediné buňky může vést k indukci vápníkové vlny, která se šíří dále mezi buňkami. Tyto vlny pak buňky synchronizují (Dirksen and Sanderson, 1990). To pomáhá například při odstranění hlenu a cizích částecích z plic.

Tzv. SOC kanály (ze „Store-Operated Channels“) se aktivují vyprázdněním intracelulárních zásobáren vápníku v endoplazmatickém retikulu (ER). Mechanismus, jakým kanály tento nedostatek Ca^{2+} rozpoznají je zatím nejasný, ale je zde několik hypotéz (Barritt, 1999; Parekh and Putney, 2005). Nejrozšířenější je názor, že vyprázdnění Ca^{2+} zásobáren v ER vede k produkci buněčného metabolitu (tzv. "calcium influx faktor"), který přímo či nepřímo aktivuje Ca^{2+} SOC kanály v plazmatické membráně. Další možností, jak by mohly být aktivovány SOC kanály je jejich přímé propojení s inositol 1,4,5-trisfosfátovými receptory (InsP_3R) nebo ryanodinovými receptory (RyR). Vypadá to, že vyprázdnění zásobáren vápníku v ER/SR vede ke konformační změně InsP_3R nebo RyR. Konformační změna těchto receptorů je pak přenesena na SOC Ca^{2+} kanál a tím se aktivuje vstup Ca^{2+} do buňky. Tyto kanály jsou nejrozšířenějším typem vápníkových kanálů v buňce.

Posledním typem jsou kanály aktivované druhými posly. Tyto kanály jsou obecně aktivovány po stimulaci buňky hormonem nebo růstovým faktorem. Většinou tvoří nescifickou cestu pro průnik kationtů (Barritt, 1999). Druhých poslů aktivujících vstup Ca^{2+} je mnoho, od mastných kyselin jako arachidonová kyselina, po anorganické kyslíkové a dusičné radikály nebo samotný Ca^{2+} (Bootman et al., 2002).

Dále jsou v buňce kanály, jimiž je Ca^{2+} uvolňován z vnitřních zásobáren do buňky. Patří mezi ně inositol 1,4,5-trisfosfátové receptory (InsP_3R). Vazba mnoha hormonů a růstových faktorů ke specifickému receptoru na plazmatické membráně vede k aktivaci fosfolipázy C, která hydrolyzuje fosfolipidy a vytváří inositol 1,4,5-trisfosfát (InsP_3) - druhého posla. Ten, přesto že je tvořený z lipidu, je rozpustný ve vodě a prostupuje plazmatickou membránou. V buňce pak reguluje InsP_3R , nacházející se v membráně ER. Tyto kanály, po navázání InsP_3 změni konformaci a dochází k uvolňování Ca^{2+} z ER do cytoplazmy. InsP_3R jsou velké struktury (~1200kDa), tvořené 4-mi podjednotkami. InsP_3R mohou být kromě InsP_3 ještě regulovány koncentrací Ca^{2+} v cytozolu buňky. Mírný vzestup v koncentraci Ca^{2+} (0,5-1 μM) podporuje otevření kanálu, zatímco koncentrace nad 1 μM otevírání inhibuje (Bootman et al., 2006). Tato závislost InsP_3R na koncentraci Ca^{2+} je rozhodující pro buněčnou Ca^{2+} signalizaci (Bootman et al., 2006). InsP_3R jsou kovalentně modifikovány a ovlivňovány i řadou alosterických interakcí. InsP_3R váží řadu proteinů, a tím určují jejich lokalizaci v buňce a mění jejich aktivitu (Roderick and Bootman, 2003). Některé z těchto proteinů jako např. Bcl-2 jsou regulátory důležitých buněčných pochodů. Další jsou enzymy, jako např. protein kináza A, která reguluje fosforylaci InsP_3R (Bootman et al., 2006).

Dalším typem kanálů, které uvolňují vápník z jeho vnitřních zdrojů do buňky jsou ryanodinové receptory (RyRs). Tyto receptory jsou strukturně a funkčně podobné InsP_3R ale jsou přibližně 2x vodivější a mají 2x větší molekulovou hmotnost. Jsou, stejně jako InsP_3R citlivé k cytoplazmatickému Ca^{2+} , ale aktivovány a inhibovány jsou při jeho vyšších koncentracích (aktivace při 1-10 μM , inhibice při >10 μM). InsP_3R jsou téměř ve všech savcích buňkách, zatímco RyR jsou hlavně ve svalových a nervových buňkách. RyR jsou stejně jako InsP_3R kódovány třemi geny (Bootman et al., 2006). Jsou i další možné cesty uvolnění Ca^{2+} z jeho zásobáren v buňce, například cADPR (cyklická ADP ribosa) aktivuje RyR a tím uvolňuje Ca^{2+} do cytoplazmy buňky.

2.5) Ca^{2+} a apoptóza

Přesné seřízení intercelulárních a intracelulárních signálů je zásadní stejně tak pro život, jako pro smrt v biologickém organismu. Vysoká koncentrace iontů v cytoplazmě, způsobená ztrátou regulace kanálů a pump může vést k sérii událostí vedoucí ke smrti buňky (Orrenius et al., 2003). Programovaná buněčná smrt je aktivní a vysoce regulovaný mechanismus, nutný k obnově tkání dospělého organismu. Může být způsobena ztrátou kontroly nad Ca^{2+} homeostázou nebo úmyslnými změnami v koncentraci Ca^{2+} (Berridge et al., 2000). Role Ca^{2+} v apoptóze je velice komplexní a zahrnuje mnoho kroků, jako je

sfgomyelinová signální dráha, redoxní systém, stresem aktivovaná protein-kinázová kaskáda a signální dráha Ca^{2+} . Poslední jmenovaná dráha zahrnuje kontrolu exprese apoptotických signálních component jako např. tzv. Fas systém. Ca^{2+} ionty mohou také způsobovat apoptózu při různých poruchách v komunikaci mezi ER a mitochondriemi, mezi kterými je nepřetržitý tok vápníku. Vápníkový signál řízený InsP_3 ve spojitosti např. s ceramidem vytvoří „permeability transition“ pór a tím vede k apoptóze (Szalai et al., 1999). Druhou možností jak mitochondrie reagují na vysokou hladinu vápníku je uvolnění cytochromu c (Shimizu et al., 1999). Regulátory apoptózy mohou působit i tak, že ovlivňují koncentraci Ca^{2+} v ER a mitochondriích - např. snížením Ca^{2+} v ER se snižuje také jeho uvolňování do cytoplazmy buňky (Foyouzi-Youssefi et al., 2000; Pinton et al., 2000).

3) Bakterie a bakteriální toxiny vyvolávající změny v intracelulární koncentraci vápenatých iontů

Vápník funguje v buňce jako druhý posel a bakteriální patogeny vyvinuly způsoby, jakými mohou vápník-závislé odpovědi, jako je fagocytóza a produkce superoxidových radikálů makrofágy, ovlivňovat (Takei et al., 1998)(viz obrázek 2).

Nedávno bylo ukázáno (Groathouse et al., 2003), že divoký typ bakterie *Bordetella bronchiseptica* (s aktivním BvgAS systémem kontroly virulence, tzv. Bvg^+), nikoliv nevirulentní kmen (Bvg^-), dokáže po adhezi k explantátům z řasinkových epitelálních buněk průdušnice vyvolat změny v buněčné vápníkové signalizaci. Je však zatím nejasné, zdali změny ve vnitrobuněčné koncentraci vápenatých iontů byly vyvolány obrannými mechanismy napadené buňky (vedoucí ke zvýšené produkci mucínu, zvýšení pohybu řasinek a tím k odstranění bakterie), nebo byly výsledkem působení faktorů virulence bakterie (vedoucí naopak k redukci obranných mechanismů řasinkových buněk).

Jedním ze způsobů, jakým jsou schopny bakterie odolat profesionálním fagocytům je únik z fagozomu. Tuto schopnost ovládá například *Listeria monocytogenes*. Tato bakterie produkuje listeriolysin 0 (LL0) patřící k toxinům, které potřebují cholesterol-bohaté mikrodomény, aby se mohly správně vázat do membrány a oligomerizovat. *Listeria* napadá epitelální buňky, uniká z jejich fagozomů a replikuje se v buňce. Z recentních výsledků vyplývá, že v úniku z fagozomu hraje LL0 klíčovou roli. Tento toxin tvoří póry v membráně buňky, které se otevírají a zavírají a které vykazují malou iontovou specifitu (Repp et al., 2002). Tato

přechodná kanálotvorná aktivita umožňuje vstup Ca^{2+} do buňky, který vede k dlouho trvajícím Ca^{2+} oscilacím. LLO také způsobuje uvolnění vápníku z jeho zásobáren v buňce mobilizací vnitrobuněčných Ca^{2+} zásob v ER (Gekara et al., 2008). Přesný mechanismus této aktivace je zatím neznámý.

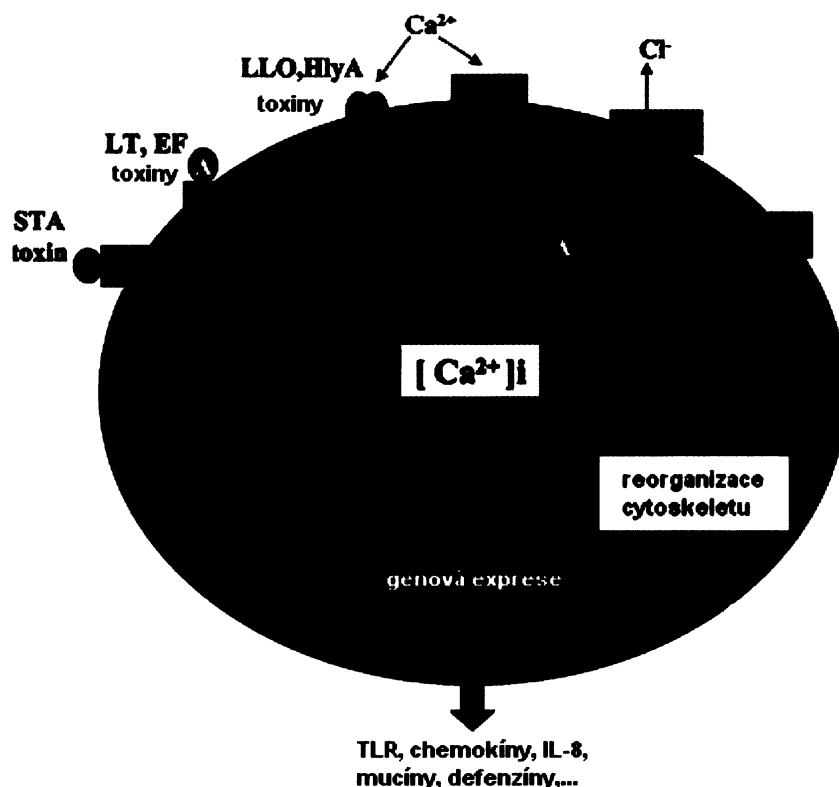
Dalším mechanismem pomáhajícím profesionálním fagocytům zabít pochlčené bakterie je syntéza oxidu dusného. Toto oxidativní vzplanutí je doprovázeno vzestupem cytozolického Ca^{2+} v neutrofilech a makrofázích (Denlinger et al., 1996; Chen et al., 1998; Wilsson et al., 1996). Obligátní vnitrobuněčné bakterie, které umí přežít a replikovat se v profesionálních fagocytech, vyvinuly způsob, jak tlumit oxidativní vzplanutí. Například *Mycobacterium tuberculosis* toho dosahuje zabráněním buněčné Ca^{2+} signalizace. Přesný mechanismus není zatím znám (Trimble and Grinstein, 2007).

Indukcí Ca^{2+} signalizace mohou také bakteriální toxiny indukovat expresi různých genů, jako například IL-6 nebo IL-8 cytokinů nebo mucínu (Berridge et al., 1998; Coconnier et al., 1998; Dolmetsch et al., 1997; Uhlen et al., 2000). Předpokládá se, že IL-8 produkovaný epiteliálními buňkami, funguje v časných fázích infekce jako hlavní chemická látka, přitahující profesionální fagocyty. Bakterie mohou vyvolat produkci IL-8 aktivací transkripčního faktoru $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ (McCormick et al., 1993).

Další skupinou toxinů, které ovlivňují Ca^{2+} signalizaci v buňce jsou toxiny s adenylát cyklázovou aktivitou. Například, edemogenní faktor z bakterie *Bacillus anthracis* je adenylát cykláza syntetizující cAMP z ATP v cytozolu buňky. Pro tuto přeměnu je nutný extracelulární Ca^{2+} (Kumar et al., 2002). Po vstupu edemogenní faktoru do buňky je vyvolán rychlý vstup Ca^{2+} do buňky, následovaný akumulací cAMP v buňkách. Dále bylo zjištěno, že vápenaté kationty pocházejí z extracelulárního prostředí a jejich vstup do cytozolu je nutný pro intoxikaci buněk cAMP. Autoři celý proces vysvětlují tím, že zvýšením vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} dochází k aktivaci eukaryotického kalmodulinu, který je klíčový pro aktivaci adenylát cyklázové aktivity toxinu (Kumar et al., 2002).

Dalším toxinem, vyvolávajícím změnu Ca^{2+} koncentrace v buňce je leukotoxin (Ltx) z bakterie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, patřící do skupin RTX toxinů. Po interakci s receptorem způsobí toxin uvolnění Ca^{2+} z vnitřních buněčných zásobáren. Toto zvýšení vnitrobuněčné koncentrace Ca^{2+} vede k aktivaci proteázy calpain, rozštěpení talinu (který kotví receptor k aktinovému cytoskeletu) a k mobilizaci komplexu toxin-integrin do cholesterol-bohatých oblastí plazmatické membrány - tzv. lipidových raftů (Fong et al., 2006). Změny v intracelulární koncentraci Ca^{2+} v buňce způsobuje i další člen RTX rodiny toxinů, α -hemolyzin z bakterie *Escherichia coli*, i když mechanismus, jakým toho dosahuje je nejasný.

Nejprve bylo ukázáno, že α -hemolysin umožňuje vstup vápníku do buňky pomocí L-typů vápníkových kanálů v kombinaci s IP_3 receptory, které se nacházejí na membráně ER (Uhlen et al., 2000). Nedávno však vyšla práce, která ukazuje, že α -hemolysin umožňuje vstup Ca^{2+} do cytoplasmu kationt-selektivním pórem tvořeným samotným toxinem (Koschinski et al., 2006).



Obrázek 2: Vápníková signalizace při interakci bakteriálních toxinů s epiteliálními buňkami.

Bakteriální toxiny mohou stimulovat zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů v buňkách různými cestami. Vápníková signalizace indukovaná bakteriálními patogeny pak může vést například k reorganizaci cytoskeletu nebo může aktivovat genovou expresi (přes transkripční faktor $NF-\kappa B$), vedoucí k expresi TLR, nebo sekreci pro-zánětlivých a anti-bakteriálních genových produktů.

TLR - „Toll-like“ receptory - buněčné receptory rozpoznávající prokaryotní struktury (např. lipopolysacharidy, lipoproteiny, peptidoglykan atd.), STA - tepelně stabilní enterotoxin A (z enteropatogenní *Escherichia coli*), EF - edemogenní faktor (z bakterie *Bacillus anthracis*), LLO - listeriolysin (z bakterie *Listeria monocytogenes*), HlyA-hemolysin (z uropatogenní *Escherichia coli*), GC-C - guanylyl cykláza, CFTR - „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels“, IP_3 - inositol 1,4,5 trisfosfát, SOC - endogenní vápníkové kanály, tzv. „store-operated channels“. Převzato z (TranVan Nhieue et al., 2004).

K toxinům schopným zvyšovat vnitrobuněčnou koncentraci Ca^{2+} v cílové buňce patří i adenylát cyklázový toxin (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*. Tento toxin se váže na integrin CD11b/CD18 na cílových buňkách a následně translokuje adenylát cyklázovou (AC) doménu do cytozolu, což je doprovázeno masivním vstupem Ca^{2+} do buňky. Poměrně překvapivě bylo ukázáno že vstup vápníku je zapříčiněn translokací samotné AC domény, nikoli kation selektivním pórem, který toxin vytváří v cílové membráně (Fiser et al., 2007). Po vstupu Ca^{2+} do buňky účinkem CyaA se aktivuje podobně jako u Ltx toxinu z bakterie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* proteáza calpain, která štěpí protein talin. To vede k tomu, že se následně celý komplex toxin-integrin přesouvá do lipidových domén (Bumba, nepublikováno). Další kapitola podrobně pojednává o adenylát cyklázovém toxinu.

4) Adenylát cyklázový toxin

4.1) Bakterie *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis patří ke gram-negativním bakteriím. Je striktně lidský patogen a způsobuje respirační onemocnění horních cest dýchacích, které se nazývá černý (nebo také dávivý) kašel.

Infekce se přenáší aerosolem nebo přímým kontaktem. V prvním stadiu onemocnění dochází ke kolonizaci epitelu horních cest dýchacích, poté dochází k pomnožení bakterie provázené produkcí toxinů, což způsobuje odumírání řasinkového epitele. V tomto stadiu je nemoc dobře léčitelná antibiotiky. V další fázi dochází k záchvatům kašle, nadměrné produkci hlenu, zvracení a křečím. Poslední fáze je bezpříznaková, v plicích se již nevyskytují živé bakterie. Neléčená infekce může u kojenců a batolat vést k udušení vlastním hlenem (Anderson, 1989).

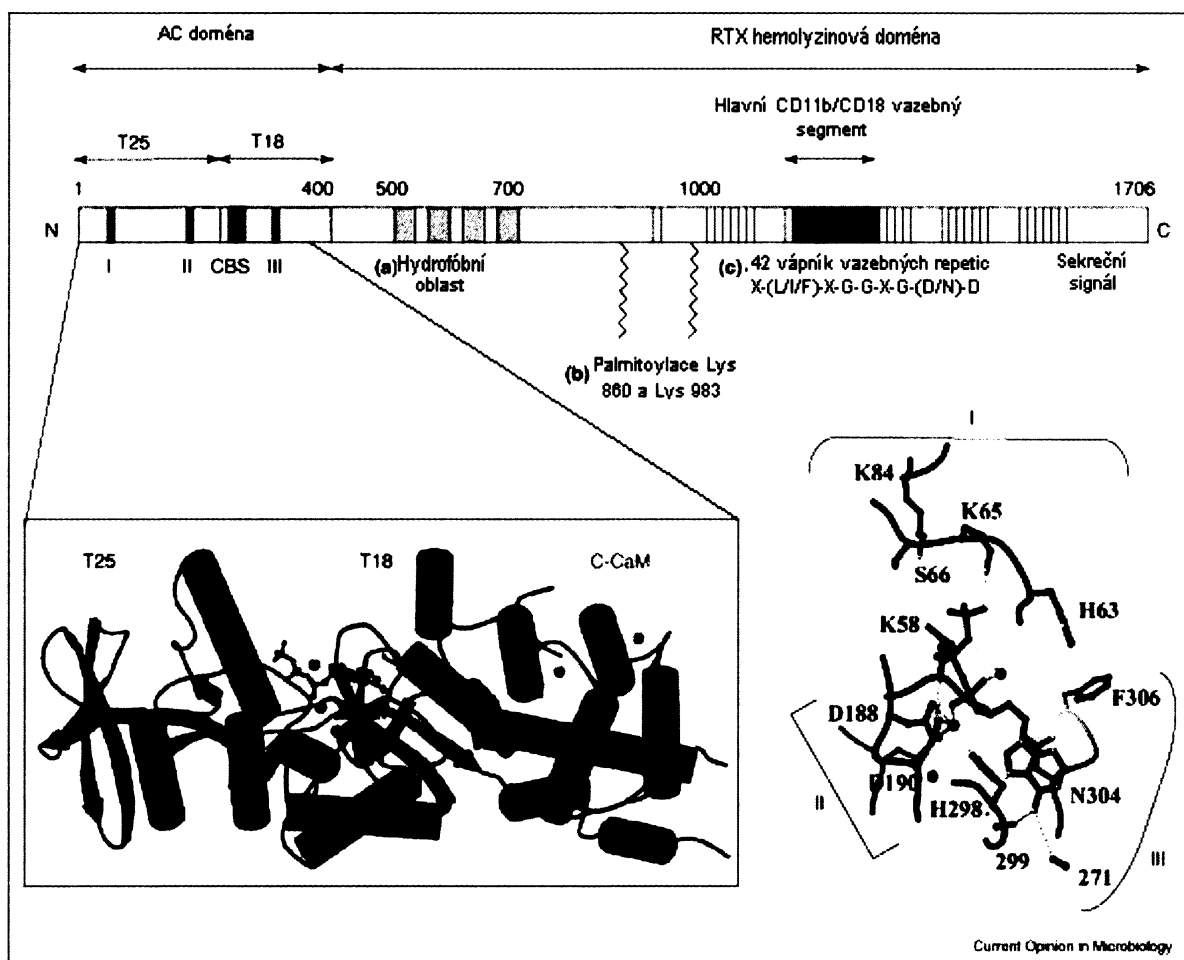
Bordetella produkuje celou řadu faktorů virulence, které jí umožňují vstupovat do organismu, interagovat s cílovými buňkami, čelit imunitní obraně hostitele, případně umožňují pomnožení bakterie v hostiteli. Tyto faktory virulence lze rozdělit na adheziny a toxiny. Mezi adheziny patří filamentózní hemaglutinin, umožňující bakterii adhezi k buňkám respiračního epitelu a pertusový toxin, který má funkci adhezinu i toxinu a který napomáhá vazbě bakterie na povrch řasinkových a fagocytujících buněk (Weiss and Hewlett, 1986). Dalšími faktory virulence jsou fimbrie, pertaktin a tracheální kolonizační faktor (Weiss and Hewlett, 1986). Toxiny bakterie jsou známy čtyři: dermonekrotický, tracheální, pertusový a adenylát cyklázový.

Adenylát cyklázový toxin (ACT, AC-Hly nebo CyaA) patří do rodiny tzv. RTX toxinů/hemolyzinů (podle názvu Repeats in ToXin). Byl objeven roku 1975 Hewlitem a spolupracovníky (Hewlett and Wolff, 1976). Hraje klíčovou roli ve virulenci bakterie (Weiss et al., 1984). Adenylát cyklázový toxin nemusí být během růstu bakterie aktivně uvolňován do okolního prostředí, ale může být vázán na povrch bakterie pomocí filamentózního hemaglutininu (Zaretzky et al., 2002). Tyto výsledky mohou naznačovat, že by se toxin mohl uplatňovat až při přímém kontaktu povrchu bakteriální buňky s cílovými buňkami. Další práce ukazuje (Gray et al., 2004), že pouze nově produkovaný toxin, nikoliv toxin dlouhodobě vázaný na povrch bakterie, je schopen intoxikovat buňky cAMP.

4.2) Struktura CyaA

Gen pro produkci CyaA leží v tzv. *cya* lokusu. Je zde gen pro protoxin *cyaA* a další tři strukturální geny *cyaBDE*, nutné pro sekreci CyaA (Glaser et al., 1988). Gen *cyaC* je přepisován v opačném směru než *cyaA* a produkt tohoto genu zprostředkovává posttranslační modifikaci protoxinu zbytkem mastné kyseliny (Barry et al., 1991).

CyaA má 1706 aminokyselinových zbytků (viz obrázek 3). Skládá se z N-koncové AC (adenylát cyklázové) domény (s přibližně 400 aminokyselinovými zbytky), a z tzv. RTX hemolyzinové (Hly) domény s přibližně 1306 aminokyselinovými zbytky s C-koncovým sekrečním signálem (Masure et al., 1990; Sebo and Ladant, 1993). Hly doména je funkčně nezávislá a tvoří kation-selektivní kanály o průměru 0.6 - 0.8 nm (Benz et al., 1994; Sakamoto et al., 1992). Permeabilizuje membránu cílové buňky a způsobuje koloidně-osmotickou lyzi erytrocytů (Weiss et al., 1984). V porovnání s ostatními RTX toxiny je hemolytická aktivita CyaA malá (Bellalou et al., 1990) a hlavní funkcí Hly domény je pravděpodobně doprava AC domény do buňky (Rogel and Hanski, 1992). Hly doména se skládá z několika subdomén (Iwaki et al., 1995; Rose et al., 1995). Hydrofóbní, kanálotvorná doména CyaA je tvořena aminokyselinovými zbytky 500 - 800 (Benz et al., 1994). Acylační doména toxinu se dvěma lyzinovými zbytky (lyzinové zbytky v pozicích 860 a 983) se nachází mezi aminokyselinovými zbytky 800 - 1000. C-koncovou část tvoří vápník-vazebná doména s typickými, na glycin a aspartát bohatými nonapeptidovými sekvencemi typu X-(L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D, které tvoří přibližně 40 vazebných míst pro vápenaté ionty (Rhodes et al., 2001; Rose et al., 1995).



Obrázek 3: Schematické znázornění CyaA

CyaA je protein, složený ze 1706 aminokyselinových zbytků. Skládá se z RTX hemolyzinové domény a z invazivní adenylát cyklázové (AC) domény. AC doména po translokaci do buňky váže buněčný kalmodulin. Na obrázku je vidět krystalová struktura AC domény s C-terminálním úsekem kalmodulinu v komplexu s analogem ATP (adefovir difosfát). Vpravo dole je pak vidět detailní obrázek katalytického místa. Černá struktura na obou spodních obrázcích je adefovir difosfát. Převzato z (Guo et al., 2005).

Po vazbě toxinu na cílovou buňku se translokuje AC doména do buňky a je aktivována kalmodulinem, se kterým se váže v poměru 1:1 a jeho vazba zvyšuje přibližně o tři řády adenylát cyklázovou aktivitu toxinu (Glaser et al., 1989; Ladant, 1988). AC doména se dělí na dvě části: T25 katalytickou doménu, která ležící mezi aminokyselinovými zbytky 1-224 a kalmodulin vazebnou doménu T18, která se nachází mezi zbytky 225-399 (Glaser et al., 1989; Ladant et al., 1989). Nedávno byla určena krystalová struktura AC domény s C-koncovým úsekem kalmodulinu (Guo et al., 2005). Ta pomohla k objasnění vysoké katalytické aktivity AC a k odhalení kalmodulin-vazebných míst v AC doméně toxinu s tím, že Trp 242 a jeho okolí bylo určeno jako zásadní v kontaktu AC domény a hydrofóbní oblastí kalmodulinu

(Guo et al., 2005). Z toho vyplývá, že pro interakci mezi AC doménou a kalmodulinem je důležitější více sekundární, než primární struktura (Bouhss et al., 1993). Zdá se ale, že AC se váže na kalmodulin více místy. 71 aminokyselinových zbytků dlouhý úsek mezi zbytky 196 a 267, zahrnující tudíž část T25 i T18 domény, je zodpovědný za 90% vazby mezi kalmodulinem a AC (Bouhss et al., 1993). Bylo také ukázáno, že vazebné místo pro komplex ATP-Mg²⁺ je na Asp188 a Asp190 (Glaser et al., 1991).

Stejně jako u ostatních RTX toxinů závisí schopnost CyaA vázat se na cílové buňky na jeho aktivaci pomocí posttranslační modifikace (Rogel et al., 1989). Touto modifikací je palmitoylace ε-amino skupiny lyzinových zbytků (lyziny 860 a 983) v RTX doméně CyaA (Hackett et al., 1994; Hackett et al., 1995). Tato aktivace je zprostředkována acyltransferázou CyaC (Barry et al., 1991; Sebo et al., 1991). Tato acyltransferáza je produkována spolu s CyaA a používá acyl-ACP (acyl-acyl carrier protein) jako donor mastných kyselin (Barry et al., 1991; Hackett et al., 1994; Sebo et al., 1991; Stanley et al., 1998).

Acylace je nutná pro interakci CyaA s receptorem (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003). Přispívá také pravděpodobně k protein-proteinové interakci mezi jednotlivými toxiny a tím k oligomerizaci a ke schopnosti toxinu tvořit kanály (Benz et al., 1994; Hackett et al., 1995; Havlicek et al., 2001). Navíc, lyzin 983 pravděpodobně hraje také strukturální úlohu, neboť aminokyselinová záměna lyzinu 983 za opačně nabitou nebo nenabitou aminokyselinu výrazně snižuje selektivitu CyaA kanálu (Masin et al., 2005). To naznačuje, že lyzin 983 by se mohl nacházet v ústí kationt-selektivního kanálu nebo přímo v něm. Odstranění acylace na lyzinu 860 nebo 983, ovlivňuje různým způsobem vlastnosti toxinu na různých typech buněk (Masin et al., 2005). Bylo ukázáno, že acylace pouze na lyzinu 860 nebo jen lyzinu 983 stačí k plné cytotoxické aktivitě CyaA na makrofázích (Masin et al., 2005).

Bylo ukázáno, že toxin produkovaný v *B. pertussis* (Bp-CyaA) je acylovaný pouze na lyzinu 983 (Hackett et al., 1994). Rekombinantní (r-CyaA) toxin, produkovaný v *E. coli*, je ovšem acylovaný ještě na lyzinu 860 (Havlicek et al., 2001).

CyaA potřebuje pro vazbu na CD11b/CD18 na myeloidních buňkách vápenaté ionty (Guermonprez et al., 2001) a pro svou aktivitu musí být vystaven fyziologické (>0,3mM) koncentraci volných vápenatých iontů (Hanski and Farfel, 1985; Hewlett et al., 1991).

CyaA má asi 40 vazebných míst pro vápenaté ionty. Z toho 3 až 5 má vysokou afinitu k vápenatým iontům a váží je prakticky ireversibilně. Ty umožňují interakci s membránou a hemolytickou aktivitu na erythrocytech (Rogel and Hanski, 1992; Rose et al., 1995). Ostatní vápník-vazebná místa váží vápenaté ionty s nízkou afinitou a nacházejí se v nonapeptidových sekvencích v C-koncové části CyaA (Rhodes et al., 2001; Rose et al., 1995). Vazba

vápenatých iontů vyvolá velké konformační změny v molekule CyaA, které jsou potřeba pro translokaci AC domény i pro kanálotvornou aktivitu (Hewlett et al., 1991).

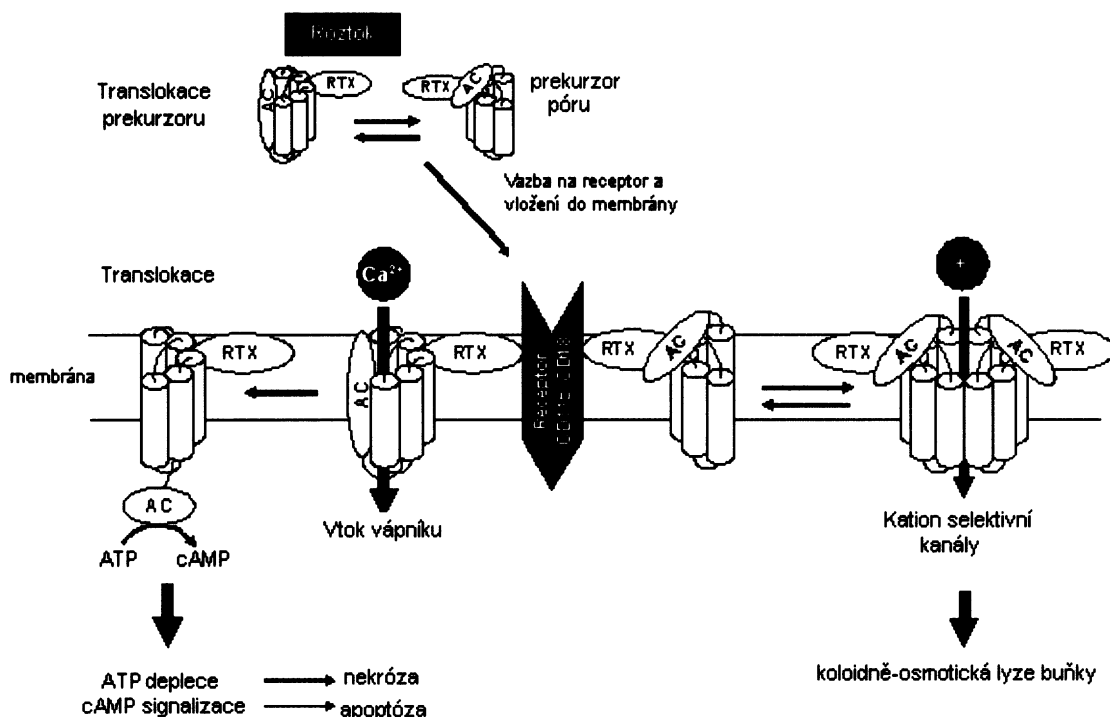
Hlavními cílovými buňkami CyaA jsou pravděpodobně myeloidní fagocytické buňky jako neutrofil, makrofág nebo dendritická buňka. Tyto buňky mají na svém povrchu $\alpha_M\beta_2$ integrin (CD11b/CD18, Mac-1), který slouží jako receptor pro CyaA (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003; Guermonprez et al., 2001). Pro vazbu CyaA na receptor a pro následnou účinnou intoxikaci buněk cAMP je nezbytná glykozylace integrinu CD11b/CD18 (Morova et al., 2008). CyaA se ale může interagovat s širokým spektrem buněk, které receptor CD11b/CD18 nemají, jako například beraní erytrocyty (Bellalou et al., 1990; Hanski, 1989).

4.3) Mechanismus účinku CyaA

Adenylát cyklázový toxin existuje v roztoku nejspíše ve dvou konformacích (viz obrázek 4). Na základě této konformace dochází buď k translokaci AC-domény přes cytoplazmatickou membránu nebo k tvorbě kation selektivního kanálu po oligomerizaci dvou nebo více kanálotvorných prekurzorů. Obě konformace interagují s CD11b/CD18 receptorem na membráně cílové buňky, který usnadňuje a podporuje inzerci toxinu do lipidové dvojvrstvy.

CyaA má unikátní schopnost pronikat do cytoplazmy cílové buňky bez receptorem-zprostředkované endocytózy, a to pomocí translokace invazivní AC domény. Vyplývá to z toho, že CyaA působí i na savčí erytrocyty, které nejsou schopny endocytotických procesů (Bellalou et al., 1990; Hanski, 1989; Rogel et al., 1991). Dále bylo také ukázáno, že známé inhibitory endocytózy způsobují pouze zabránění endozomální degradace toxinu, nikoliv však intracelulární akumulaci cAMP (Gordon et al., 1988; Guermonprez et al., 1999).

Mechanismus translokace AC domény je zatím neznámý. Předpokládá se však, že v translokaci AC domény přes membránu hrají úlohu Glu zbytky v hydrofóbní doméně toxinu (Basler et al., 2007; Osickova et al., 1999). Translokace CyaA přes cytoplazmatickou membránu je poháněna membránovým potenciálem (Otero et al., 1995). Přesto k nekontrolovatelné přeměně ATP na cAMP dochází i u savčích erytrocytů, které mají nízký membránový potenciál (Bellalou et al., 1990; Rogel et al., 1991). Původně se předpokládalo, že by AC doména mohla procházet do buňky kanálem tvořeným toxinem. Později se ukázalo, že tento hemolyzinový kanál má průměr pouze 0,6 - 0,8 nm a tudíž by jím neprošla ani plně denaturovaná AC doména (Benz et al., 1994).



Obrázek 4: Schéma interakce CyaA s membránou

V roztoku se CyaA vyskytuje ve dvou konformacích. Obě se váží na CD11b/CD18 integrin, který je receptorem CyaA. První konformací je tzv. prekurzor translokace, který po inserci do membrány translokuje AC doménu a umožňuje vstup vápenatých iontů do buňky. AC doména je po navázání kalmodulinu schopna katalyzovat nekontrolovatelnou přeměnu buněčného ATP na cAMP. Nadměrná produkce cAMP, případně ATP deplece mohou vést ke smrti buňky. Druhý prekurzor CyaA pravděpodobně v membráně oligomerizuje a tvoří kationselektivní kanál, který způsobuje koloidně-osmotickou lyzi buňky.

Druhou vlastností CyaA je tvorba kationselektivních porů v membráně erytrocytů po oligomerizaci alespoň dvou kanálotvorných prekurzorů (Vojová, nepublikováno). V hydrofóbní doméně byly predikovány 2 α -helikální segmenty, zahrnující negativně nabitě glutamátové zbytky 509, 516, 570 a 581, které ovlivňují frekvenci tvorby kanálů, kationselektivitu a velikost kanálu (Basler et al., 2007; Osickova et al., 1999). Spekuluje se, že by transmembránové α -helixy toxinu mohly vytvářet strukturu, umožňující AC doméně translokaci přes hydrofóbní oblast membrány (Basler et al., 2007; Osickova et al., 1999). Translokaci AC domény lze zablokovat nízkou teplotou nebo vyvázáním vápenatých iontů z extracelulárního prostředí (Rogel and Hanski, 1992; Rose et al., 1995).

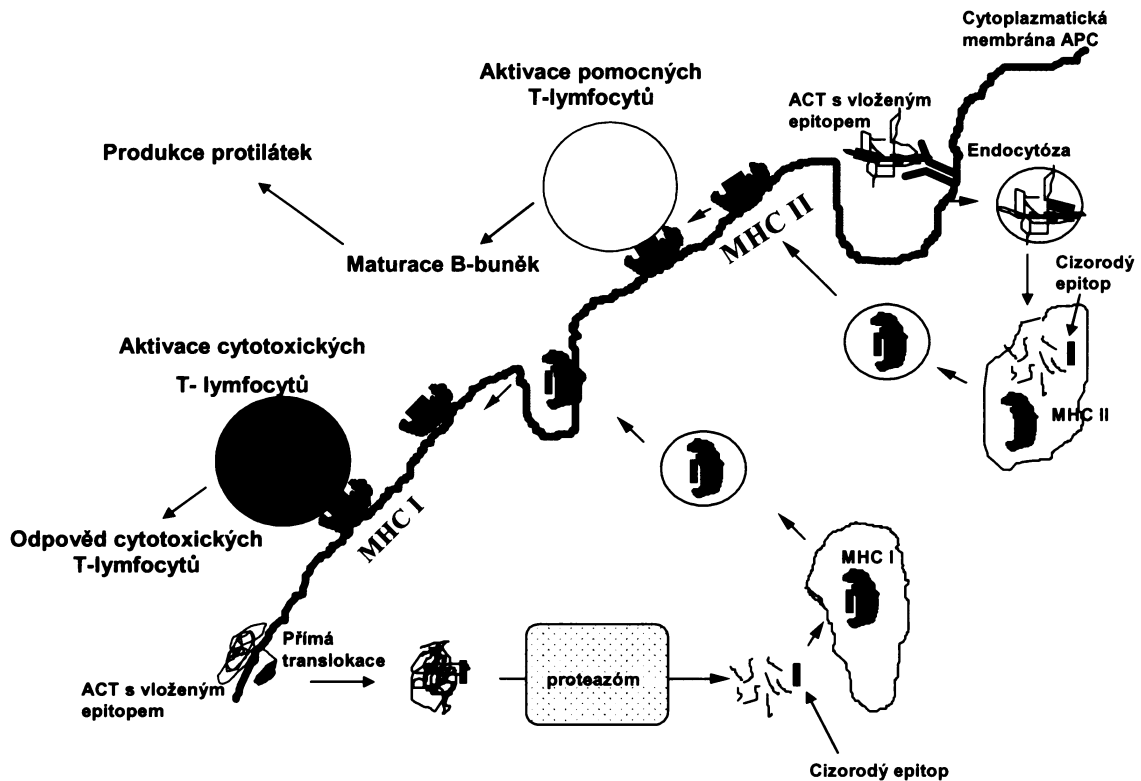
4.4) Vliv toxinu na buňky

Po navázání CyaA na buňku a následné translokaci AC-domény do cytoplazmy, katalyzuje CyaA velmi rychlou a nekontrolovatelnou přeměnu intracelulárního ATP na cAMP. Tato přeměna vede při nízkých koncentracích toxinu k cAMP signalizaci (Kamanova, nepublikováno), nebo při vysokých koncentracích toxinu k rychlému spotřebování ATP. Spotřebování ATP má za následek nekrózu buňky (Basler et al., 2006). Tato enzymatická aktivita toxinu také způsobuje, že fagocyty po účinku toxinu ztrácejí své baktericidní schopnosti, jako chemotaxe, fagocytóza a produkce superoxidových radikálů, u makrofágů může účinek toxinu vést k apoptóze (Confer and Eaton, 1982; Friedman et al., 1987; Hewlett and Wolff, 1976; Hewlett et al., 1976; Khelef and Guiso, 1995; Khelef et al., 1993; Ladant and Ullmann, 1999; Njamkepo et al., 2000; Pearson et al., 1987; Weingart and Weiss, 2000). CyaA také může způsobovat koloidně-osmotickou lyzi erytrocytů tvorbou kation selektivních kanálů. Na CD11b⁺ buňkách je navíc translokace AC domény doprovázena vstupem Ca²⁺ do buněk. Vstup Ca²⁺ závisí na správné struktuře AC domény a ne na translokaci peptidu jako takového (Fiser et al., 2007).

4.5) Doprava antigenů do antigen prezentujících buněk

Geneticky detoxifikovaný CyaA je schopen vazby na profesionální antigen-prezentující buňky, které mají v membráně receptor CD11b/CD18. Tyto buňky jsou schopné prezentovat cizorodé antigeny a následně jsou schopné aktivovat T-buněčnou odpověď proti příslušnému antigenu (viz obrázek 5). CyaA by se díky schopnosti vazby na antigen-prezentující buňky mohl stát v budoucnu vhodným nástrojem pro dopravu cizorodých antigenů a tím vhodným nástrojem pro aktivaci obrany proti virům a nádorům nebo intracelulárním parazitům (El Azami El Idrissi et al., 2002; Fayolle et al., 1999; Simsova et al., 2004). Výhodou CyaA je, že dokáže do buňky dopravit až 200 aminokyselinových zbytků dlouhý polypeptid, bez ztráty invazivity (Gmira et al., 2001). Fragmenty těchto peptidů pak jsou vystaveny MHC (Major Histocompatibility Complex) glykoproteiny I. třídy na povrchu buňky, kde mohou indukovat specifickou CD8⁺ imunitní odpověď T-lymfocytů (Guermontprez et al., 1999; Osicka et al., 2000; Sebo et al., 1995). Po endocytóze toxinu ale mohou být cizorodé epitopy vystavovány i na MHC glykoproteinech II. třídy, což vede k aktivaci CD4⁺ T-lymfocytů (Loucka et al., 2002; Schlecht et al., 2004). Nedávno bylo také ukázáno, že CyaA může současně dopravovat do dendritických buněk jak CD8⁺ T-buněčný epitop, tak CD4⁺ T-buněčný epitop, pokud jsou oba epitopy vloženy do jedné molekuly CyaA (Loucka et al., 2002). Schopnost vyvolávat současně prezentaci epitopů na MHC molekulách I. a II. třídy pomocí cyklázového toxinu se

tedy využít současně pro indukci specifické $CD8^+$ a $CD4^+$ T-buněčné odpovědi, což je důležité pro eliminaci některých nádorů a virových infekcí (El Azami El Idrissi et al., 2002).



Obrázek 5: Doprava antigenů do antigen prezentující buňky pomocí CyaA

CyaA se váže na antigen-prezentující buňky. Po interakci s buňkou může prezentovat cizorodý antigen dvěma různými mechanismy. Jedním je translokace AC domény s vloženým epitopem. Po translokaci je AC doména proteolyticky degradována v proteazómu a poté je pomocí peptidových pump transportována do endoplazmatického retikula, kde asociuje s MHC I molekulami. Poté jsou MHC I s navázaným epitopem vystaveny na povrchu buňky, kde aktivují $CD8^+$ T-lymfocyty. Druhým způsobem dopravy cizorodých antigenů pomocí CyaA do buňky je receptorem zprostředkovanou endocytózou. Endozóm s CyaA fúzuje s váčkem odštěpeným od Golgiho aparátu, který obsahuje MHC II. MHC II s navázaným epitopem je poté vystaven na povrchu buňky a aktivuje $CD4^+$ T-buněčnou odpověď.

5) Závěr

V této práci byl nastíněn problém vápníkové signalizace v buňce, případně jak mohou vápníkovou signalizaci ovlivňovat bakterie a bakteriální toxiny. Dále byl důraz kladen především na adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*. V naší laboratoři bylo ukázáno, že tento toxin indukuje vstup Ca^{2+} iontů do buňky při translokaci AC domény přes membránu. Ve své budoucí diplomové práci bych se chtěla této problematice dále věnovat a pokusit se mimo jiné pomocí mutantních forem toxinu podrobně zmapovat úseky v AC a hydrofóbní doméně toxinu, které se podílejí na toxinem-indukovaném toku vápenatých iontů přes membránu.

6.) Použitá literatura

- Anderson, E.L. 1989. Prevention of pertussis. *Semin Respir Infect.* 4:284-92.
- Barritt, G.J. 1999. Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem J.* 337 (Pt 2):153-69.
- Barry, E.M., A.A. Weiss, I.E. Ehrmann, M.C. Gray, E.L. Hewlett, and M.S. Goodwin. 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J Bacteriol.* 173:720-6.
- Basler, M., O. Knapp, J. Masin, R. Fiser, E. Maier, R. Benz, P. Sebo, and R. Osicka. 2007. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem.* 282:12419-29.
- Basler, M., J. Masin, R. Osicka, and P. Sebo. 2006. Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infect Immun.* 74:2207-14.
- Bellalou, J., H. Sakamoto, D. Ladant, C. Geoffroy, and A. Ullmann. 1990. Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun.* 58:3242-7.
- Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann, and P. Sebo. 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.* 269:27231-9.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman, and P. Lipp. 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature.* 395:645-8.
- Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:11-21.
- Bootman, M.D., M.J. Berridge, and H.L. Roderick. 2002. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol.* 12:R563-5.
- Bouhss, A., E. Krin, H. Munier, A.M. Gilles, A. Danchin, P. Glaser, and O. Barzu. 1993. Cooperative phenomena in binding and activation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by calmodulin. *J Biol Chem.* 268:1690-4.
- Brini, M. 2003. Ca²⁺ signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium.* 34:399-405.
- Brown, M.S., and J.L. Goldstein. 1999. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:11041-8.
- Coconnier, M.H., E. Dlissi, M. Robard, C.L. Labois, J.L. Gaillard, and A.L. Servin. 1998. *Listeria monocytogenes* stimulates mucus exocytosis in cultured human polarized mucosecreting intestinal cells through action of listeriolysin O. *Infect Immun.* 66:3673-81.
- Confer, D.L., and J.W. Eaton. 1982. Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase. *Science.* 217:948-50.

- Denlinger, L.C., P.L. Fiset, K.A. Garis, G. Kwon, A. Vazquez-Torres, A.D. Simon, B. Nguyen, R.A. Proctor, P.J. Bertics, and J.A. Corbett. 1996. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem.* 271:337-42.
- Dirksen, E.R., and M.J. Sanderson. 1990. Regulation of ciliary activity in the mammalian respiratory tract. *Biorheology.* 27:533-45.
- Dolmetsch, R.E., R.S. Lewis, C.C. Goodnow, and J.I. Healy. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 386:855-8.
- Duchen, M.R. 1999. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 516 (Pt 1):1-17.
- El Azami El Idrissi, M., D. Ladant, and C. Leclerc. 2002. The adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: a vector to target antigen presenting cells. *Toxicon.* 40:1661-5.
- El-Azami-El-Idrissi, M., C. Bauche, J. Loucka, R. Osicka, P. Sebo, D. Ladant, and C. Leclerc. 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.* 278:38514-21.
- Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol.* 162:4157-62.
- Ferri, K.F., and G. Kroemer. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol.* 3:E255-63.
- Fiser, R., J. Masin, M. Basler, J. Krusek, V. Spulakova, I. Konopasek, and P. Sebo. 2007. Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* 282:2808-20.
- Fong, K.P., C.M. Pacheco, L.L. Otis, S. Baranwal, I.R. Kieba, G. Harrison, E.V. Hersh, K. Boesze-Battaglia, and E.T. Lally. 2006. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin requires lipid microdomains for target cell cytotoxicity. *Cell Microbiol.* 8:1753-67.
- Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, C. Borner, W.L. Kelley, J. Tschopp, D.P. Lew, N. Demarex, and K.H. Krause. 2000. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:5723-8.
- Friedman, R.L., R.L. Fiederlein, L. Glasser, and J.N. Galgiani. 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Infect Immun.* 55:135-40.
- Gekara, N.O., L. Groebe, N. Viegas, and S. Weiss. 2008. *Listeria monocytogenes* desensitizes immune cells to subsequent Ca²⁺ signaling via listeriolysin O-induced depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Infect Immun.* 76:857-62.

- Glaser, P., A. Danchin, D. Ladant, O. Barzu, and A. Ullmann. 1988. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein. *Tokai J Exp Clin Med.* 13 Suppl:239-52.
- Glaser, P., A. Elmaoglou-Lazaridou, E. Krin, D. Ladant, O. Barzu, and A. Danchin. 1989. Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis. *Embo J.* 8:967-72.
- Glaser, P., H. Munier, A.M. Gilles, E. Krin, T. Porumb, O. Barzu, R. Sarfati, C. Pellecuer, and A. Danchin. 1991. Functional consequences of single amino acid substitutions in calmodulin-activated adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Embo J.* 10:1683-8.
- Gmira, S., G. Karimova, and D. Ladant. 2001. Characterization of recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. *Res Microbiol.* 152:889-900.
- Gordon, V.M., S.H. Leppla, and E.L. Hewlett. 1988. Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase toxin but not that of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Infect Immun.* 56:1066-9.
- Gorelick, F.S., and C. Shugrue. 2001. Exiting the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Endocrinol.* 177:13-8.
- Gray, M.C., G.M. Donato, F.R. Jones, T. Kim, and E.L. Hewlett. 2004. Newly secreted adenylate cyclase toxin is responsible for intoxication of target cells by *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* 53:1709-19.
- Groathouse, N.A., R.A. Heinzen, and S. Boitano. 2003. Functional BvgAS virulence control system in *Bordetella bronchiseptica* is necessary for induction of Ca²⁺ transients in ciliated tracheal epithelial cells. *Infect Immun.* 71:7208-10.
- Guermontprez, 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.* 193:1035-44.
- Guermontprez, 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.* 162:1910-6.
- Guo, Q., Y. Shen, Y.S. Lee, C.S. Gibbs, M. Mrksich, and W.J. Tang. 2005. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *Embo J.* 24:3190-201.
- Hackett, M., L. Guo, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, and E.L. Hewlett. 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science.* 266:433-5.
- Hackett, M., C.B. Walker, L. Guo, M.C. Gray, S. Van Cuyk, A. Ullmann, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, E.L. Hewlett, and P. Sebo. 1995. Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 270:20250-3.

- Hanski, E. 1989. Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends Biochem Sci.* 14:459-63.
- Hanski, E., and Z. Farfel. 1985. *Bordetella pertussis* invasive adenylate cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration. *J Biol Chem.* 260:5526-32.
- Havlicek, V., L. Higgins, W. Chen, P. Halada, P. Sebo, H. Sakamoto, and M. Hackett. 2001. Mass spectrometric analysis of recombinant adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* strain 18323/pHSP9. *J Mass Spectrom.* 36:384-91.
- Hewlett, E., and J. Wolff. 1976. Soluble adenylate cyclase from the culture medium of *Bordetella pertussis*: purification and characterization. *J Bacteriol.* 127:890-8.
- Hewlett, E.L., L. Gray, M. Allietta, I. Ehrmann, V.M. Gordon, and M.C. Gray. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity. *J Biol Chem.* 266:17503-8.
- Hewlett, E.L., M.A. Urban, C.R. Manclark, and J. Wolff. 1976. Extracytoplasmic adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:1926-30.
- Chen, B.C., C.F. Chou, and W.W. Lin. 1998. Pyrimidinoceptor-mediated potentiation of inducible nitric-oxide synthase induction in J774 macrophages. Role of intracellular calcium. *J Biol Chem.* 273:29754-63.
- Ichas, F., L.S. Jouaville, and J.P. Mazat. 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 89:1145-53.
- Iwaki, M., A. Ullmann, and P. Sebo. 1995. Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *Mol Microbiol.* 17:1015-24.
- Kaufman, R.J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13:1211-33.
- Khelef, N., and N. Guiso. 1995. Induction of macrophage apoptosis by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-hemolysin. *FEMS Microbiol Lett.* 134:27-32.
- Khelef, N., A. Zychlinsky, and N. Guiso. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun.* 61:4064-71.
- Koschinski, A., H. Repp, B. Unver, F. Dreyer, D. Brockmeier, A. Valeva, S. Bhakdi, and I. Walev. 2006. Why *Escherichia coli* alpha-hemolysin induces calcium oscillations in mammalian cells--the pore is on its own. *Faseb J.* 20:973-5.
- Kumar, P., N. Ahuja, and R. Bhatnagar. 2002. *Anthrax edema* toxin requires influx of calcium for inducing cyclic AMP toxicity in target cells. *Infect Immun.* 70:4997-5007.
- Ladant, D. 1988. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with calmodulin. Identification of two separated calmodulin-binding domains. *J Biol Chem.* 263:2612-8.

- Ladant, D., S. Michelson, R. Sarfati, A.M. Gilles, R. Predeleanu, and O. Barzu. 1989. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *J Biol Chem.* 264:4015-20.
- Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.* 7:172-6.
- Loucka, J., G. Schlecht, J. Vodolanova, C. Leclerc, and P. Sebo. 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.* 70:1002-5.
- Masin, J., M. Basler, O. Knapp, M. El-Azami-El-Idrissi, E. Maier, I. Konopasek, R. Benz, C. Leclerc, and P. Sebo. 2005. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry.* 44:12759-66.
- Masure, H.R., D.C. Au, M.K. Gross, M.G. Donovan, and D.R. Storm. 1990. Secretion of the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase from *Escherichia coli* containing the hemolysin operon. *Biochemistry.* 29:140-5.
- McCormick, B.A., S.P. Colgan, C. Delp-Archer, S.I. Miller, and J.L. Madara. 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol.* 123:895-907.
- Morova, J., R. Osicka, J. Masin, and P. Sebo. 2008. RTX cytotoxins recognize β_2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
- Njamkepo, E., F. Pinot, D. Francois, N. Guiso, B.S. Polla, and M. Bachelet. 2000. Adaptive responses of human monocytes infected by *Bordetella pertussis*: the role of adenylate cyclase hemolysin. *J Cell Physiol.* 183:91-9.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, and P. Nicotera. 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:552-65.
- Osicka, R., A. Osickova, T. Basar, P. Guermonprez, M. Rojas, C. Leclerc, and P. Sebo. 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.* 68:247-56.
- Osickova, A., R. Osicka, E. Maier, R. Benz, and P. Sebo. 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.* 274:37644-50.
- Otero, A.S., X.B. Yi, M.C. Gray, G. Szabo, and E.L. Hewlett. 1995. Membrane depolarization prevents cell invasion by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Biol Chem.* 270:9695-7.
- Parekh, A.B., and J.W. Putney, Jr. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85:757-810.

- Pearson, R.D., P. Symes, M. Conboy, A.A. Weiss, and E.L. Hewlett. 1987. Inhibition of monocyte oxidative responses by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. *J Immunol.* 139:2749-54.
- Pinton, P., D. Ferrari, P. Magalhaes, K. Schulze-Osthoff, F. Di Virgilio, T. Pozzan, and R. Rizzuto. 2000. Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol.* 148:857-62.
- Repp, H., Z. Pamukci, A. Koschinski, E. Domann, A. Darji, J. Birringer, D. Brockmeier, T. Chakraborty, and F. Dreyer. 2002. Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca2+-permeable pores leading to intracellular Ca2+ oscillations. *Cell Microbiol.* 4:483-91.
- Rhodes, C.R., M.C. Gray, J.M. Watson, T.L. Muratore, S.B. Kim, E.L. Hewlett, and C.M. Grisham. 2001. Structural consequences of divalent metal binding by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Arch Biochem Biophys.* 395:169-76.
- Roderick, H.L., and M.D. Bootman. 2003. Bi-directional signalling from the InsP3 receptor: regulation by calcium and accessory factors. *Biochem Soc Trans.* 31:950-3.
- Rogel, A., and E. Hanski. 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.* 267:22599-605.
- Rogel, A., R. Meller, and E. Hanski. 1991. Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis. *J Biol Chem.* 266:3154-61.
- Rogel, A., J.E. Schultz, R.M. Brownlie, J.G. Coote, R. Parton, and E. Hanski. 1989. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: purification and characterization of the toxic form of the enzyme. *Embo J.* 8:2755-60.
- Rose, T., P. Sebo, J. Bellalou, and D. Ladant. 1995. Interaction of calcium with *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium-induced conformational changes. *J Biol Chem.* 270:26370-6.
- Sakamoto, H., J. Bellalou, P. Sebo, and D. Ladant. 1992. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *J Biol Chem.* 267:13598-602.
- Sebo, 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+ cytotoxic T cells. *Infect Immun.* 63:3851-7.
- Sebo, P., P. Glaser, H. Sakamoto, and A. Ullmann. 1991. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene.* 104:19-24.
- Sebo, P., and D. Ladant. 1993. Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Mol Microbiol.* 9:999-1009.

- Shimizu, S., M. Narita, and Y. Tsujimoto. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*. 399:483-7.
- Schlecht, G., J. Loucka, H. Najar, P. Sebo, and C. Leclerc. 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*. 173:6089-97.
- Simsova, M., P. Sebo, and C. Leclerc. 2004. The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*-a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells. *Int J Med Microbiol*. 293:571-6.
- Stanley, P., V. Koronakis, and C. Hughes. 1998. Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiol Mol Biol Rev*. 62:309-33.
- Szalai, G., R. Krishnamurthy, and G. Hajnoczky. 1999. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *Embo J*. 18:6349-61.
- Takei, K., K. Tokuyama, M. Kato, and A. Morikawa. 1998. Role of cyclic adenosine monophosphate in reducing superoxide anion generation in guinea pig alveolar macrophages. *Pharmacology*. 57:1-7.
- TranVan Nhieu, G., C. Clair, G. Grompone, and P. Sansonetti. 2004. Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol Cell*. 96:93-101.
- Trimble, W.S., and S. Grinstein. 2007. TB or not TB: calcium regulation in mycobacterial survival. *Cell*. 130:12-4.
- Uhlen, P., A. Laestadius, T. Jahnukainen, T. Soderblom, F. Backhed, G. Celsi, H. Brismar, S. Normark, A. Aperia, and A. Richter-Dahlfors. 2000. Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature*. 405:694-7.
- Weingart, C.L., and A.A. Weiss. 2000. *Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils. *Infect Immun*. 68:1735-9.
- Weiss, A.A., and E.L. Hewlett. 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annu Rev Microbiol*. 40:661-86.
- Weiss, A.A., E.L. Hewlett, G.A. Myers, and S. Falkow. 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 150:219-22.
- Wilsson, A., H. Lundqvist, M. Gustafsson, and O. Stendahl. 1996. Killing of phagocytosed *Staphylococcus aureus* by human neutrophils requires intracellular free calcium. *J Leukoc Biol*. 59:902-7.
- Zaretzky, F.R., M.C. Gray, and E.L. Hewlett. 2002. Mechanism of association of adenylate cyclase toxin with the surface of *Bordetella pertussis*: a role for toxin-filamentous haemagglutinin interaction. *Mol Microbiol*. 45:1589-98.