

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní obor: Imunologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Adenylátcyklázový toxin *Bordetella pertussis* jako marker pro
studium endocytózy komplementového receptoru $\alpha_M\beta_2$**

Bc. Věra Chvojková

Školitel: Mgr. Ladislav Bumba, PhD.

Vedoucí laboratoře: Ing. Peter Šebo, CSc.

Praha 2012

Tato diplomová práce byla vypracována v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů v Mikrobiologickém ústavu AV ČR.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně pod vedením mého školitele a s použitím citované literatury.

V Praze dne 27. 4. 2012

podpis

Obsah

Poděkování.....	7
Abstrakt.....	8
1 Seznam zkratk	10
2 Úvod.....	14
2.1 Bakterie <i>Bordetella pertussis</i>	14
2.1.1 Faktory virulence <i>B. pertussis</i>	15
2.1.2 Adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT, AC-Hly).....	17
2.1.2.1 Genový lokus <i>cya</i>	18
2.1.2.2 Struktura a funkce CyaA	18
2.2 Rodina integrinů	21
2.2.1 Integrinový receptor CD11b/CD18 (α M β 2, Mac-1, CR3).....	22
2.2.2 Signalizace integrinu CD11b/CD18	24
2.3 Interakce CyaA s membránou hostitelských buněk a translokace AC domény do buněk.....	26
2.4 FRET - Försterův rezonanční energetický přenos	29
2.5 Endocytóza	30
2.5.1 Fagocytóza.....	31
2.5.2 Receptory zprostředkovaná endocytóza závislá na klatrinu	31
2.5.3 Na kaveolách závislá endocytóza	32
2.5.4 Makropinocytóza	33
2.5.5 Endocytóza CyaA a jeho mutantních variant	33
3 Cíle práce	35
4 Experimentální část	36
4.1 Přístroje, chemikálie a ostatní materiál.....	36
4.1.1 Seznam použitých přístrojů	36
4.1.2 Seznam použitých chemikálií	37
4.1.3 Monoklonální protilátky	40
4.1.4 Pufry a roztoky	40
4.1.5 Složení gelů	45

4.1.6	Kultivační média.....	46
4.1.7	Použité plazmidy	49
4.1.8	Bakteriální kmeny.....	50
4.1.9	Tkáňové linie	50
4.1.10	Primární buňky	50
4.1.11	Mutantní varianty CyaA	50
4.2	Metody a pracovní postupy	51
4.2.1	Uchovávání bakteriálních kmenů	51
4.2.2	Příprava superkompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	51
4.2.3	Izolace a manipulace s plazmidovou DNA	52
4.2.3.1	Minipreparace plazmidové DNA.....	52
4.2.3.2	Minipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio)	52
4.2.3.3	Midipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio)	53
4.2.3.4	Pročištění plazmidové DNA určené k transfekci.....	53
4.2.3.5	Štěpení plazmidové DNA restrikcími endonukleázami	54
4.2.3.6	Stanovení koncentrace plazmidové dsDNA	54
4.2.3.7	Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	54
4.2.3.8	Transformace plazmidové DNA teplotním šokem	55
4.2.3.9	Sekvence plazmidové DNA	55
4.2.4	Produkce a purifikace mutantních forem CyaA	56
4.2.4.1	Produkce proteinů v 500 ml třepané kultuře.....	56
4.2.4.2	Izolace proteinů z bakteriální kultury - příprava močovinového extraktu	57
4.2.4.3	Purifikace proteinů iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose.....	57
4.2.4.4	Purifikace proteinů hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose se současným značením proteinů.....	58
4.2.5	Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.....	59
4.2.6	Stanovení hemolytické aktivity CyaA	60
4.2.7	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	61
4.2.8	Práce s primárními buňkami a tkáňovými liniemi.....	61
4.2.8.1	Uchovávání tkáňových kultur.....	61
4.2.8.2	Příprava buněčných konzerv.....	61
4.2.8.3	Rozmrazování buněčných konzerv	62

4.2.8.4	Pasážování buněk.....	62
4.2.8.5	Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky	63
4.2.8.6	Izolace a maturace dendritických buněk z kostní dřeně (BMDC).....	63
4.2.9	Tranzientní transfekce buněk pomocí Lipofectamine 2000	64
4.2.10	Tranzientní transfekce buněk pomocí FuGENE6 Reagent.....	64
4.2.11	Příprava stabilních tkáňových linií	65
4.2.12	Příprava buněk na fluorescenční mikroskopii	65
4.2.12.1	Příprava skel na mikroskopování.....	65
4.2.12.2	Podkladová vrstva fibronektinu na mikroskopická skla	66
4.2.12.3	Podkladová vrstva BD Matrigelu na mikroskopická skla	66
4.2.12.4	Podkladová vrstva polylysinu na mikroskopická skla.....	66
4.2.12.5	Příprava buněk na mikroskopování	66
4.2.12.6	Inkubace buněk s toxoidem a transferinem	67
4.2.12.7	Fixace buněk a příprava trvalých preparátů.....	67
4.2.13	Mikroskopická analýza trvalých preparátů.....	67
4.2.14	Příprava buněk na průtokovou cytometrii	68
4.2.15	Selekce buněk pomocí průtokového cytometru.....	68
5	Výsledky	69
5.1	Produkce a purifikace CyaA-AC ⁻ , CyaA-KP-AC ⁺ a CyaA-KP-AC ⁻	69
5.2	Aktivace integrinového receptoru CD11b/CD18 toxoidem CyaA-AC ⁻	70
5.3	Endocytóza CyaA-AC ⁻ , CyaA-KP-AC ⁺ a CyaA-KP-AC ⁻ v BMDC	72
5.4	Endocytóza CyaA-AC ⁻ , CyaA-KP-AC ⁺ a CyaA-KP-AC ⁻ v BMDC aktivovaných pomocí PMA.....	78
5.5	Analýza buněk K562	82
5.5.1	Stabilní linie K562-CD11b/CD18	82
5.5.2	Tranzientní transfekce K562-CD11b/CD18	86
5.6	Endocytóza CyaA-AC ⁻ , CyaA-KP-AC ⁺ a CyaA-KP-AC ⁻ v tranzientně transfekovaných buňkách K562-CD11b/CD18.....	90
5.7	Endocytóza CyaA-AC ⁻ , CyaA-KP-AC ⁺ a CyaA-KP-AC ⁻ v tranzientně transfekovaných buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA.....	94
5.8	Příprava buněk na analýzu otevřené a zavřené konformace integrinu pomocí metody FRET.....	98

5.8.1	Třídění jednotlivých buněk („Single cell sorting“)	101
6	Diskuze	104
7	Závěr	107
8	Použitá literatura	108

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli Láďovi Bumbovi za cenné rady, předané osobní zkušenosti a veškerou pomoc při vypracovávání této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře Peteru Šebovi za možnost vypracovat diplomovou práci u něj v laboratoři a za zajištění výborných pracovních podmínek.

Dík patří také laborantkám Hance Lukeové a Soně Kozubové za pomoc při přípravě některých pokusů a všem členům laboratoře za příjemné pracovní prostředí a každodenní spolupráci.

Na závěr bych ráda poděkovala svému manželovi Josefovi za psychickou podporu, toleranci a finanční zajištění a svým dětem Josífkovi a Aničce za jejich pochopení a trpělivost během celého vysokoškolského studia. Děkuji také svým rodičům, kteří za mnou stáli a povzbuzovali mě.

Děkuji.

Abstrakt

Bordetella pertussis způsobuje u lidí infekční onemocnění nazývané černý kašel. Tato gram-negativní bakterie produkuje adenylátcyklázový toxin (CyaA), který se váže na integrinový receptor CD11b/CD18 na povrchu myeloidních fagocytů a dopravuje do jejich cytosolu adenylátcyklázovou doménu (AC). Tato práce se zabývá studiem endocytózy CyaA a jeho využití jako specifické značky při studiu endocytické dráhy CD11b/CD18 receptoru. Detoxifikovaná verze toxinu, CyaA-AC⁻, je schopna zvyšovat intracelulární koncentraci vápenatých iontů a zároveň umožňuje únik draselných iontů z buňky, způsobuje aktivaci integrinového receptoru CD11b/CD18, což vede k následné endocytóze prostřednictvím dráhy závislé na klatrinu. Na druhou stranu, inaktivní mutanta CyaA-KP-AC⁻ nespouští aktivaci receptoru a je endocytována prostřednictvím jiné dráhy, která je na klatrinu nezávislá. Tyto data naznačují, že mechanismus endocytózy CD11b/CD18 je určován a regulován odlišnými konformačními stavy tohoto receptoru.

Klíčová slova: *Bordetella pertussis*, adenylátcyklázový toxin, CyaA, integrinový receptor CD11b/CD18, endocytóza

Abstract

Bordetella pertussis is an important human pathogen that causes an infection disease called whooping cough. This gram-negative bacterium produces an adenylate cyclase toxin (CyaA) that recognizes an integrin receptor CD11b/CD18 present on the surface of myeloid phagocytes and delivers an adenylate cyclase (AC) domain into the cell cytosol. This thesis deals with the endocytic machinery of CyaA and its potential use as a specific marker for endocytosis of the CD11b/CD18 receptor molecule. Detoxified mutant of CyaA, CyaA-AC⁻, that has the capacity to promote calcium influx as well the potassium efflux, was shown to trigger activation of the integrin receptor CD11b/CD18 followed with endocytic uptake by clathrin-dependent pathway. On the other side, the inactive mutant CyaA-KP-AC⁻ that is unable to provoke integrin activation was endocytosed by clathrin-independent pathway. These results suggest that the various endocytic pathways of the CD11b/CD18 are determined by different conformational states of the receptor molecule.

Key words: *Bordetella pertussis*, adenylate cyclase toxin, CyaA, integrin receptor CD11b/CD18, endocytosis

1 Seznam zkratek

AC	adenylátcykláza, adenylátcyklázový, -á
ACP	Acyl-Carrier Protein
ACT	adenylátcyklázový toxin
ADP	adenosin-5'-difosfát
AK	aminokyselina
Amp	ampicillin
AMP	adenosin-5'-monofosfát
APC	antigen prezentující buňka
APC	allophycocyanin
APS	amoniumpersulfát
Asn	asparagin
Asp	kyselina asparagová
ATB	antibiotika
ATP	adenosin-5'-trifosfát
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BFB	bromfenolová modř
BMDC	dendritické buňky odvozené z kostní dřeně (z angl. Bone Marrow-derived Dendritic Cells)
bp, bps	pár bazí, párů bazí (z angl. base pairs)
BSA	bovinní (hovězí) sérový albumin
Bvg	dvousložkový regulační systém
BvgS	senzorový protein systému Bvg
BvgA	regulační protein systému Bvg
CaM	kalmodulin
cAMP	adenosin-3',5'-cyklický monofosfát
CTL	cytotoxické T-lymfocyty
CyaA	adenylátcyklázový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
CyaA-AC ⁻	mutantní varianta CyaA, která není schopná přeměny ATP na cAMP
CyaA-E570K+E581P	mutantní varianta CyaA neschopná tvořit póry v membráně cílové buňky a neschopná translokace AC domény do cytosolu cílové buňky

CyaA-E570K+E581P-AC⁻ mutantní varianta CyaA se stejnou definicí jako CyaA-E570K+E581P, navíc neschopná přeměny ATP na cAMP

Cys	cystein
DEAE	diethylaminoethyl
CyaC	acetyltransferáza bakterie <i>Bordetella pertussis</i> zprostředkovávající posttranslační modifikaci ACT
DAG	diacyl glycerol
DC	dendritické buňky (z angl. Dendritic Cells)
DMEM	médium pro tkáňové kultury (z angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	dimethylsulfoxid
DN	dominantně negativní varianta proteinu (z angl. Dominant Negative)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DNT	dermonekrotický toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Epac	protein aktivovaný vazbou cAMP (z angl. Exchange Protein Activated by cAMP)
FACS	fluorescenční průtoková cytometrie se sorterem (z angl. Fluorescence-Activated Cell Sorting)
FcR	receptor vázající Fc část imunoglobulinů zodpovědný za fagocytózu částic opsonizovaných protilátkami
FHA	filamentózní hemaglutinin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
FITC	fluoresceinizoithiokyanát
FRET	Försterův rezonanční energetický přenos (z angl. Förster resonance energy transfer)
GEF	faktor vyměňující GTP za GDP (z angl. Guanine Nucleotide Exchange Factor)
Gly	glycin
GM-CSF	faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie (z angl. Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)

GPCR	receptor spřažený s G proteinem (z angl. G protein-coupled Receptor)
GPI	glykofosfatidylinositol
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová kyselina
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula 1
IL	interleukin
Ile	izoleucin
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
IS	imunitní systém
KDa	kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
Km	kanamycin
LB médium	médium Luria-Bertani
Leu	leucin
LPS	lipopolysacharid, endotoxin bakterií
Lys	lysin
mAb	monoklonální protilátka (z angl. Monoclonal Antibody)
MDO médium	kultivační médium (z francouzského Moyenne Dusité Optique)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (z angl. Major Histocompatibility Complex)
MK	mastná kyselina/mastné kyseliny
NK buňky	přirozeně zabíječské buňky (z angl. Natural Killer)
PAA	polyakrylamid, -ový, -ová
PIP ₂	fosfatidylinositol (4,5)-bisfosfát
PIPKI γ	fosfatidylinositol fosfát kináza typu I γ
PHB	prohibitin homology
Phe	fenylalanin
PMA	phorbol-12-myristát-13-acetát, aktivátor proteinkinázy C
PT	pertusový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
RAP1	malá GTPáza (z angl. Ras-Proximate-1 nebo Ras-related Protein 1)
RIAM	Rap1-GFT-interacting adapter molecule
RPMI	kultivační médium pro tkáňové kultury, prvně připravené v „Roswell Park Memorial Institute“
RT	pokožová teplota 20 °C (68 °F) (z angl. Room Temperature)

RTX	motiv vyskytující se v bakteriálních toxinech (z angl. Repeats in ToXin)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS-elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
TCF	tracheální kolonizační faktor bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TCT	tracheální cytotoxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1,2-diaminomethan
Thr	threonin

2 Úvod

Bakterie *Bordetella pertussis* produkuje adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT), který patří mezi hlavní faktory virulence této bakterie a hraje klíčovou roli ve schopnosti *Bordetella pertussis* kolonizovat sliznice horních cest dýchacích (Weiss *et al.*, 1986). CyaA je multifunkční protein, který má vazebnou, enzymatickou, kanálotvornou a hemolytickou aktivitu. Jeho cílovými buňkami jsou makrofágy, dendritické buňky, neutrofilní granulocyty a NK-buňky. Vazba toxinu na cytoplazmatickou membránu je zprostředkována receptorem CD11b/CD18, který se nachází na povrchu výše zmíněných myeloidních fagocytujících buněk imunitního systému (Guermontprez *et al.*, 2001).

Nedávno byl zpřesněn mechanismus, jakým CyaA translokuje svou AC doménu do cytosolu cílových buněk. Bylo objeveno, že po vazbě CyaA na receptor CD11b/CD18 hraje důležitou roli přesun komplexu toxin-integrin do lipidové mikrodomény cytoplazmatické membrány. Klíčovou úlohu v tomto přesunu má vstup vápníku do buňky a reorganizace aktinového cytoskeletu (Bumba *et al.*, 2010).

V recentní práci Fišera a kolektivu bylo ukázáno, že schopnost vyvolat vtok Ca^{2+} do buněk způsobí zpoždění endocytického odstranění CyaA z buněčné membrány myší makrofágové linie J774A.1. Detoxifikovaná varianta toxinu (CyaA-AC⁻), která je schopná vyvolat vtok vápenatých iontů do buněk, byla zjištěna na plazmatické membráně buněk ještě po 20 minutách inkubace, zatímco CyaA-KP toxoid, jenž není schopný vyvolat vtok Ca^{2+} do buněk, byl nahromaděn v endocytických váčcích v buněčném cytosolu již během 5 minut po přidání toxoidu. Téměř kompletně pak byl odstraněn z buněčné membrány během 10 minut. Oba toxoidy jsou tedy nejspíš zpracovány rozdílnými endocytickými cestami. Zpožděním endocytického odstranění z buněčné membrány je tak CyaA umožněno maximalizovat svou kapacitu permeabilizovat fagocyty póry toxinu (Fiser *et al.*, 2012).

2.1 Bakterie *Bordetella pertussis*

Rod *Bordetella* zahrnuje několik druhů bakterií, které jsou většinou obligátně aerobní a napadají jak zvířata, tak člověka. *B. pertussis*, *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* patří mezi významné savčí patogeny a zároveň se řadí mezi nejlépe prostudované druhy s již sekvenovaným genomem (Parkhill *et al.*, 2003). *B. avium* se řadí mezi patogeny ptáků. Pouze *Bordetella petrii* je fakultativně anaerobní bakterie, která byla izolovaná z půdy (von Wintzingerode *et al.*, 2001). *B. parapertussis* vyvolává podobné infekční onemocnění jako

B. pertussis, avšak provázené mírnějšími příznaky. Mimo člověka je schopná vyvolat onemocnění také u ovce (Porter *et al.*, 1994). *Bordetella pertussis* byla poprvé izolována J. Bordetem a O. Gengou v roce 1906. Jedná se o striktně aerobní gramnegativní bakterii, obligátní lidský patogen bez známého zvířecího hostitele. Z nakažené osoby na zdravého člověka je přenášena přímým kontaktem nebo kapénkovou infekcí. Inkubační doba onemocnění se pohybuje mezi 7 až 10 dny. U neimunizovaných jedinců způsobuje infekční respirační onemocnění černý, nebo též dávivý kašel (pertusi), trvající 6 až 12 týdnů. V první fázi onemocnění nazývané katarální stádium, které trvá 7 až 14 dnů, bakterie kolonizuje řasinkový epitel horních cest dýchacích. Příznaky se podobají běžnému nachlazení. Následuje pomnožení bakterie provázené produkcí toxinů, což vede k odumírání napadeného epitelu. V tomto stádiu je nemoc dobře léčitelná antibiotiky. Po dvou až třech týdnech onemocnění nastupuje paroxysmální stádium, kdy dochází k záchvatům křečovitého kašle s nadměrnou produkcí hlenu, někdy se objevuje i zvracení. Černý kašel se projevuje především u dětí v předškolním věku. U kojenců a batolat může neléčená infekce vést k udušení vlastním hlenem. Poslední fáze není doprovázena žádnými příznaky a bakterii již nelze z horních cest dýchacích vykultivovat (Anderson, 1989). *B. pertussis* nevstupuje do krevního řečiště a ani se nerozšiřuje do dalších tkání (Weiss *et al.*, 1986).

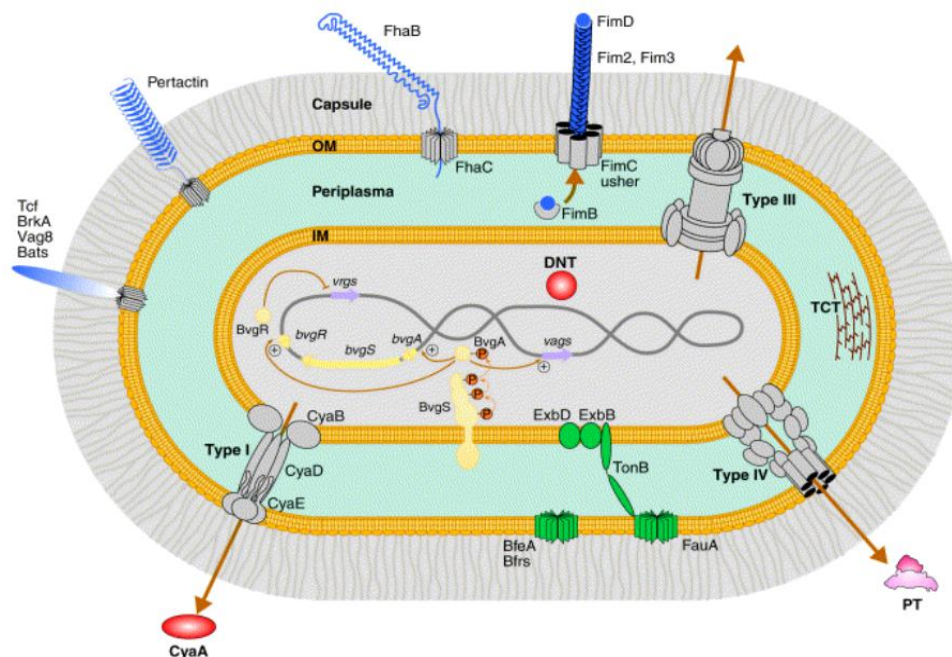
Díky masivnímu očkování byl černý kašel ve vyspělých zemích téměř vymýcen, avšak v posledních letech došlo k nárůstu počtu onemocnění, a to především v těch zemích, které s očkováním začaly jako první. Specifická imunita dospělých jedinců nejspíš slábne s prodlužující se dobou od vakcinace. Přestože tito lidé nemusejí pociťovat žádné příznaky onemocnění, mohou být nakaženi a přenášet infekci na neimunizované kojence a malé děti. Ročně je zaznamenáno několik desítek miliónů nových případů, z nichž asi 300 000 jedinců na nemoc umírá. To je jedním z důvodů, proč je potřeba pokračovat ve výzkumu *B. pertussis*, především pak adenylátcyklázového toxinu, coby hlavního faktoru virulence této bakterie (Weiss *et al.*, 1986), který by mohl posloužit i při vývoji nové vakcíny proti černému kašli.

2.1.1 Faktory virulence *B. pertussis*

Virulence je kvantitativním vyjádřením patogenity, což je schopnost mikrobiálního druhu vyvolat onemocnění konkrétního hostitele. U hostitele závisí patogenita na efektivitě celé soustavy obranných prostředků k likvidaci mikroba, u bakterie závisí na schopnosti tvořit v dostatečném množství biochemické prostředky (faktory virulence) vedoucí k poškození

hostitele. Faktory virulence lze rozdělit podle jejich funkce do dvou skupin. Jednou jsou to faktory invazivity pomáhající patogenům pronikat do hostitele a kolonizovat jej, druhou jsou to toxiny, které vedou k vyřazení obranných funkcí imunitního systému (Bednář *et al.*, 1996).

Bakterie *B. pertussis* produkuje celou řadu faktorů virulence, které jí umožňují pronikat do hostitelského organismu, čelit jeho imunitní obraně, interagovat s cílovými buňkami a kolonizovat hostitele. Faktory virulence *B. pertussis* se dělí na toxiny a adheziny (Obr. 1).



Obr. 1: Faktory virulence bakterie *Bordetella pertussis*. Převzato a upraveno z (Locht, 2001).

Do skupiny adhezínů, které zajišťují vazbu bakterie na povrch fagocytujících buněk a buněk řasinkového respiračního epitelu (na obrázku znázorněny modře), patří filamentózní hemagglutinin (FHA), povrchový protein pertaktin, proteiny fimbrií (FIM) a tracheální kolonizační faktor (TCF). Druhou skupinu faktorů virulence představují toxiny produkované bakterií (na obrázku znázorněny červeně a hnědě), jimiž jsou adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT, AC-Hly), dermonekrotický toxin (DNT), pertusový toxin (PT) a tracheální cytotoxin (TCT). Na obrázku je dále znázorněna vnitřní a vnější membrána bakterie (IM a OM), periplazma a kapsule. Velké hnědé šipky znázorňují export faktorů virulence prostřednictvím jednotlivých sekrečních systémů (Weiss *et al.*, 1986).

Geny kódující faktory virulence jsou rozptýleny podél celého chromozomu a tvoří operon (Weiss *et al.*, 1986). Produkce faktorů virulence je v bakterii pod kontrolou lokusu

bvgAS (Bordetella Virulence Gene), který kóduje dva proteiny. Prvním je cytoplazmatický DNA-vazebný protein BvgA, druhým protein BvgS, což je receptorová histidinová kináza, která je autofosforylována na základě signálu z vnějšího prostředí. Fosfátová skupina je poté přenesena na aspartátový zbytek proteinu BvgA, čímž je tento protein aktivován a váže se na specifické sekvence v promotorových oblastech genů důležitých pro virulenci bakterií a aktivuje jejich transkripci (Preston *et al.*, 2004).

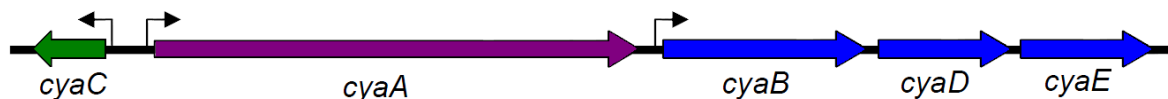
2.1.2 Adenylátcyklázový toxin (CyaA, ACT, AC-Hly)

CyaA patří do rodiny tzv. RTX toxinů (z angl. Repeats in ToXin). Toto označení vyplývá ze skutečnosti, že všechny proteiny této skupiny obsahují v C-koncové části molekuly opakující se nonapeptidové sekvence bohaté na glycin a aspartát v podobě X-(Leu/Ile/Phe)-X-Gly-Gly-X-Gly-(Asp/Asn)-Asp (kde X je jakýkoliv aminokyselinový zbytek), které tvoří vazebná místa pro Ca^{2+} . Vazba vápenatých iontů je nutná pro biologickou aktivaci RTX toxinů (Welch, 1995). To však není jediný společný znak této rodiny proteinů. RTX toxiny vykazují vysoký stupeň homologie (Coote, 1992). Dalším společným rysem je sekreční mechanismus rozpoznávající signální sekvenci na C-konci molekuly toxinu. Spojuje je i nutnost posttranslační modifikace toxinu zbytkem mastné kyseliny, aby mohl toxin přejít z inaktivní formy do aktivní konformace (Basar *et al.*, 1999), nebo uspořádání genů pro syntézu, sekreci a aktivaci toxinu na chromozomu. Mnoho RTX toxinů vytváří póry v cytoplazmatické membráně cílových buněk, což vede k jejich lyzi (Coote, 1992). RTX proteiny jsou sekretovány celou řadou gramnegativních bakterií, z nichž většina patří mezi lidské, živočišné nebo rostlinné patogeny (Welch, 1995). Skupina RTX toxinů zahrnuje cytotoxiny, které jsou dále rozděleny podle specifity k cílovým buňkám na hemolyziny a leukotoxiny. Hemolyziny jsou schopné lyzovat různé typy eukaryotních buněk, kdežto cílová specifita leukotoxinů je omezena na úzké spektrum buněk imunitního systému.

CyaA je transportován z cytosolu bakterie na buněčný povrch pomocí sekrečního aparátu typu I, jenž rozpoznává signální sekvenci na C-konci proteinu (Rogel *et al.*, 1992). Adenylátcyklázový toxin však nemusí být pouze uvolňován do okolního prostředí, ale může být vázán na povrch bakterie pomocí filamentózního hemaglutininu (Zaretzky *et al.*, 2002). Avšak pouze nově sekretovaný toxin, nikoliv toxin dlouhodobě vázaný na povrchu bakterie, je schopen pronikat do cytosolu cílové buňky (Gray *et al.*, 2004).

2.1.2.1 Genový lokus *cya*

Exprese CyaA probíhá z lokusu *cya*, který je tvořen pěti strukturálními geny, které jsou na chromozomu bakterie umístěny bezprostředně za sebou (Obr. 2). Čtyři geny (*cyaABDE*) jsou seskupeny do jednoho operonu a jsou přepisovány ze společného promotoru do jedné mRNA, kdežto transkripce genu *cyaC* probíhá v opačném směru. Geny *cyaBDE* mohou být také přepisovány z promotoru ležícího mezi geny *cyaA* a *cyaB* (Glaser *et al.*, 1988a, Laoide *et al.*, 1990).

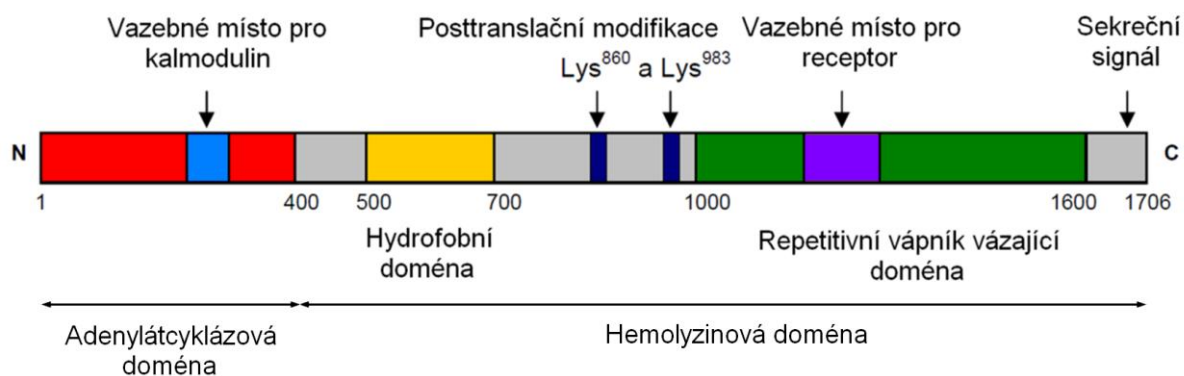


Obr. 2: Schematické znázornění *cyaCABDE* lokusu. Převzato a upraveno z (Laoide *et al.*, 1990). Silné barevné šipky znázorňují strukturální geny nezbytné pro syntézu (fialově), aktivaci (zeleně) a sekreci (modře) CyaA, černé tenké šipky znázorňují promotor, z něhož jsou geny přepisovány.

Translací genu *cyaA* vzniká inaktivní protoxin proCyaA, který je aktivován posttranslační modifikací zbytkem mastné kyseliny. Tuto modifikaci zajišťuje protein CyaC o velikosti 22 kDa, produkt genu *cyaC* (Barry *et al.*, 1991). CyaC funguje jako acyltransferáza katalyzující přenos acylu z acyl-ACP (Acyl-Carrier Protein) na protoxin (Rogel *et al.*, 1992). Aktivace spočívá v tom, že zbytek kyseliny palmitové je kovalentně navázán prostřednictvím amidové vazby k ϵ -aminoskupině lyzinových zbytků 860 a 983 (Basar *et al.*, 1999). Ze strukturálního genu *cyaB* vzniká ATPáza vnitřní membrány (CyaB). Z následujících strukturálních genů vznikají proteiny CyaD, což je membránový fúzní protein a CyaE, který se podílí na tvorbě kanálu vnější membrány a tvoří součást sekrečního systému typu I (Glaser *et al.*, 1988b).

2.1.2.2 Struktura a funkce CyaA

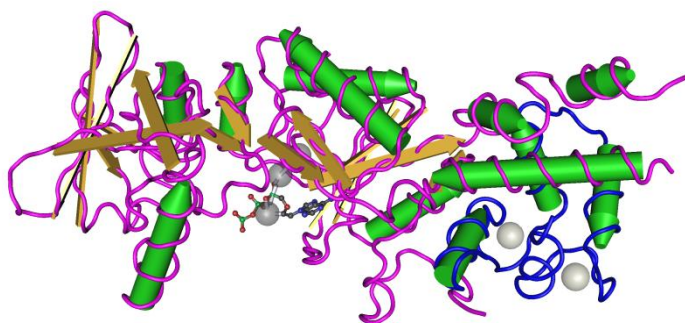
Adenylátcyklázový toxin je multifunkční protein složený z 1706 aminokyselinových zbytků o molekulové hmotnosti 177 kDa. Je rozdělen na dvě základní funkční domény – N-koncovou adenylátcyklázovou doménu (AC) a RTX hemolyzinovou doménu (Hly) (Benz *et al.*, 1994) (Obr. 3).



Obr. 3: Schematické znázornění molekuly CyaA. Převzato a upraveno z (Ladant *et al.*, 1999).

1. Adenylatcyclázová doména (AC)

Invazivní, katalytickou, adenylatcyclázovou doménu tvoří aminokyselinové zbytky 1-400 na N-konci CyaA. AC doména není součástí žádného z dalších známých RTX toxinů. Adenylatcyclázový toxin je schopen dopravovat tuto doménu přímo přes cytoplazmatickou membránu do cílových buněk. V bezprostřední blízkosti AK zbytku 242 je vazebné místo pro kalmodulin, který je vyžadován pro aktivaci adenylatcyclázy. Enzymatická aktivita AC domény se v cytoplazmě eukaryotických buněk po vazbě kalmodulinu zvyšuje více než 1000× (Wolff *et al.*, 1980). AC po aktivaci katalyzuje nekontrolovatelnou přeměnu vnitrobuněčného ATP na cAMP (adenosin-3',5'-cyklický monofosfát) (Hanski, 1989, Ladant *et al.*, 1999). Sekundární strukturu AC domény s C-koncovým úsekem kalmodulinu se podařilo vykrytalizovat (Obr. 4; (Guo *et al.*, 2005)).



Obr. 4: Sekundární struktura AC domény v komplexu s C-koncem kalmodulinu. Převzato z (Guo *et al.*, 2005). Modře je vyznačena C-koncová doména kalmodulinu, růžově AC doména. Pro vzájemnou interakci obou proteinů je nezbytná přítomnost vápenatých a hořečnatých iontů (zobrazeny jako šedé kuličky).

Nadměrná produkce cAMP (dosahující až 2mM koncentrace), případně spotřeba ATP, vedou k narušení baktericidních funkcí efektorových buněk imunitního systému hostitele a k apoptóze nebo až k nekróze makrofágů (Basler *et al.*, 2006). Navíc rušení buněčné signalizace, vyskytující se již při malých koncentracích toxinu (10 ng/ml a méně), efektivně zabraňuje oxidačnímu vzplanutí neutrofilů a fagocytů (Hanski, 1989). Působení adenylátcyklázového toxinu tak umožňuje bakterii kolonizovat dýchací trakt hostitele (Confer *et al.*, 1982), množit se a způsobovat onemocnění. Díky stavu lokální imunoprese v místě kolonizace bakterií tak dochází k rychlejšímu rozvoji onemocnění (Benz *et al.*, 1994, Rogel *et al.*, 1992).

AC doména obsahuje ještě tzv. permisivní místa, kam lze genetickou manipulací vložit krátké oligopeptidy nebo antigeny, aniž by došlo k narušení stability toxinu (Ladant *et al.*, 1992, Osicka *et al.*, 2000).

2. Hemolyzinová doména (Hly)

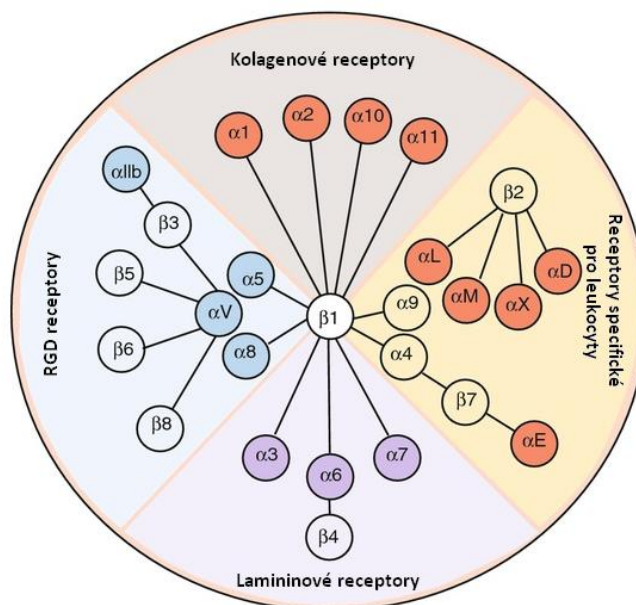
Druhá, C-koncová část toxinu tvořená aminokyselinovými zbytky 400-1706 se nazývá RTX hemolyzin. Hlavní úlohou hemolyzinové části je zabezpečit vazbu CyaA s cytoplazmatickou membránou cílových buněk a zprostředkovat dopravu katalytické AC domény do jejich cytosolu (Bellalou *et al.*, 1990, Sakamoto *et al.*, 1992, Benz *et al.*, 1994). Je funkčně nezávislá a je homologní jak svojí primární strukturou, tak svojí funkcí s ostatními RTX cytolyziny (Weiss *et al.*, 1986). RTX hemolyzinová doména je rozdělena do několika subdomén:

- a) hydrofobní doména (Benz *et al.*, 1994) se nachází mezi aminokyselinovými zbytky 500-700. Obsahuje několik po sobě jdoucích hydrofobních AK sekvencí, které mohou vytvořit malý kation-selektivní pór uvnitř buněčné membrány (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009, Benz *et al.*, 1994), jenž permeabilizuje buňky pro odtok cytosolických draselných iontů (Gray *et al.*, 1998, Osickova *et al.*, 2010). Transport iontů těmito kanály může vyvolat vstup vody do buněk a způsobit tak osmotickou lyzi napadených buněk (Benz *et al.*, 1994, Rogel *et al.*, 1992, Sakamoto *et al.*, 1992). Ve srovnání s ostatními hemolyziny RTX rodiny je však hemolytická aktivita CyaA velmi nízká,
- b) za hydrofobní doménou následuje přibližně 300 AK zbytků dlouhá acylační doména, která obsahuje lyzinové zbytky 860 a 983 nutné pro posttranslační modifikaci toxinu zbytkem kyseliny palmitové, a tím pro jeho aktivaci (Basar *et al.*, 1999),

- c) mezi aminokyselinovými zbytky 1000-1600 se nachází repetitivní, vápník vázající doména. Jak již název napovídá, je složená ze 45 repetitivních sekvencí nonapeptidů typických pro RTX toxiny a uvnitř této domény jsou vazebná místa pro vápenaté ionty (Rose *et al.*, 1995). Vazba Ca^{2+} vede ke konformačním změnám v molekule CyaA, které jsou nezbytné jak pro hemolytickou aktivitu, tak pro translokaci katalytické AC domény do buněk (Rogel *et al.*, 1992, Rose *et al.*, 1995). Podle afinity k vápenatým iontům mohou být vazebná místa rozdělena do dvou tříd. Jedny vážou Ca^{2+} s vysokou afinitou, prakticky ireversibilně. Jejich obsazení je nutné pro zaboření toxinu do membrány cílových buněk, ale také pro tvorbu iontových kanálů. Druhou třídu tvoří nízkoafinní vazebná místa, jejichž obsazení je nutné pouze pro přenos katalytické AC domény do cytosolu cílových buněk (Rose *et al.*, 1995). Součástí repetitivní domény je i vazebné místo pro CD11b/CD18 receptor (Weiss *et al.*, 1986, Sebo *et al.*, 1993),
- d) poslední část tvoří C-koncový sekreční signál (Weiss *et al.*, 1986, Sebo *et al.*, 1993).

2.2 Rodina integrinů

Integriny tvoří velkou rodinu adhezivních molekul složených vždy ze dvou různých transmembránových podjednotek α a β (Barczyk *et al.*, 2010). U obratlovců je rozmanitost integrinů způsobena tím, že 8 různých β podjednotek se může vázat se 17 různými α podjednotkami a vytvářet tak nejméně 24 heterodimerů, které jsou následně rozděleny do tří skupin podle toho, jestli je heterodimer tvořen β 1, β 2 nebo α podjednotkou integrinu (Obr. 5) (Barczyk *et al.*, 2010). Některé z integrinů vážou komponenty mezibuněčné hmoty (extracelulární matrix), jiné zajišťují vazbu membránových ligandů patřících do imunoglobulinové rodiny. Funkcí integrinů je také zprostředkovat pohyb buněk (Hořejší *et al.*, 2009).



Obr. 5: Rodina integrinových receptorů. Převzato a upraveno z (Barczyk *et al.*, 2010).

Integriny vykazují relativně nízkou afinitu ke svým ligandům, interakce jsou ale tvořeny stovkami až tisíci molekul, a dovolují tak buňce pevný kontakt (Pollard *et al.*, 2008). Buňka produkující různé integriny, které váží stejný ligand, je často schopna regulovat aktivitu každého integrinu zvlášť, a tím jemně vyladit jejich interakci s mezibuněčnou hmotou. Většina buněk však produkuje pouze jeden specifický integrin (Humphries *et al.*, 2003).

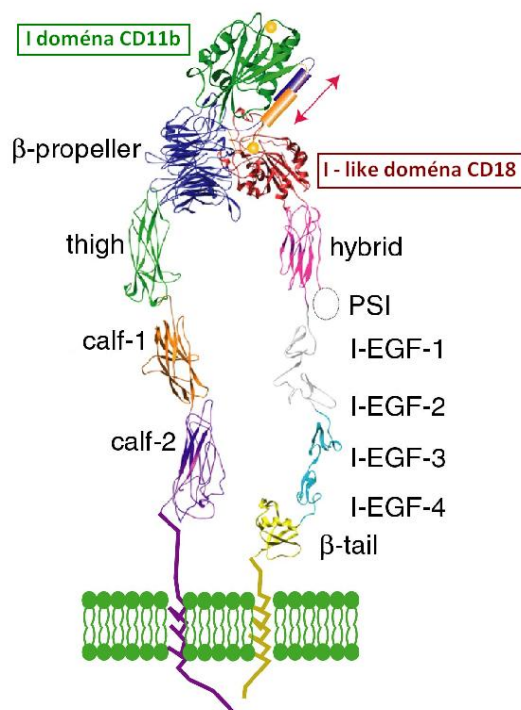
2.2.1 Integrinový receptor CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1, CR3)

Integrin CD11b/CD18, nazývaný též $\alpha_M\beta_2$, komplementový receptor typu 3 (CR3) nebo Mac-1 (Pollard *et al.*, 2008), je transmembránový glykoprotein patřící do rodiny β_2 integrinů, které se také označují jako integriny leukocytů, protože jsou jejich hlavními receptory. Tento integrin je produkován leukocyty myeloidní linie, tedy neutrofilů, monocytů, NK buňkami, polymorfonukleárními (PMN) leukocyty a aktivovanými leukocyty, kde se účastní mezibuněčné adheze, fagocytózy a buněčné aktivace (Yalamanchili *et al.*, 2000, Zhang, 1999), a především pak dendritickými buňkami, které jsou klíčové pro prezentaci antigenů a indukci buněčné imunitní odpovědi. Integrinový receptor CD11b/CD18 je rozpoznáván adenylátcyklázovým toxinem *Bordetella pertussis* (Guermonprez *et al.*, 2001).

Leukocyty jsou schopny produkovat čtyři různé integriny, které mají společnou β podjednotku a liší se svou α podjednotkou: CD11a/CD18 (nazývaný též $\alpha_L\beta_2$, LFA-1), CD11b/CD18 ($\alpha_M\beta_2$, CR3, Mac-1, Mo-1), CD11c/CD18 ($\alpha_x\beta_2$, p150/95) a CD11d/CD18 ($\alpha_D\beta_2$) (Harris *et al.*, 2000, Guermonprez *et al.*, 2001, Arnaout, 1990, Ross *et al.*, 1993, Mazzone *et al.*, 1995).

Integrinový povrchový receptor CD11b/CD18 se skládá ze dvou nekovalentně asociovaných podjednotek CD11b (α_M) a CD18 (β_2). Tuto asociaci zajišťuje GFFKR motiv, jenž se nachází na rozhraní mezi transmembránovou a cytoplazmatickou doménou α podjednotky. V nepřítomnosti aktivačního signálu tvoří tento motiv “pant”, který zamyká heterodimer v neaktivní konformaci (Harris *et al.*, 2000).

Obě podjednotky mají rozsáhlou extracelulární doménu, na níž navazuje krátký transmembránový úsek a krátká cytosolická část (Mould *et al.*, 2003) (Obr. 6).



Obr. 6: Jednotlivé části integrinových podjednotek. Převzato a upraveno z (Jin *et al.*, 2004).

Vrchol extracelulární domény α podjednotky (N-koncová část) tvoří I-doména (od “inserted” nebo “interactive”), která je důležitá pro vazbu většiny ligandů jako je fibrinogen, iC3b nebo intracelulární adhezní molekula 1 (ICAM-1) (Diamond *et al.*, 1993, Mazzone *et al.*, 1995). Jak bylo ukázáno v naší laboratoři, I-doména se však neúčastní vazby CyaA (R. Osička, osobní sdělení). V α podjednotce je dále obsažena repetice vázající Ca^{2+} ionty

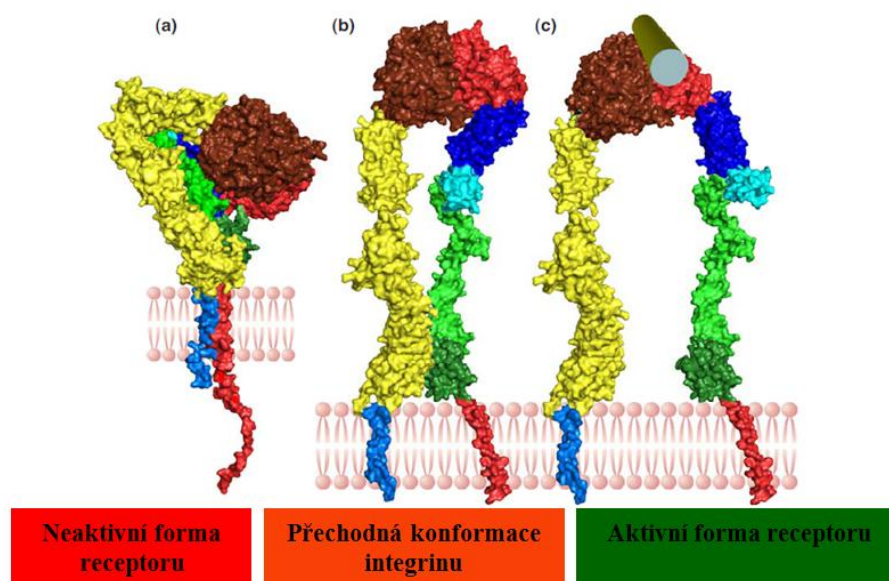
(β -propeller) a lektinová doména (calf-1 a calf-2) (Zhang, 1999). V β podjednotce je významná I-like doména a oblast bohatá na cysteinové zbytky (I-EGF1 - I-EGF4), která je rezistentní vůči proteázám (Zhang, 1999).

Podobně jako ostatní integriny je i CD11b/CD18 bohatě glykosylován. Obě podjednotky CD11 (α -podjednotka) i CD18 (β -podjednotka) obsahují několik míst N-glykosylace (N-X-S/T) (Asada *et al.*, 1991, Sastre *et al.*, 1986). Glykosylace integrinu CD11b/CD18 je zásadní pro vazbu a cytotoxickou aktivitu CyaA. Během počáteční nízkoafinní interakce toxinu s oligosacharidem rozpozná CyaA na podjednotce CD11b segment pro vysokoafinní vazbu k cílové buňce (Morova *et al.*, 2008).

CD11b/CD18 váže více než 30 různých proteinových i neproteinových ligandů (Yakubenko *et al.*, 2002). Integrin CD11b/CD18 je dále schopen v cytoplazmatické membráně buňky interagovat s různými GPI-vázanými proteiny, které postrádají cytosolickou doménu a poskytnout těmto povrchovým molekulám schopnost transmembránové signalizace (Agramonte-Hevia *et al.*, 2002).

2.2.2 Signalizace integrinu CD11b/CD18

Receptory CD11b/CD18 zprostředkovávají interakce mezi adhezivními molekulami na površích buněk, ale také slouží jako transmembránové mechanické spojnice mezi vnějším prostředím a cytoskeletem uvnitř buněk. Tyto spojnice využívají tzv. obousměrnou signalizaci („bi-directional signaling“), jenž se vyznačuje konformační změnou, při které neaktivní (klidový) stav molekuly popisovaný jako sklopená forma, přechází do aktivovaného stavu s napřímenou konformací molekuly. Podle toho, v jakém konformačním stavu se molekula nachází, vykazuje i různou afinitu k ligandu. V klidovém stavu má integrin nízkou afinitu, která po aktivaci buňky přejde do vysokoafinního stavu (Humphries *et al.*, 2003). Změnou konformace integrinu v důsledku aktivace dojde k odlišné vazbě buněčných proteinů na cytosolické části integrinových podjednotek CD11b a CD18. To vede ke spuštění signalizačních kaskád CD11b/CD18 (Hynes, 2002). Přejít z klidového do aktivovaného stavu znázorňuje model na Obr. 7.

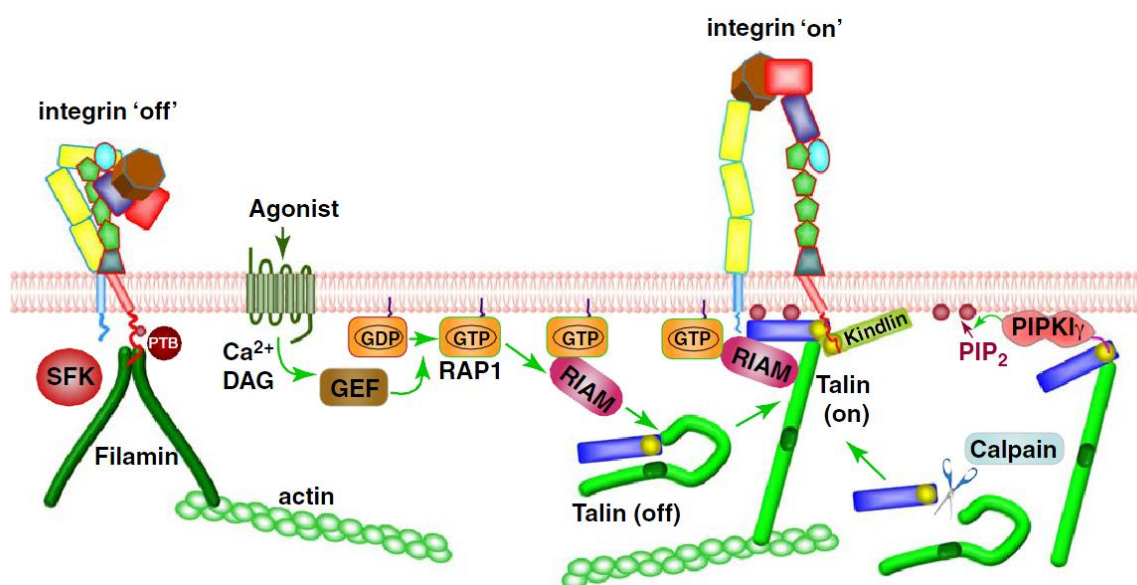


Obr. 7: Model konformační flexibility integrinového receptoru znázorňující přechod z klidového do aktivovaného stavu. Převzato a upraveno z (Anthis *et al.*, 2011).

Integriny jsou exprimovány na buněčný povrch v neaktivní konformaci. Přechod integrinu do aktivovaného stavu je indukován různými stimuly. Pokud aktivační signál přichází zevnitř buňky (například vazbou GM-CSF, IL-4 nebo PMA), jedná se o signalizaci „inside-out“. Pro signalizaci „inside-out“ je kritická sekvence v cytoplazmatické části podjednotky CD18 a sekvence GFFKR v podjednotce CD11b, které asociují s cytoskeletálními proteiny, jako jsou talin, aktin, filamin, vinkulin, aj. (Harris *et al.*, 2000). Pokud přichází aktivační signál vazbou ligandu zvenku (například vazbou ICAM-1, fibrinogenu nebo iC3b), jde o signalizaci „outside-in“ (Legate *et al.*, 2009, Berton *et al.*, 1999).

Signalizační dráha „inside-out“ (Obr. 8) začíná vazbou agonisty (jako je např. phorbol-12-myristát-13-acetát (PMA)) s GPCR (s G proteiny spřažený receptor). To vyvolá zvýšení koncentrace Ca^{2+} a diacylglycerolu (DAG), vedoucí k aktivaci „guanine nucleotide exchange factoru“ (GEF), který výměnou GDP za GTP aktivuje malou GTPázu Rap1. Aktivovaná Rap1 interaguje s adaptorovým proteinem RIAM (Rap1-GFT-interacting adapter molecule), jenž slouží jako lešení spojující Rap1 s talínem a navede talin k plazmatické membráně (Shattil *et al.*, 2010, Lee *et al.*, 2009).

Paralelně probíhající aktivační dráha zahrnuje PIP₂ (fosfatidylinozitol (4,5)-bisfosfát) a proteázu calpain. Díky působení enzymu PIPKI_γ (fosfatidylinozitol fosfát kináza typu I_γ) dojde k lokálnímu zvýšení PIP₂, vedoucímu k asociaci talinu s cytoplazmatickou částí integrinové podjednotky CD18. Následně dojde k aktivaci integrinu skrze štěpení talinu prostřednictvím Ca²⁺ závislé proteázy calpain (Franco *et al.*, 2005). Talin má na svém C-konci vazebné místo pro aktin a poskytuje tak přímé spojení mezi integrinem (skrze CD18 podjednotku integrinu) a aktinovým cytoskeletem (Critchley, 2009).



Obr. 8: Zjednodušené schéma signalizace a aktivace integrinu „inside-out“. Převzato a upraveno z (Anthis *et al.*, 2011).

2.3 Interakce CyaA s membránou hostitelských buněk a translokace AC domény do buněk

Trojrozměrná struktura CyaA není zatím známá a rovněž detaily translokace toxinu přes lipidovou dvojvrstvu buněčných membrán zůstávají stále neobjasněny. Základní mechanismus spočívá v inzerci AC domény do cytoplazmatické membrány pomocí hemolyzinové části toxinu a v její translokaci do cytosolu hostitelské eukaryotní buňky (Bellalou *et al.*, 1990, Sakamoto *et al.*, 1992).

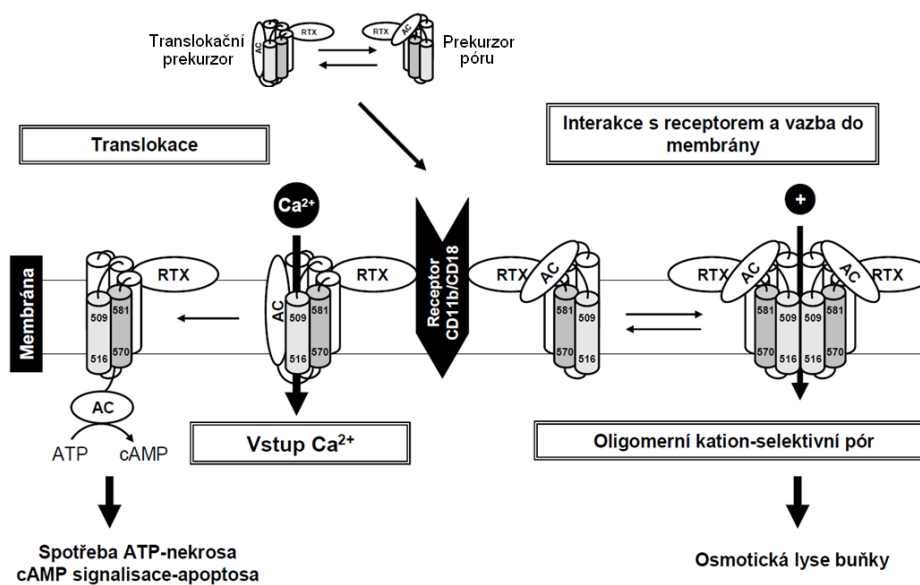
CyaA pro prvotní interakci s cílovou membránou zřejmě nepotřebuje žádný specifický receptor. Vazba toxinu je zprostředkována pravděpodobně membránovými gangliosidy (Gordon *et al.*, 1989) a glykoproteiny (Morova *et al.*, 2008). Ty umožňují přiblížení

hydrofobní domény CyaA dostatečně blízko k lipidické dvojvrstvě a následné zanoření této domény do membrány (Gordon *et al.*, 1989, Rogel *et al.*, 1992). Přichycení přes glykoproteiny a gangliosidy má ale velmi nízkou afinitu. Mnohem účinnější je vazba CyaA zprostředkovaná specifickým receptorem CD11b/CD18 (konkrétně vazba na α řetězec tohoto integrinu).

CyaA má schopnost translokovat svoji enzymatickou adenylátcyklázovou doménu přímo přes plazmatickou membránu do cytosolu napadených buněk jiným mechanismem, než receptorem zprostředkovanou endocytózou (Bellalou *et al.*, 1990, Hanski, 1989). Pomocnou roli při průniku AC domény CyaA do cytosolu pravděpodobně hraje negativní klidový membránový potenciál, který je na plazmatické membráně většiny eukaryotních buněk. Jeho experimentálně navozené obrácení totiž inhibuje průnik toxinu do cytosolu (Otero *et al.*, 1995).

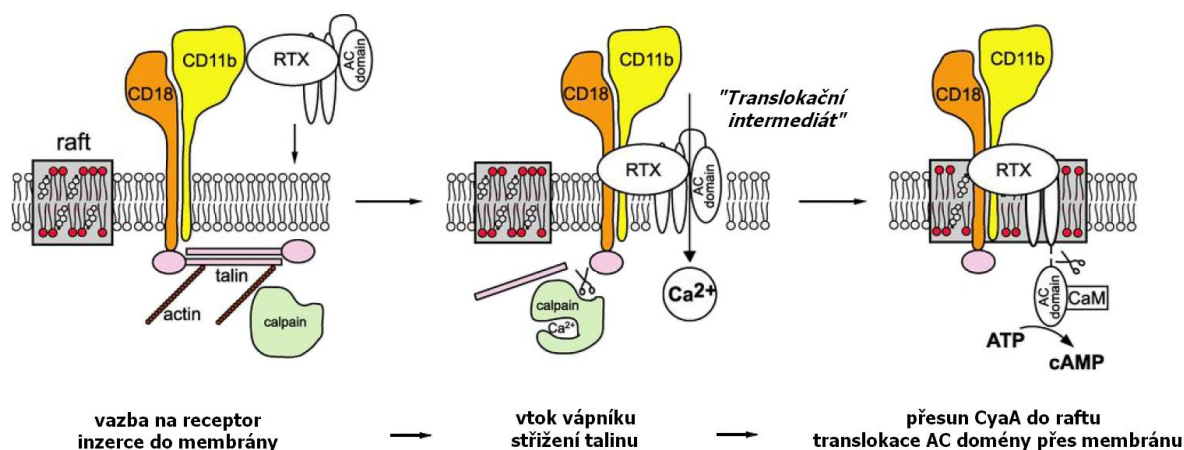
Původní představa o translokaci AC domény do cytosolu byla taková, že proniká do buněk prostřednictvím transmembránového iontového kanálu, jenž byl vytvořen hydrofobní doménou po zanoření toxinu do membrány (Rogel *et al.*, 1992). Zjištění průměru vznikajícího membránového póru (0,6-0,8 nm) však tento předpoklad vyvrátilo. Takový průměr kanálu je příliš malý na to, aby jím mohl procházet polypeptidový řetězec, i kdyby byl zcela rozvinutý. Pór je navíc striktně selektivní pro malé monovalentní a bivalentní kationty (Benz *et al.*, 1994). Dalším argumentem svědčícím proti průniku AC domény přes iontový kanál je, že přenos AC domény do buněk je realizován převážně monomery CyaA, zatímco tvorba membránových kanálů vyžaduje oligomerizaci molekul toxinu (Betsou *et al.*, 1993). Průnik AC domény do buněk i tvorba kation-selektivního póru v membráně jsou tedy dva různé procesy s odlišnými mechanismy (Sakamoto *et al.*, 1992, Osickova *et al.*, 1999, Basler *et al.*, 2007). Tato hypotéza byla nedávno potvrzena vytvořením CyaA konstruktů, který nebyl schopný formovat póry, zatímco měl plnou schopnost translokovat AC doménu skrz buněčnou membránu (Osickova *et al.*, 2010).

Současný model tedy počítá s tím, že se CyaA vyskytuje v roztoku ve dvou různých konformacích, přičemž obě konformace se váží na receptor CD11b/CD18. První konformací je tzv. translokační prekurzor, který po inzerci do membrány zůstává monomerní a translokuje AC doménu do cytosolu. Druhý prekurzor CyaA (prekurzor póru) v membráně oligomerizuje a tvoří kation-selektivní pór, který způsobuje osmotickou lyzi buňky (Bellalou *et al.*, 1990, Basler *et al.*, 2006, Basler *et al.*, 2007, Osickova *et al.*, 1999); Obr. 9)).



Obr. 9: Model interakce CyaA s plazmatickou membránou. Převzato a upraveno z (Basler *et al.*, 2007).

Nedávno publikovaná práce (Bumba *et al.*, 2010) objasnila dvoukrokový mechanismus translokace adenylátcyklázové domény CyaA do fagocytů (Obr. 10). Ukázala, že v prvním kroku se CyaA váže na integrinový receptor CD11b/CD18, který má cytoplazmatickou část podjednotky CD18 svázanou s aktinovým cytoskeletem přes protein talin (viz kapitola 2.2.2). Integrin je lokalizovaný rovnoměrně po celé membráně, mimo lipidové rafty. Po interakci s receptorem vytvoří CyaA tzv. „translokační intermediát“, jenž se zapustí do lipidové dvouvrstvy v buněčné membráně. Částečné pronikání adenylátcyklázové domény do membrány je doprovázeno tvorbou póru a vzniká tak krátkodobě otevřená cesta pro vstup extracelulárního Ca²⁺ do cytosolu (Fiser *et al.*, 2007). Vstup extracelulárních vápenatých iontů do buněk indukuje aktivaci Ca²⁺ závislé proteázy calpain, která je lokalizována v submembránovém kompartmentu, a která štěpí protein talin navázaný na aktinový cytoskelet. Tím dojde k uvolnění komplexu toxin-integrin z asociace k aktinovému cytoskeletu a komplex se přesunuje do lipidového raftu. Jiné ukládání lipidů a specifické, cholesterolem rozvolněné prostředí raftu umožňuje kompletní translokaci pozitivně nabitě AC domény přes buněčnou membránu (Bumba *et al.*, 2010). Jakmile se AC doména ocitne na cytosolické straně buněčné membrány, je odříznuta od RTX motivu CyaA pomocí proteázy přítomné uvnitř buňky (Bumba *et al.*, 2010). Vazba cytosolického kalmodulinu (CaM) následně aktivuje AC enzym a katalyzuje nekontrolovatelnou přeměnu ATP na cAMP (Hanski, 1989, Ladant *et al.*, 1999).



Obr. 10: Model translokace AC domény CyaA přes buněčnou membránu. Převzato a upraveno z (Bumba *et al.*, 2010).

Translokaci AC domény lze zcela zablockovat snížením teploty nebo vyvázáním Ca^{2+} z extracelulárního prostředí (Rogel *et al.*, 1992, Rose *et al.*, 1995).

2.4 FRET - Försterův rezonanční energetický přenos

Försterův rezonanční energetický přenos se uplatňuje mezi dvěma molekulami. Jednou molekulou je donor v excitovaném stavu, druhou molekulou je akceptor v základním energetickém stavu. Donor emituje v kratších vlnových délkách než akceptor. Podmínkou pro uplatnění FRET je, že emisní spektrum donoru se musí překrývat s excitačním spektrem akceptoru. Z toho zároveň vyplývá, že vzdálenost mezi donorem a akceptorem musí být dostatečně malá, aby k přenosu energie mohlo dojít. Energetický přenos probíhá bez vyzáření fotonu a jedná se o interakci dipól-dipól. Kromě toho efektivita FRET závisí na míře přesahu emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru, kvantovém výtěžku donoru a orientaci přechodných dipólů donoru a akceptoru v prostoru (Lakowicz, 2006). Všeobecně je účinnost E pro přenos energie při FRET definována jako

—

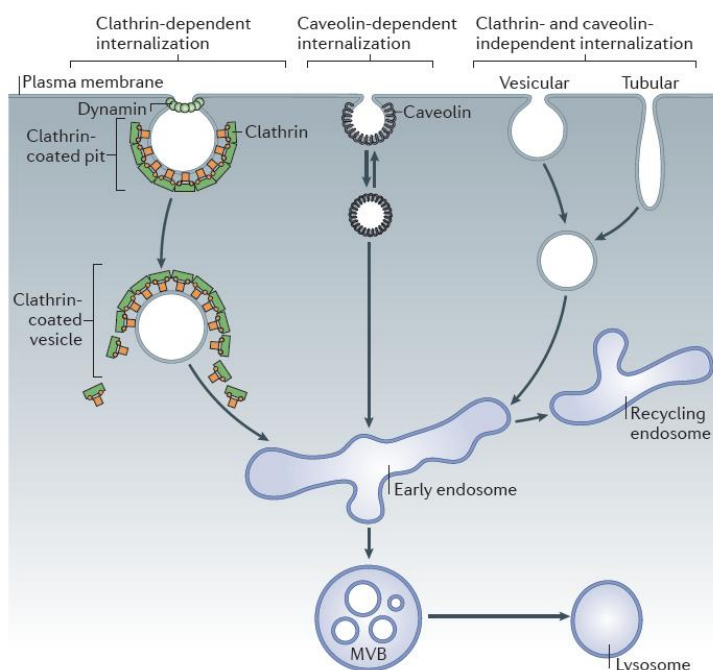
kde τ_{DA} je doba dohasínání donoru v přítomnosti akceptoru a τ_{D} je doba dohasínání donoru bez přítomnosti akceptoru. Vzdálenost, ve které je $E = 50\%$ se nazývá Försterova vzdálenost R_0 (Lakowicz, 2006). Pro uplatnění FRET by R_0 neměla být větší než 10-15 Å.

2.5 Endocytóza

Endocytóza je vezikulární transport, kterým buňky absorbují materiál (molekuly nebo i jiné buňky) z mezibuněčného prostoru. Materiál je vždy absorbován pomocí membránového váčku, což je vchlípenina na plazmatické membráně, která pohlcovanou látku obklopí. Jedná se většinou o malé váčky (0,05-0,1 μm). Endocytóza (vychlívování váčků dovnitř) je rozdělena do dvou typů - selektivní a neselektivní.

Nejčastěji využívaným mechanismem při endocytóze je klatrinem zprostředkovaná endocytóza (viz kapitola 2.5.2), na kaveolinu závislá endocytóza (viz kapitola 2.5.3), makropinocytóza (viz kapitola 2.5.4) a fagocytóza (viz kapitola 2.5.1). Dalšími druhy endocytických mechanismů jsou CLICK/GEEC endocytóza, IL2R β dráha, Arf6-závislá dráha, na flotillinu závislá endocytóza a entóza (Doherty *et al.*, 2009).

Jednotlivé membránové váčky, které vzniknou při endocytóze, se spojují a molekuly v nich obsažené jsou buď recyklovány zpátky na plazmatickou membránu v podobě časného a recyklujícího endozomu, nebo jsou určeny pro degradaci v pozdním endozomu a lysozomu (Obr. 11) (Falcone *et al.*, 2006, McMahon *et al.*, 2011).



Obr. 11: Endocytické cesty závislé na klatrinu a nezávislé na klatrinu. Převzato z (McMahon *et al.*, 2011).

2.5.1 Fagocytóza

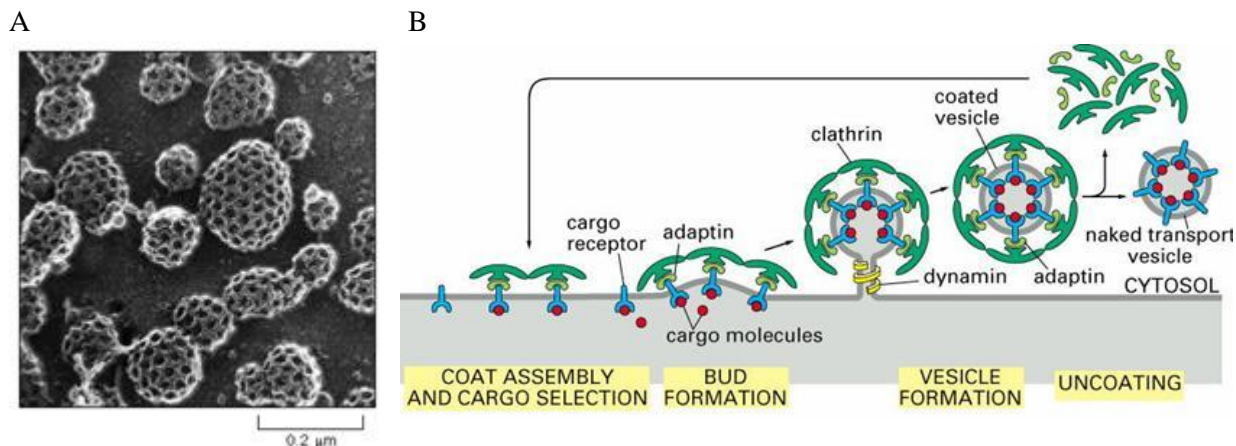
Fagocytóza je buněčný proces pohlcování pevných částic z vnějšího prostředí zprostředkovaný aktinem. Specializované buňky, jako jsou bílé krvinky nebo makrofágy, ze svého okolí endocytují bakterie, viry nebo cizí a poškozené buňky. Pohlcované částice bývají větší než cca 0,75 μm v průměru. Fagocytóza bývá často velmi specifická, protože může být podmíněna vazbou specifických protilátek na povrch bakterií (Pollard *et al.*, 2008).

2.5.2 Receptory zprostředkovaná endocytóza závislá na klatrinu

Receptory zprostředkovaná endocytóza je specifické zachycení a pohlcení vnějších molekul (živin, vitamínů či koenzymů) rozpoznaných buněčnými receptory. Částice přicházející z vnějšího prostředí mají na svém povrchu molekuly, pro které existují specifické receptory v cytoplazmatické membráně. Receptory s navázanými částicemi se začnou shlukovat a zahušťovat transportované látky. Formování klatrinových váčků je rozděleno do pěti stádií: nukleace, výběr nákladu (cargo selection), opláštění, odštěpení váčku a odpláštění. V jednom váčku mohou být přepravovány různé receptory se svými ligandy. Selektivitu proteinů přepravovaných klatrinovými váčky zajišťují adaptorové proteiny AP2 přítomné ve vnitřní vrstvě klatrinového pláště. Na adaptorové proteiny se navazují klatrinové podjednotky a vzniká pupen, který se za pomoci dynaminu po vytvoření váčku odštěpí (McMahon *et al.*, 2011). Po proběhnutí celého procesu jsou receptory recyklovány zpět na plazmatickou membránu (Grant *et al.*, 2009).

Velikost klatrinových váčků je okolo 100-200 nm. Hlavní součástí lešení tvořícího klatrinový plášť jsou 3 těžké řetězce (každý o velikosti 190 kD) a 3 lehké řetězce klatrinu (o velikosti 25 kD), které tvoří tzv. triskelion. Jednotlivé triskeliony se přikládají k sobě a tvoří váček o struktuře kulaté sítě s 5-6 úhelníkovými oky (Obr. 12A). Odštěpení klatrinových váčků z plazmatické membrány zajišťuje G protein dynamin, jenž na úkor GTP polymeruje okolo zaškrvení, dokud se váček neoddělí (Obr. 12B) (Pollard *et al.*, 2008).

Klatrinem zprostředkovaná endocytóza je nejlépe prozkoumanou endocytickou dráhou, kterou využívá většina buněk. Tímto mechanismem jsou přepravovány např. LDL (low density lipoprotein), transferin, peptidové hormony (inzulin), růstové hormony a některé glykoproteiny (Benmerah *et al.*, 2007, Rappoport, 2008). K její charakterizaci se používá transferin, coby marker klatrin-dependentní endocytózy (Mousavi *et al.*, 2004).

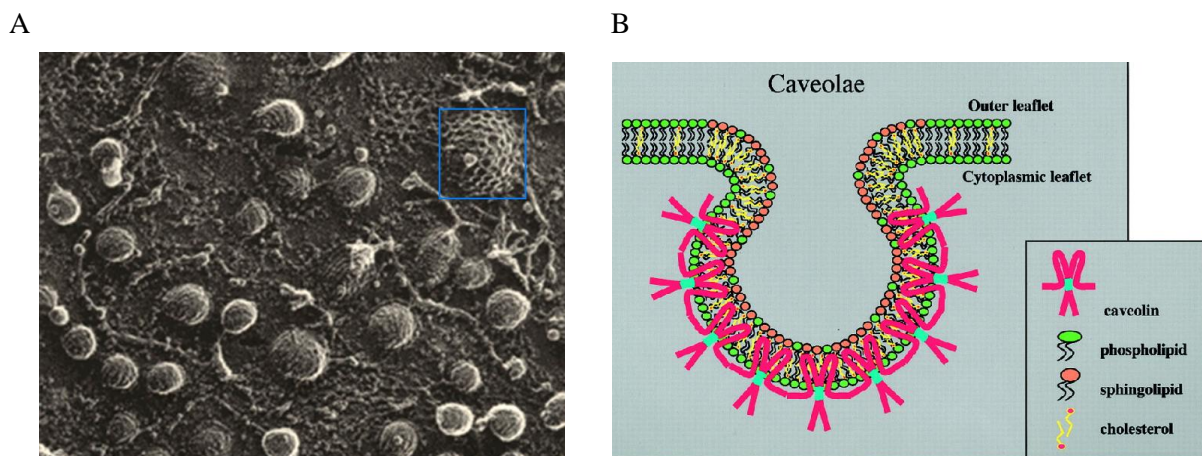


Obr. 12: A. Elektronmikroskopický snímek klatrinových váčků pučících z vnitřní strany plazmatické membrány. Převzato z (Alberts *et al.*, 2007)

B. Selektivní transport zprostředkovaný klatrinovými váčky. Převzato z (Alberts *et al.*, 2007)

2.5.3 Na kaveolách závislá endocytóza

Kaveoly (Obr. 13A) byly díky rozvoji elektronové mikroskopie prvně pozorovány již v 50. letech 20. století. Později se ukázalo, že jde o typ membránového raftu (Rothberg *et al.*, 1992). Jsou to drobné jamkovité vchlípeniny o rozměrech 50-100 nm, které byly doposud nalezeny pouze v plazmatické membráně buněk některých tkání, jako je hladká svalovina, pneumocyty I typu, fibroblasty, adipocyty nebo endoteliální buňky (Lisanti *et al.*, 1994, Parton *et al.*, 2007). V těchto tkáních mohou představovat až třetinu plochy plazmatické membrány buňky.



Obr. 13: A. Kaveoly na vnitřní straně plazmatické membrány. Ve výřezu je pro srovnání klatrinový váček. Převzato z (Rothberg *et al.*, 1992).

B. Znárodnění strukturního proteinu kaveolinu, který formuje tvar kaveoly. Převzato a upraveno z (Razani *et al.*, 2002).

Pro kaveoly je typická přítomnost strukturního proteinu, který se nazývá kaveolin (Razani *et al.*, 2002), a který odpovídá za zakřivení membrány a zformování kaveoly o dané velikosti a tvaru (Obr. 13B). C-terminální konec molekuly kaveolinu je posttranslačně modifikován palmitoylací, která pravděpodobně souvisí s lokalizací proteinů do lipidových raftů (podobně jako myristoylace řady bílkovin) (Galbiati *et al.*, 1999). N-terminální cytosolická doména kaveolinu může interagovat s jinými proteiny, jenž se takto koncentrují v oblasti kaveol. Vazba na kaveolin může mít jak aktivační, tak inhibiční vliv na jejich signalizační funkci (Lisanti *et al.*, 1994, Jacobson *et al.*, 1999).

2.5.4 Makropinocytóza

Příkladem neselektivní endocytózy je pinocytóza (nazývaná též buněčné pití „cell drinking“), kdy buňka kontinuálně, ale náhodně, invaginuje kousek membrány a neselektivně přijímá tekutý obsah z vnějšího prostředí včetně všech přítomných částic. Morfologicky je makropinocytóza doprovázena přestavbou plazmatické membrány. Dochází k polymerizaci aktinových vláken, což je doprovázeno tvorbou lamelipodií (proces nazývaný jako „membrane ruffling“). Po uzavření lamelipodií jsou od membrány odškrcovány velké váčky o průměru 0,2-5 μm , nazývané makropinozomy (Swanson *et al.*, 1995). Makropinozomy poté putují do cytosolu, kde fúzí s ostatními váčky, jako jsou endozomy a lysozomy (Falcone *et al.*, 2006). Makropinocytóza se vyskytuje jak u jednobuněčných tak u mnohobuněčných organismů. Od svého objevení v roce 1931 byla studována mnoha různými přístupy, ale její přesný mechanismus není ještě znám. Intenzita pinocytózy je u některých buněk velmi vysoká, např. u makrofágů se spotřebuje celá plazmatická membrána na tvorbu pinocytárních měchýřků za ½ hodiny. Tento proces ale vyžaduje velké množství ATP. Velikost váček je poměrně velká, pohybuje se v rozmezí 0.5–5 μm .

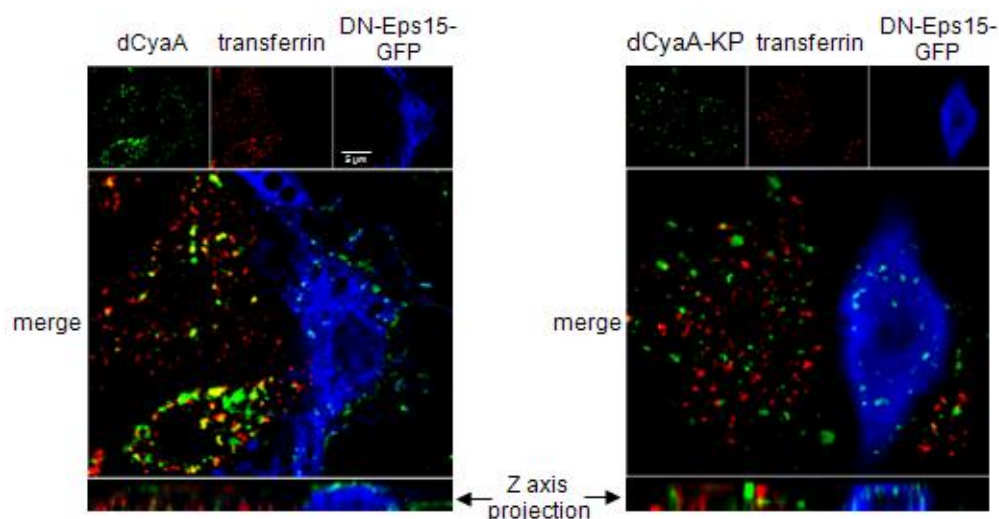
Tento imunologicky významný proces je napadán celou řadou patogenních organismů, jako jsou viry (Mercer *et al.*, 2008) a bakterie (Garcia-Perez *et al.*, 2008). Patogeny se touto cestou snaží vstoupit do ideálního prostředí uvnitř hostitelské buňky (Alpuchearanda *et al.*, 1994) nebo brání tomuto procesu jako takovému (Kamanova *et al.*, 2008).

2.5.5 Endocytóza CyaA a jeho mutantních variant

Na rozdíl od mnoha ostatních enzymatických toxinů, cytotoxická aktivita CyaA není závislá na jeho receptorem zprostředkované endocytóze. CyaA může se sníženou účinností

penetrovat i buňky postrádající receptor CD11b/CD18, jako jsou erythrocyty nebo epiteliální buňky (Vojtova *et al.*, 2006, Eby *et al.*, 2010). Navíc inhibice známých endocytických drah neovlivňuje translokaci AC domény skrz buněčnou membránu ani následné zvýšení cAMP uvnitř buněk (Gordon *et al.*, 1988, Guernonprez *et al.*, 1999). CyaA je také schopný doručit svou AC doménu do savčích erythrocytů postrádajících endocytický mechanismus (Bellalou *et al.*, 1990). Nedávno bylo ukázáno, že navzdory vazbě na CD11b/CD18, CyaA konstrukty postrádající pór-formující doménu selhaly v doručení antigenů pro prezentaci dendritickými buňkami (data nepublikována). To naznačuje, že funkční integrita pór-formující domény je důležitá pro endocytický proces CyaA.

V jedné z recentních prací bylo ukázáno, že skrze mobilizaci vápenatých iontů do buněk je řízena cesta a kinetika endocytického odstranění toxinových pórů z buněčné membrány myši makrofágové linie J774A.1. Schopnost vyvolat vtok Ca^{2+} způsobí zpoždění endocytického odstranění CyaA z buněčné membrány a tím umožní maximalizovat svou kapacitu permeabilizovat fagocyty póry toxinu. V práci byly použity buňky transfekované dominantně negativní mutantou Eps15 fúzovanou s GFP (DN-Eps15-GFP). Tyto buňky postrádají klatrin-dependentní endocytózu (na Obr. 14 jsou znázorněny modrou barvou). Na obrázku je dále zeleně zobrazena vazba detoxifikovaného CyaA (dCyaA) na buňky a červeně je zobrazen transferin, který se používá jako klasický ligand při studiu klatrin-dependentní endocytózy (Fiser *et al.*, 2012).



Obr. 14: Endocytóza toxoidu dCyaA mechanismem závislým na klatrinu. Převzato a upraveno z (Fiser *et al.*, 2012).

Toxoid dCyaA byl zjištěn převážně na plazmatické membráně J774A.1 buněk ještě po 20 minutách inkubace, zatímco dCyaA-KP toxoid byl masivně nahromaděn v endocytických váčcích rozprostřených v buněčném cytosolu během 5 minut po přidání toxoidu. Téměř kompletně pak byl odstraněn z buněčné membrány během 10 minut. Kolokalizace transferinu s toxoidem dCyaA se zvyšovala v čase (po 20, 40 a 60 minutách inkubace), naopak u toxoidu dCyaA-KP nebyla ve stejných časových intervalech pozorována žádná, nebo jen zanedbatelná kolokalizace s transferinem. Oba toxoidy jsou tedy nejspíš zpracovány rozdílnými endocytickými cestami. Pro vstup obou toxoidů je ovšem nutná vazba na CD11b/CD18.

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo potvrdit rozdílný způsob endocytózy u myších primárních buněk derivovaných z kostní dřeně (BMDC) a posléze u lidské tkáňové linie K562. Dále jsem chtěla objasnit mechanismus endocytózy buněk v souvislosti s aktivací integrinového receptoru CD11b/CD18 po navázání modifikovaných variant toxinu. Cíl práce jsem shrnula do dvou otázek:

1. Závise způsob endocytózy CyaA-KP a CyaA-AC⁻ na aktivaci integrinu?
2. Je CyaA schopný aktivovat integrinový receptor pomocí vtoku extracelulárních Ca²⁺ iontů?

4 Experimentální část

4.1 Přístroje, chemikálie a ostatní materiál

4.1.1 Seznam použitých přístrojů

Bürkerova komůrka, Marienfeld, SRN.

Centrifuga Biofuge pico, Heraeus Instruments, SRN

Centrifuga Eppendorf 5415 R, Eppendorf AG, SRN

Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA

Centrifuga Universal 32R, Hettich Zentrifugen, SRN

CO₂ inkubátor IG 150, Jouan, Francie

CO₂ inkubátor MCO-17AIC, SANYO Electric Biomedical Co., Ltd., Japonsko

Digitální analytické váhy AB-104 S, Mettler Toledo, USA

Digitální váhy HF-2000G, A&D Weighing, USA

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

Elektroforéza Wide Mini Sub Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Fluorescenční invertovaný mikroskop IX 81 Cell^R, Olympus, Japonsko

Fluorescenční průtokový cytometr BD LSR II, Biosciences, USA

Fluorescenční průtokový cytometr s buněčným sortem BD FACS Vantage, Biosciences, USA

Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko

Laboratorní třepačka LT-2, Kavalier, ČR

Laboratorní třepačka Innova43R, New Brunswick Scientific, USA

Laminární box BioStar, Telstar, Španělsko

Laminární box MSC 12, Jouan, Francie

Mikrovlnná trouba, Daewoo, Korea

Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Itálie

Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Francie

pH-metr inoLab Level 1, WTW, SRN

Předvážky Nagema, OWA Labor, SRN

Spektrofotometr S2100 Diode Array Spectrophotometer, Biowave, USA

Spektrofotometr SECOMAM S.250I, Alc-SECOMAM, Francie

Termostatovaná vodní lázeň Asistent 3180, Karl Hecht, SRN

Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, SRN

Termostatovaný suchý blok Digital Dry Bath, Labnet International Inc., USA

Ultrasonikátor S3000, Misonix, USA

Vortex MS 1, IKA-Works, Inc., USA

Vortex MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA

Zařízení pro izolaci DNA (Lego-kit), Serva Electrophoresis, USA

Zdroj napětí Bio Rad Power-Pac 1000, Bio Rad, ČR

Zdroj pro elektroforézu Power PAC 300, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Zdroj UV záření, Ultra Violet Products, Inc., USA

4.1.2 Seznam použitých chemikálií

β -merkaptoethanol; Calbiochem, SRN

λ -DNA; MBI Fermentas, Litva

Agaróza pro DNA elektroforézu; Appligene, Francie

Akrylamid; Serva Electrophoresis, SRN

Ampicillin; Biotica, SR

Antibiotika pro tkáňové kultury: Antibiotic Antimycotic Solution (100 \times koncentrovaný)
10 000 U/ml penicilinu G, 10 mg/ml streptomycinu a 25 μ g/ml amphotericinu B;
Sigma-Aldrich, USA

Bakteriologický agar; Oxoid, UK

Bakto-trypton; Oxoid, Velká Británie

Bromfenolová modř; Sigma-Aldrich, USA

Coomassie Brilliant Blue R250; Serva Electrophoresis, SRN

Coomassie Brilliant Blue G250; Serva Electrophoresis, SRN

DEAE-Sepharosa; Sigma-Aldrich, USA

Deionizovaná voda (dH₂O); Přípravna médií ÚMG AV, ČR

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄); Sigma-Aldrich, USA

Dimethylsulfoxid (DMSO); Sigma-Aldrich, USA

Dithiothreitol (DTT); Serva Electrophoresis, SRN

DMEM médium; Přípravna médií ÚMG AV, ČR

Dodecylsulfát sodný (SDS); Serva Electrophoresis, SRN

DY-647-NHS-ester; Dyomics GmbH, SRN

Ethanol, Lach:NER, ČR

Ethidium bromid; Sigma-Aldrich, USA
F 12 médium; Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Fetální hovězí sérum (FBS); Gibco, SRN
Fibronektin lidský; Sigma-Aldrich, USA
Formaldehyd; Chemapol group, ČR
FuGENE 6 Reagent; Roche, SRN
G418 antibiotikum 100 mg/ml; InvivoGen, USA
Glukóza 25% roztok (w/v); Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Glutamin 3% roztok (w/v); Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Glycerol; Penta, ČR
Glycin; Serva Electrophoresis, SRN
GM-CSF; produkované myším myelomovým kmenem P3X63
Hovězí sérový albumin (BSA); Roth, SRN
Hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4); Lach:Ner, ČR
Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO_3) 7,5% roztok; Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Hydroxid draselný; Lachema, ČR
Hydroxid sodný (NaOH); Lachema Brno, ČR
Chlorid amonný (NH_4Cl); Sigma-Aldrich, USA
Chlorid draselný (KCl); Lach:Ner, ČR
Chlorid hořečnatý (MgCl_2); Fluka, Švýcarsko
Chlorid sodný (NaCl); Lach:Ner, ČR
Chlorid vápenatý (CaCl_2); Lachema, ČR
Izopropanol; Lach:Ner, ČR
Izopropyl β -D-thiogalactopyranozid (IPTG); Enzo Life Sciences, USA
Kanamycin; Sigma-Aldrich, USA
Kvasničný extrakt; Oxoid, Velká Británie
Kyselina boritá (H_3BO_3); Lach:Ner, ČR
Kyselina ethylenediaminetetraoctová (EDTA); Serva Electrophoresis, SRN
Kyselina ethylendiamintetraoctová 0,02 % (w/v); Přípravna médií, ÚMG AV, ČR
Kyselina chlorovodíková (HCl); Lach:Ner, ČR
Kyselina 4-(2hydroxyethyl)-1piperazinethansulfonová (HEPES); Serva Electrophoresis, SRN
Kyselina octová; Lach:Ner, ČR

Kyselina fosforečná (H_3PO_4); Lach:Ner, ČR
Lipofectamine 2000; Invitrogen, USA
Matrigel BD Matrix; BD Biosciences, USA
Methanol; Lach:Ner, ČR
Močovina; Merck, SRN
N,N,N',N'-tetramethyl-1,2-diaminomethan (TEMED); Merck, SRN
N,N'-metylen-bisakrylamid; Serva Electrophoresis, SRN
Octan draselný; Lachema, Neratovice, ČR
Octan sodný ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$); Fluka, USA
Opti-MEM I; Invitrogen, USA
Paraformaldehyd; Sigma-Aldrich, USA
PBS 10x koncentrovaný roztok; Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Persulfát amonný (APS); Serva Electrophoresis, SRN
Phenyl-Sepharosa; Sigma-Aldrich, USA
Poly-L-lysin; Sigma-Aldrich, USA
Proteinový velikostní standard 0661, nebarvený; Fermentas, Litva
Pyruvát sodný 1,1% roztok (w/v); Přípravna médií ÚMG AV, ČR
RPMI 1640 médium s NaHCO_3 ; Přípravna médií ÚMG AV, ČR
Síran hořečnatý (MgSO_4); Fluka, Švýcarsko
Síran sodný (Na_2SO_4); Sigma-Aldrich, USA
Tetracyklin hydrochlorid; Sigma-Aldrich, USA
Thiamin hydrochlorid; Calbiochem, SRN
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris báze); Serva Electrophoresis, SRN
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl); Serva Electrophoresis, SRN
Triton X-100; Serva, SRN
Uhličitan sodný (Na_2CO_3); Serva, SRN
Voda pro tkáňové kultury; ÚMG AV, ČR
Zeocin antibiotikum 100 mg/ml; InvivoGen, USA

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

4.1.3 Monoklonální protilátky

mAb CD11b-44-FITC (myší IgG1) – protilátka specifická pro lidský CD11b konjugovaná s FITC (fluoresceinizoithiokyanát), ředění 1:80 v kompletním HBSS.

mAb CD18-APC – protilátka specifická pro lidský CD18 konjugovaná s APC (allophycocyanin), ředění 1:25 v kompletním HBSS.

mAb CBRM – lidská protilátka preferenčně vázající otevřenou formu integrinu CD11b

mAb MEM-148 – lidská protilátka preferenčně vázající otevřenou formu integrinu CD18

Uvedené monoklonální protilátky byly uchovávány v alikvotech při -20 °C.

4.1.4 Pufry a roztoky

Barvicí roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	225 ml
H ₂ O	225 ml
Kyselina octová.....	50 ml
Coomassie Brilliant blue G250.....	0,5 g

BFB 5× koncentrovaný (pro DNA elektroforézu):

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

Borátový pufr 50 mM; pH 8,5:

H ₃ BO ₃ krystalická.....	160 mg
H ₂ O	ad 50 ml

pH 8,5 bylo upraveno pomocí NaOH. Pufr byl přefiltrován přes mikrofiltr.

Činidlo podle Bradfordové:

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

HBSS (Hank's balanced salt solution); pH 7,4:

HEPES pH 7,4	10 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
Glukóza	1 % (w/v)
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM

HBSS kompletní; pH 7,4:

HEPES pH 7,4	10 mM
NaCl	140 mM
KCl	5 mM
Glukóza	1 % (w/v)
CaCl ₂	2 mM
MgCl ₂	2 mM
FCS	1 % (w/v)

Octanový pufr; pH 3,5:

NaCl (5M)	1,5 ml
Octan sodný krystalický	0,68 g
H ₂ O	ad 50 ml

pH 3,5 bylo upraveno pomocí HCl

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	250 ml
H ₂ O	650 ml
Kyselina octová	100 ml

PBS; pH 7,4:

NaCl	138 mM
KCl	3 mM
Na ₂ HPO ₄	12 mM

KH_2PO_4 2 mM
pH 7,4 bylo upraveno pomocí HCl

PFA 4%:

Práškový paraformaldehyd 1,2 g
PBS 10× koncentrovaný 3 ml
 H_2O ad 30 ml

K rozpuštění paraformaldehydu byla použita 70 °C vodní lázeň

Roztok I:

Glukóza 50 mM
Tris-HCl pH 8,0 25 mM
EDTA 10 mM

Roztok II:

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

Roztok III:

Octan draselný 5 M 60 ml
Kyselina octová (ledová) 11,5 ml
 H_2O 28,5 ml

T pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,0 50 mM

TB pufr; pH 6,7:

HEPES 10 mM
 CaCl_2 15 mM
KCl 250 mM

K pufru byl přidán sterilní roztok chloridu manganatého (MnCl_2) do výsledné koncentrace:

MnCl_2 55 mM

pH 6,7 bylo upraveno pomocí 1M KOH.

Roztok byl sterilizován filtrací přes filtry s velikostí pórů 0,22 μm .

TBE pufr; pH 8,3:

Tris-Báze.....90 mM

H₃BO₃90 mM

EDTA.....2 mM

pH 8,3 bylo upraveno pomocí HCl

TCT pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM

CaCl₂.....0,2 mM

Triton X-1000,1 %

TE pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,010 mM

EDTA.....1 mM

TEU pufr (na odmytí membrán); pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM

EDTA.....2 mM

Močovina4 M

TN pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM

NaCl150 mM

TN-A pufr (Ekvilibrační pufr pro Phenyl-Sepharosu); pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM

NaCl1 M

TNE pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM
NaCl120 mM
EDTA2 mM

Tris-glycinový pufr:

Tris25 mM
glycin pH 8,3250 mM
SDS 0,1 % (w/v)

TU pufr (Eluční pufr pro Phenyl-Sepharosu); pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM
Močovina8 M

TUN-A pufr (Ekvilibrační pufr pro DEAE-Sepharosu); pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM
Močovina8 M
NaCl120 mM

TUN-B pufr (Eluční pufr pro DEAE-Sepharosu); pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM
Močovina8 M
NaCl200 mM

TUS pufr; pH 8,0:

Tris-HCl pH 8,050 mM
Močovina8 M
SDS 1 % (w/v)

Uhličitanový pufr; pH 8,3:

Na₂CO₃ pH 8,0100 mM
pH 8,3 bylo upraveno pomocí HCl

Uchovávací roztok pro SDS-PAGE:

Methanol	25 ml
H ₂ O	450 ml
Glycerol	25 ml

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:

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

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

4.1.5 Složení gelů**Agarózový gel 0,6 %**

TBE pufr	400 ml
Agaróza	2,4 g
Ethidium bromid	15 μl

Agarózový gel 1 %

TBE pufr	400 ml
Agaróza	4 g
Ethidium bromid	15 μl

Roztok akrylamidu pro SDS-PAGE 30 %:

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

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

Akrylamid (30% roztok)	1,24 ml
H ₂ O	1,8 ml
Tris (1 M, pH 8,8).....	1,87 ml
SDS (10 %)	50 µl
APS (25 %)	12,5 µl
TEMED.....	12,5 µl

Zaostřovací gel 5 % pro SDS-PAGE; pH 6,8:

Akrylamid (30% roztok).....	266 µl
H ₂ O	1,23 ml
Tris-HCl (1 M, pH 6,8).....	200 µl
SDS (10 %)	60 µl
APS (20 %)	20 µl
TEMED.....	5 µl

4.1.6 Kultivační média**DC-RPMI médium na izolaci a maturaci BMDC:**

Glutamin 3%	5 ml
Glukóza 25%.....	9 ml
ATB (100x konc.; Sigma-Aldrich)	5 ml
Fetální hovězí sérum (FCS)	50 ml
Pyruvát sodný 1,1%	2,5 ml
β-merkptoethanol	50 µM
GM-CSF.....	20 ng/ml
RPMI + NaHCO ₃	450 ml

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium):

Vyrobeno v přípravně médií, ÚMG AV ČR

F12 médium na kultivaci CHO buněk:

Základ F12 média byl vyroben v přípravě médií ÚMG AV ČR (5,75 g práškového média bylo rozpuštěno v 16,7 ml 7,5 % NaHCO₃, objem byl doplněn vodou pro tkáňové kultury do 450 ml. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 7,3 a médium bylo přefiltrováno přes 0,22 µm filtr).

K takto připravenému základu bylo přidáno:

FCS 50 ml
ATB (100× konc.; Sigma-Aldrich)..... 5 ml

Selekční F12 médium na kultivaci CHO buněk:

Do připraveného kompletního F12 média bylo přidáno selekční antibiotikum G418 (což je Geneticin - směs neomycinu a kanamycinu) do výsledné koncentrace 1 mg/ml.

LB (Luria-Bertani médium) médium na kultivaci *E. coli*:

Bakto-trypton 10 g
Kvasničný extrakt 5 g
NaCl 10 g
dH₂O ad 1 000 ml

pH 7,0 bylo upraveno pomocí 5M NaOH

Na přípravu LB-agaru bylo do hotového LB média přidáno 18 g/l bakteriologického agaru.

Sterilizace proběhla při 0.12 MPa po dobu 20 minut.

MDO (moyenne densité optique) médium na kultivaci *E. coli*:

KH₂PO₄..... 1 g
K₂HPO₄..... 3 g
NH₄Cl 2 g
Na₂SO₄..... 0.5 g
Thiamin..... 10 mg
Kvasničný extrakt..... 20 g
Glycerol 20 g
dH₂O ad 1 000 ml

Sterilizace proběhla při 0.12 MPa po dobu 20 minut.

RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) médium na kultivaci K562:

Glutamin 3%	5 ml
Glukóza 25%.....	9 ml
ATB (100× konc.; Sigma-Aldrich).....	5 ml
Fetální hovězí sérum (FCS)	50 ml
Pyruvát sodný 1,1%	2,5 ml
HEPES 1M (zfiltrovaný)	5 ml
RPMI + NaHCO ₃	450 ml

Selekční RPMI 1640 médium na kultivaci K562:

Do připraveného kompletního RPMI 1640 média bylo přidáno selekční antibiotikum Zeocin do výsledné koncentrace 300 µg/ml a G418 do výsledné koncentrace 500 µg/ml.

SOB (Super Optimal Broth) médium na kultivaci superkompetentních buněk:

Bakto-trypton	2 % (w/v)
Kvasničný extrakt	0.5% (w/v)
NaCl.....	10 mM
KCl.....	2,5 mM
dH ₂ O	ad 1 000 ml

Médium bylo sterilizováno v autoklávu při 0.12 MPa, 20 minut.

Ke sterilnímu médiu byly přidány sterilní roztoky solí do konečné koncentrace:

MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Takto připravené médium bylo uchováváno při 4 °C.

Médium s ampicilinem, kanamycinem či tetracyklinem:

Připraví se požadované médium LB nebo MDO (4.1.6). Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml, nebo kanamycin do výsledné koncentrace 60 µg/ml, nebo tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µg/ml. Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

4.1.7 Použité plazmidy

pCACT3 (Institut Pasteur, Francie) - nese gen kódující protein CyaA a gen kódující protein CyaC nezbytný pro posttranslační modifikaci CyaA. Oba geny jsou pod kontrolou *lacZ* promotoru, který je indukovatelný IPTG (isopropyl- β -D-thyogalactopyranosidem). Plazmid nese rovněž gen pro rezistenci k ampicilinu (Betsou *et al.*, 1993). Plazmid byl použit pro expresi divokého typu toxinu CyaA v buňkách *E. coli*.

pCACT3-E570K+E581P - varianta odvozená z plazmidu pCACT3 nesoucí bodové mutace v genu CyaA. V plazmidu pCACT3-E570K+E581P byl nahrazen kodon pro zbytek kyseliny glutamové (E) v pozici 570 genu *cyaA* kodonem pro lyzinový zbytek (K) a zbytek kyseliny glutamové (E) v pozici 581 genu *cyaA* kodonem pro prolinový zbytek (P) (Vojtova-Vodolanova *et al.*, 2009). Plazmid byl použit pro expresi proteinu CyaA-E570K+E581P v buňkách *E. coli*.

pT7CACT1-E5 - varianta odvozená z plazmidu pT7CACT1 nesoucí bodové mutace v genu *cyaA*. Plazmid pT7CACT1-E5 byl vytvořen dipeptidovou inzercí CysThr mezi aminokyselinové zbytky v pozicích 188 a 189, rušící ATP vazebné místo CyaA. Tato mutace vede ke ztrátě enzymatické, adenylátcyklázové aktivity CyaA, který tak není schopný přeměňovat ATP na cAMP (Osicka *et al.*, 2000). Plazmid byl použit pro expresi proteinu CyaA-AC⁻ v buňkách *E. coli*.

pcDNA3_CD11b – do plazmidu pcDNA3 (Invitrogen, USA) byla vložena cDNA kódující podjednotku integrinu CD11b (laskavý dar od D. Golenbocka z Boston University School of Medicine, USA). Plazmid nese zároveň gen pro rezistenci k ampicilinu.

pcDNA3.1_Zeo(+)_CD18 - do plazmidu pcDNA3.1_Zeo(+) (Invitrogen, USA) byla vložena cDNA kódující podjednotku integrinu CD18 (laskavý dar od D. Golenbocka z Boston University School of Medicine, USA). Plazmid nese zároveň gen pro rezistenci k ampicilinu.

α_M -mCFP – laskavý dar od Dr. Minsoo Kim z David H. Smith Center for Vaccine Biology and Immunology, NY, USA (Lefort *et al.*, 2009). Plazmid nese rezistenci na Kanamycin. Plazmid byl použit pro expresi podjednotky integrinu CD11b fúzovanou s CFP.

β_2 -mYFP - laskavý dar od Dr. Minsoo Kim z David H. Smith Center for Vaccine Biology and Immunology, NY, USA (Lefort *et al.*, 2009). Plazmid nese rezistenci na Kanamycin. Plazmid byl použit pro expresi podjednotky integrinu CD18 fúzovanou s YFP.

4.1.8 Bakteriální kmeny

Escherichia coli **XL-1 Blue** (Stratagene, USA) [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZΔM15Tn10(Tet^r)]*] byl použit pro transformaci plazmidovými DNA a produkci CyaA. Kmen nese gen pro rezistenci na tetracyklin.

Escherichia coli **BL21/pMM100** (Stratagene) byl použit pro produkci CyaA. Tento kmen byl vytvořen transformací bakterií kmene *E. coli* BL21 plazmidem pMM100, který kóduje represor *lacI^q*, což brání bazální expresi z promotoru *lacZ*.

4.1.9 Tkáňové linie

K562 - (ATCC - American Type Culture Collection, katalogové číslo. CCL-243, USA). Lidská suspenzní linie buněk získaná z kostní dřeně pacienta s chronickou myelogenní leukémií (CML). Kultivovány v médiu RPMI 1640.

CHO-K1 - (z anglického Chinese Hamster Ovary) (ATCC - American Type Culture Collection, katalogové číslo. CCL-61, USA). Adherentní linie získaná z vaječníků křečka čínského (*Cricetulus griseus*). Kultivovány v médiu F12.

4.1.10 Primární buňky

BMDC dendritické buňky odvozené z kostní dřeně (z angl. Bone Marrow-derived Dendritic Cells) byly připraveny vždy pro okamžité použití (4.2.8.6) a kultivovány v DC-RPMI médiu. Pro svou práci jsem využívala BMDC buňky diferencované do podoby makrofágů.

4.1.11 Mutantní varianty CyaA

CyaA-AC⁻ - mutantní varianta CyaA, která není schopná přeměny ATP na cAMP.

CyaA-E570K+E581P - mutantní varianta CyaA označovaná též jako CyaA-KP nebo CyaA-KP-AC⁺, která není schopná tvořit póry v membráně cílové buňky a má pouze omezenou schopnost translokace AC doměny do cytosolu cílové buňky.

CyaA-E570K+E581P-AC⁻ - mutantní varianta CyaA označovaná též jako CyaA-KP-AC⁻ se stejnou definicí jako CyaA-E570K+E581P, navíc neschopná přeměny ATP na cAMP.

Tabulka 1: Charakterizace mutantních variant CyaA

protein	AC aktivita	translokace AC domény	vtok Ca ²⁺
CyaA	+	100	+++
CyaA-AC ⁻	-	~ 100	+++
CyaA-E570K+E581P-AC ⁺	+	2±1	-
CyaA-E570K+E581P-AC ⁻	-	2±1	-

4.2 Metody a pracovní postupy

4.2.1 Uchovávání bakteriálních kmenů

Kmeny *E. coli* XL1-Blue a *E. coli* BL21/pMM100 byly krátkodobě uchovávány na tuhém LB médiu s příslušným antibiotikem při 4 °C. Dlouhodobě byly uchovávány zamražené při -80 °C. Kultura narostlá v tekutém LB médiu do stacionární fáze byla smíšena se 40% glycerolem v poměru 1:1, ponechána 20 minut na ledu a zamražena v -80 °C.

Transformanty bakteriálních kmenů vzniklé vnesením plazmidové DNA do superkompetentních buněk *E. coli* (kapitola 4.2.3.8) byly krátkodobě uchovávány na tuhém LB médiu s příslušným antibiotikem při 4 °C.

4.2.2 Příprava superkompetentních buněk *Escherichia coli*

Na Petriho misku s tuhým LB médiem s tetracyklinem byla nanesena suspenze buněk dlouhodobě uchovávaného kmene *E. coli*, která byla kultivována při 37 °C přes noc. Poté byly 3 kolonie *E. coli* z tuhého LB média zaočkovány do 50 ml tekutého LB média s tetracyklinem a kultura byla kultivována přes noc při teplotě 37 °C. Druhý den následovalo přenesení 5 ml inokula bakteriální kultury do 500 ml SOB média a za neustálého třepání se pokračovalo v kultivaci při 37 °C. Po dosažení požadované optické denzity (OD₆₀₀ = 0,6) byla kultura prudce ochlazená v lázni voda-led a poté odstředována (6000 g, 10 minut, 4 °C). Sediment bakteriálních buněk *E. coli* byl 2× propláchnut ledovým TB pufrem a poté resuspendován ve 32 ml ledového TB pufru. Následovala inkubace buněčné suspenze v lázni voda-led (10 minut, 4 °C) a opětovné odstředění buněk (6000 g, 10 minut, 4 °C). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk v každé centrifugační zkumavce

resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru. K buněčné suspenzi bylo po kapkách přidáno DMSO do výsledné koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v ledové lázni (10 minut, 4 °C) byla buněčná suspenze rozplněna po 200 µl do mikrozkušavek a zamražena v tekutém dusíku. Superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě -80 °C.

4.2.3 Izolace a manipulace s plazmidovou DNA

4.2.3.1 Minipreparace plazmidové DNA

Z transformovaných bakterií byla požadovaná plazmidová DNA získána alkalickou lyzí. Několik čerstvě narostlých bakteriálních kolonií bylo zaočkováno do 2 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem a kultura byla kultivována za nepřetržitého třepání při 37 °C přes noc. Následující den byla bakteriální kultura pečlivě promíchána, bylo odebráno 1,5 ml suspenze, která byla odstředována (10000 g, RT, 60 s). Sediment byl resuspendován ve 100 µl Roztoku I a inkubován 5 minut při pokojové teplotě. K této směsi bylo přidáno 200 µl Roztoku II, čímž došlo k lyzi buněk, směs byla promíchána pomalou inverzí a inkubována v lázni voda-led 5 minut. K lyzovaným buňkám bylo přidáno 150 µl neutralizačního Roztoku III a směs byla opět promíchána inverzí a inkubována 15 minut při 4 °C. Odstředěním (10000 g, 4 °C, 15 minut) byly odstraněny zbytky buněčných struktur, vysrážené proteiny a chromozomální DNA. Supernatant byl převeden do nové mikrozkušavky a plazmidová DNA byla sražena stejným objemem izopropanolu (400 µl). Následovalo promíchání směsi (Vortex MS1), 10 min inkubace v lázni voda-led a opět odstředování (10000 g, 4 °C, 15 minut). Po odstředění byl sediment sražené DNA promyt 1 ml 70 % (v/v) ethanolu a vysušen 10 minut na vzduchu. DNA byla následně rozpuštěna ve 40 µl TE pufru pH 8,0 doplněným o termostabilní pankreatickou RNAzu (20 µg/ml). Směs byla inkubována 30 minut při 70 °C. Plazmidová DNA byla dlouhodobě uchovávána při teplotě -20 °C.

4.2.3.2 Minipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio)

Minipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio) byla použita v případě, kdy byla požadována vyšší čistota DNA. Počáteční postup se shodoval s minipreparací plazmidové DNA pro běžnou práci (za použití Roztoků I, II a III, kapitola 4.2.3.1) až do okamžiku získání supernatantu obsahujícího plazmidovou DNA. Pro zajištění vazby plazmidové DNA na kolonu ze sady LEGO (Top-Bio), byl k získanému supernatantu

přidán “DNA Vazebný Pufř” (Top-Bio). Tato směs byla nanesa na minikolonku obsahující 100 μ l “DNA Vazebných Partikulí” (TOP-Bio) a minikolonka byla dvakrát promyta 2 ml “Promývacího pufřu” (Top-Bio). Plazmidová DNA byla z minikolonky eluována pomocí 50 μ l dH₂O předeřřáté na 50 °C.

4.2.3.3 Midipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio)

Midipreparace plazmidové DNA pomocí sady LEGO (Top-Bio) byla použita v případě, když byla plazmidová DNA požadována pro transfekci. Několik čerstvě narostlých bakteriálních kolonií s požadovanou plazmidovou DNA bylo zaočkováno do 50 ml tekutého LB média s příslušným antibiotikem a kultura byla kultivována za nepřetržitého třepání při 37 °C přes noc. Druhý den byly odstředováním (6000 g, 4 °C, 10 minut) odděleny bakteriální buňky a pelet byl resuspendován v 1 ml Roztoku I. Suspenze buněk byla rozdělena do tří mikrozkuavek ana partes aequales. Do každé mikrozkuavky bylo přidáno 500 μ l lyzačního Roztoku II a směs byla promíchána pomalou inverzí. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 5 minut. Poté bylo přidáno 500 μ l neutralizačního Roztoku III a obsah byl opět promíchán pomalou inverzí. Odstředováním (10000 g, RT, 2 \times 5 minut) byly odstraněny vysrážené proteiny, chromozomální DNA a ostatní buněčné struktury. Supernatant ze všech tří mikrozkuavek byl přenesen do 10ml zkuavky a byl přidán stejný objem (3-4 ml) „DNA vazebného pufřu“ (Top-Bio). Do dvou minikolonek ze sady LEGO bylo vřaveno 250 μ l “DNA Vazebných Partikulí” (TOP-Bio), které byly v průběhu odběru neustále promíchávány magnetickým míchadlem. Obsah zkuavky byl postupně nanesen do dvou minikolonek napojených na vakuovou pumpu a při mírnému podtlaku se nechal protékat. Následně byly minikolonky s navázanou plazmidovou DNA 4 \times promyty vždy 1 ml “ DNA Promývacího pufřu” (Top-Bio) a přeneseny do nové mikrozkuavky. Odstředováním (10000 g, RT, 2 minuty) byly odstraněny zbytky promývacího pufřu. Minikolonky byly přendány do sterilních mikrozkuavek a plazmidová DNA byla pomocí odstředování (10000 g, RT, 1 minuta) eluována 50 μ l sterilní deionizované vody předeřřáté na 50 °C. Takto připravená plazmidová DNA byla uchovávána při –20 °C.

4.2.3.4 Pročištění plazmidové DNA určené k transfekci

Ke 100 μ l plazmidové DNA získané midipreparativní izolací (4.2.3.3) a určené pro transfekci buněk bylo přidáno 10 μ l 3M octanu draselného (pH 8,0) a obsah byl řádně

promíchán. Následně bylo přidáno 300 μ l vychlazeného 97% ethanolu a obsah byl opět pečlivě promíchán. Směs byla odstředována (10000 g, 4 °C, 5 minut). Supernatant byl opatrně odstraněn a suspenze vysrážené DNA byla propláchnuta 1 ml 70% ethanolu. Po vysušení ethanolu bylo k plazmidové DNA přidáno 50 μ l sterilní H₂O. Takto pročištěná plazmidová DNA byla uchovávána při -20 °C.

4.2.3.5 Štěpení plazmidové DNA restrikčními endonukleázami

Roztok plazmidové DNA (5 μ l) získaný midipreparativní izolací (kapitola 4.2.3.3) byl smíchán s 2 μ l 10 \times koncentrovaného NEB pufru (příslušného k použitému enzymu) a 2 μ l 10 \times koncentrovaného BSA (pokud jej použitý enzym vyžadoval). Objem byl doplněn do 20 μ l deionizovanou vodou a pečlivě promíchán. Ke směsi byly přidány 1 až 2 U požadované restrikční endonukleázy a směs byla inkubována 2-3 hodiny ve vodní lázni při 37 °C.

4.2.3.6 Stanovení koncentrace plazmidové dsDNA

Z roztoku plazmidové DNA získaného minipreparativní izolací (kapitola 4.2.3.1, 4.2.3.2), midipreparativní izolací (kapitola 4.2.3.3), případně plazmidové DNA štěpené restrikčními endonukleázami (kapitola 4.2.3.5) byly odebrány 2 μ l vzorku. Vzorek byl naředěn 198 μ l TE pufru a přenesen do 0,5cm kyvety z křemenného skla. Na spektrofotometru (S2100 Diode Array Spectrophotometer, Biowave, USA) byla změřena absorbance při 260 a 280 nm. Z naměřených dat a na základě nastaveného ředění vzorku přístroj vypočítal výslednou koncentraci vzorku a z poměru $A_{260/280}$ i čistotu vzorku.

4.2.3.7 Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Na základě velikosti dělených fragmentů DNA byl použit agarózový gel v koncentraci 0,6 % (w/v) nebo 1 % (w/v). Tyto koncentrace gelů jsou vhodné pro rozlišení velikostí jednotlivých řetězců DNA. Gel byl připraven smícháním příslušného množství agarózy se 400 ml TBE pufru. Ke směsi byl přidán ethidium bromid do výsledné koncentrace 0,5 μ g/ml. Roztok na přípravu agarózového gelu byl zahříván, dokud se agaróza zcela nerozpustila v TBE pufru a následně ochlazen v 50 °C vodní lázni. Tekutý gel byl nalit do formy do výšky cca 1 cm a za snížené teploty se nechal zatuhnout. Forma s gelem byla vložena do zařízení na agarózovou elektroforézu a převrstvena TBE pufrem do výšky 3 mm nad gel. Ke vzorkům byl přidán 5 \times koncentrovaný BFB a vytvořená směs byla nanášena do jednotlivých jamek v gelu.

Jako standard byla použita DNA o známých velikostech fragmentů (λ DNA naštěpená restriční endonukleázou PstI). Zařízení na elektroforézu bylo zakryto a na elektrody bylo vloženo napětí o takové velikosti, aby vytvořený potenciálový gradient činil 5 V/cm. DNA rozdělená na jednotlivé fragmenty byla pozorována pod UV lampou. U všech gelů byl pořízen elektroforetogram pomocí dokumentačního systému Syngene G.

4.2.3.8 Transformace plazmidové DNA teplotním šokem

K 50 μ l rozmražených superkompetentních buněk *E. coli* (kapitola 4.2.1) bylo přidáno 1-2 μ l plazmidové DNA získané midipreparativní izolací (kapitola 4.2.3.3) a obsah byl opatrně zamíchán. Směs *E. coli* a DNA byla inkubována 15 minut v lázni voda-led při 4 °C a poté přenesena přesně na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C, kde byla kultura vystavena teplotnímu šoku. Směs byla poté ochlazována v lázni voda-led 2 minuty. K bakteriím byl přidán 1 ml tekutého LB média předeřátého na 37 °C a směs byla inkubována 60 minut ve 37 °C vodní lázni. Během této doby došlo k replikaci plazmidů uvnitř transformovaných buněk. Po hodině inkubace bylo vyseto 100–200 μ l suspenze buněk na Petriho misku s tuhým LB agarem obohaceným o příslušné antibiotikum (buď ampicilin v koncentraci 150 μ g/ml nebo kanamycin v koncentraci 60 μ g/ml). Bakterie byly inkubovány při 37 °C po dobu 12-16 hodin.

4.2.3.9 Sekvence plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla získána midipreparativní izolací pomocí sady Lego (4.2.3.3). Sekvence byla provedena na základě Sangerovy metody kombinované s technikou cyklického sekvenování. Pro cyklické sekvenování byl použit kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) a neznačený primer komplementární k sekvenované DNA. Vyhodnocení probíhalo pomocí DNA sekvenátoru ABI PRISM 377 (Perkin Elmer, USA). Sekvence byla provedena ve středisku sekvenování DNA, MBÚ AV ČR v Praze (Dr. Jürgen Felsberg, CSc.).

4.2.4 Produkce a purifikace mutantních forem CyaA

4.2.4.1 Produkce proteinů v 500 ml třepané kultuře

Bakterie *E. coli* XL1-Blue nebo *E. coli* BL21/pMM100 byly transformovány plazmidem kódujícím mutantní formu CyaA bez AC aktivity (CyaA-AC⁻), respektive mutantní formu CyaA s dvojitou jednonukleotidovou záměnou v pozicích E570K + E581P (CyaA-E570K+E581P-AC⁺), případně mutantní formu CyaA-E570K+E581P-AC⁻ (4.1.7). Transformované bakterie byly inkubovány přes noc při 37 °C na tuhém LB médiu s ampicilinem. Druhý den byly 2-3 bakteriální kolonie, které nesly plazmid s genem pro požadovaný protein, zaočkovány do 50 ml tekutého MDO média s ampicilinem (výsledná koncentrace 150 µg/ml) a za nepřetržitého třepání byly kultivovány při 37 °C 12-16 hodin. Z noční kultury bakteriálních buněk bylo odebráno 5 ml suspenze, která byla přendána do 500 ml čerstvého MDO média s ampicilinem (výsledná koncentrace 150 µg/ml) předeřhátého na 37°C.

Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při teplotě 37 °C, přičemž byly v pravidelných časových intervalech odebírány 1ml vzorky, u nichž byla měřena optická denzita při vlnové délce 600 nm. Při dosažení optické denzity OD₆₀₀ = 0,6 bylo k rostoucí kultuře přidáno 5 ml IPTG (do výsledné koncentrace 1 mM), což vedlo k aktivaci *lacZ* promotoru a následné expresi proteinu CyaA. Kultura byla za stálého třepání inkubována další 4 hodiny při 37 °C. Kultivace bakteriální kultury byla ukončena prudkým ochlazením v lázni voda - led.

Množství vyprodukovaného proteinu v buňkách *E. coli* bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE. Po ochlazení bakteriální kultury byl odebrán vzorek 200 µl, který byl odstředován (10000 g, RT, 1 minuta). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 µl lyzačního TUS pufru. Z této suspenze byl odebrán vzorek 20 µl, ke kterému bylo přidáno 20 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorek byl poté nanesen na 7,5% polyakrylamidový gel pro SDS-PAGE (4.2.7).

4.2.4.2 Izolace proteinů z bakteriální kultury - příprava močovinového extraktu

Narostlá bakteriální kultura byla po ochlazení odstředována (6000 g, 4 °C, 15 minut). Supernatant byl odstraněn, pelet buněk byl resuspendován ve 30 ml TE-2 pufru a odstředován (4000 g, 4 °C, 5 minut). Supernatant byl opět odstraněn, pelet byl resuspendován ve 35 ml TNE pufru a sonikován (8×15 sekund, 70 W, 18 kHz, 4°C, s 1 minutovými přestávkami mezi jednotlivými sonikacemi pro ochlazení vzorku).

Bakterie *E. coli*, které nebyly rozbity sonikací, byly stočeny odstředováním (4000 g, 4°C, 10 minut). Supernatant byl převeden do nové zkumavky a dále odstředován (13000 g, 4°C, 30 minut), čímž došlo k usazení inkluzních tělísek bakterií, jež obsahovaly CyaA. Pro odmytí bakteriálních membrán, které byly stočené spolu s inkluzními tělísky, byl sediment 3× opláchnut v TEU pufru a inkluze s proteinem byly resuspendovány v 6 ml dH₂O. Získaný roztok byl odstředován (13000 g, 4 °C, 15 minut). Po odstranění supernatantu bylo k sedimentu inkluzních tělísek přidáno 4,8 g krystalické močoviny a 6 ml TNE pufru. Směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě za průběžného promíchávání pomalou inverzí, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 M. Odstředováním směsi (13000 g, 4 °C, 30 minut) byl získán supernatant coby močovinový extrakt obsahující denaturovaný toxoid CyaA.

Pro analýzu přítomnosti toxoidu CyaA na SDS-PAGE byl z močovinového extraktu odebrán vzorek 20 µl, ke kterému bylo přidáno 5 µl 5× koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorek byl poté nanesen na 7,5% polyakrylamidový gel pro SDS-PAGE (4.2.7).

4.2.4.3 Purifikace proteinů iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose

Pro purifikaci záporně nabitých proteinů je často používán diethylaminoethyl konjugovaný na Sepharose coby anex pro iontoměničovou chromatografii. Purifikace toxinu iontoměničovou chromatografií probíhá při pH 8,0, protože pI CyaA je 4,17.

Chromatografická kolona byla důkladně promyta dH₂O a naplněna takovým množstvím DEAE-Sepharosy, aby po vykapání zaujímala DEAE-Sepharosa objem 4 ml kolony. Kolona byla opět propláchnuta 100 ml dH₂O, čímž došlo k odstranění ethanolu, ve kterém je DEAE-Sepharosa uchovávána. Následně byla kolona ekvilibrována pufrem TUN-A

do doby, než pH pufru, který vytékal z kolony, bylo stejné jako pH nanášeného pufru (pH 8,0). K močovinovému extraktu byl přidán NaCl do výsledné koncentrace 50 mM. Takto upravený vzorek byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu, kde došlo k zachycení toxoidů CyaA. Ostatní proteiny byly z kolony odstraněny 50 ml pufru TUN-A. Navázaný toxoid byl z kolony eluován pomocí 16 ml pufru TUN-B v postupně odebíraných 2 ml frakcích. Přítomnost toxoidu v jednotlivých frakcích byla průběžně ověřována orientačním testem s činidlem podle Bradfordové (90 μ l činidla podle Bradfordové + 10 μ l jednotlivé frakce).

Pro analýzu čistoty toxoidu v jednotlivých eluovaných frakcích na SDS-PAGE byl z každé frakce odebrán vzorek 20 μ l, ke kterému bylo přidáno 5 μ l 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorky byly poté nanesený na 7,5% polyakrylamidový gel pro SDS-PAGE (4.2.7). Frakce obsahující toxoid byly poté spojeny a vzorek byl připraven k purifikaci toxoidu hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose.

4.2.4.4 Purifikace proteinů hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose se současným značením proteinů

Tato metoda využívá schopnosti toxoidů CyaA vázat se na hydrofobní (nepolární) povrchy. Jako adsorbent je v tomto případě využita Phenyl-Sepharosa. Eluce je umožněna potlačením hydrofobních interakcí. V průběhu chromatografie je možné purifikované proteiny současně označit. V mém případě byla použita aminoreaktivní fluorescenční sonda DY-647-NHS-ester (Dyomics), která se v alkalickém prostředí kovalentně váže na primární aminové skupiny CyaA. Absorpční maximum DY-647-NHS-ester je 653 nm, emisní maximum je 672 nm. Alkalické prostředí bylo zajištěno uhličitanovým pufrům (pH 8,3).

Chromatografická kolona byla důkladně promyta dH₂O a poté naplněna takovým množstvím vychlazené Phenyl-Sepharosy, aby po vykapání zaujímal Phenyl-Sepharosa objem 1 ml kolony. Kolona byla následně ekvilibrována 10 ml TN-A pufru. Vzorek obsahující toxoid CyaA (CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ nebo CyaA-KP-AC⁻), jenž byl purifikován na DEAE-Sepharose (kapitola 4.2.4.3), byl ředěn 4 \times pomocí TN-A pufru a postupně nanesen na předem připravenou kolonu s Phenyl-Sepharosou, kde došlo k zachycení toxoidu. Kolona byla poté propláchnuta 2 \times 10 ml uhličitanového pufru (pH 8,3) a zespoda uzavřena. Do kolony byl pak přidán 1 ml uhličitanového pufru (stejný objem, jako bylo Phenyl-Sepharosy) a obsah byl opatrně promíchán pipetou. Poté bylo do kolony přidáno 8 μ l dopředu naředěného fluoroforu DY-647-NHS-Ester (1 mg DY-647-NHS-Ester byl rozpuštěn

ve 100 μ l DMSO) a obsah kolony byl opatrně promíchán. Směs byla inkubována 30 minut ve 4 °C za průběžného promíchávání pomalou inverzí, aby došlo k navázání fluoroforu na protein. Kolona s navázaným toxoidem byla poté 3 \times střídavě promyta 10 ml 60% izopropanolu v 50 mM Tris (pH 8,0), aby byly odstraněny bakteriální lipopolysacharidy (LPS) z purifikovaného toxoidu a 10 ml T pufru (pH 8,0), aby byla odmyt fluorofor, který se nenavázal na protein. Toxoid byl poté z kolony eluován 10 ml TU pufru v postupně odebíraných 1 ml frakcích. Přítomnost toxoidu v jednotlivých frakcích byla průběžně ověřována orientačním testem s činidlem podle Bradfordové (90 μ l činidla podle Bradfordové + 10 μ l jednotlivé frakce).

Pro analýzu čistoty toxoidu v jednotlivých eluovaných frakcích na SDS-PAGE byl z každé frakce odebrán vzorek 20 μ l, ke kterému bylo přidáno 5 μ l 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorky byly naneseny na 7,5% polyakrylamidový gel pro SDS-PAGE (4.2.7). Frakce obsahující toxoid CyaA byly poté spojeny a byla stanovena koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové (4.2.5). Vzorek byl dlouhodobě uchováván zamražením při -20 °C.

4.2.5 Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové

Principem metody určování koncentrace proteinů podle Bradfordové je kolorimetrická reakce barviva Coomassie Brilliant Blue G250, které se váže na bazické či aromatické aminokyselinové zbytky v molekule proteinu. Po navázání barviva na příslušné aminokyseliny dochází ke změně zbarvení roztoku z hnědé na modrou.

Nejprve byla připravena série ředění standardů BSA (0, 10, 25, 50, 75, 100 μ g/ml), na základě které byla sestrojena kalibrační křivka. K ředění byl použit stejný pufr jako k přípravě měřeného vzorku. Samotný pufr byl použit jako negativní kontrola. Dále byla připravena série vzorků toxoidů naředěných 10 \times nebo 20 \times . K 10 μ l každého roztoku (standardu BSA, vzorku toxoidu nebo negativní kontrole) bylo přidáno 90 μ l činidla podle Bradfordové. Směs byla promíchána a inkubována 15 minut při pokojové teplotě a následně byla na spektrofotometru změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Z naměřených hodnot absorbance standardů BSA vynesných do grafu proti koncentraci těchto standardů (v μ g/ml) byla sestrojena kalibrační křivka. Interpolací z této kalibrační křivky pak byla určena koncentrace CyaA.

4.2.6 Stanovení hemolytické aktivity CyaA

Ke 3 ml beraní krve bylo přidáno 30 ml TN pufru, vychlazeného na 4 °C. Suspense krvinek byla odstředována (2000g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl odstraněn a krvinky byly resuspendovány ve 30 ml TN pufru a znovu odstředovány (2000g, 4 °C, 10 minut). Tento proces byl ještě 2× zopakován. Krvinky byly poté resuspendovány ve 30 ml TN pufru a bylo stanoveno jejich množství (100 µl suspenze krvinek bylo lyzováno 900 µl TCT pufru a množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 541 nm. Z naměřených hodnot pak bylo vypočítáno množství krvinek v suspenzi). Suspense krvinek, z níž byl odebrán alikvot pro toto stanovení, pak byla naředěna TN pufrem tak, aby výsledná absorbance měřená při 541 nm byla 0,3, což odpovídá asi 5×10^8 červených krvinek v 1 ml suspenze. Nakonec byl k takto připravené suspenzi červených krvinek přidán roztok CaCl_2 tak, aby výsledná koncentrace vápenatých iontů byla 2 mM.

K 1ml suspenze naředěných červených krvinek bylo přidáno 10 µl vypurifikovaného CyaA (4.2.4) o koncentraci 5 µg/ml. Jako slepý pokus byl použit vzorek, do kterého bylo před přidáním toxinu ke krvinkám přidáno navíc 10 µl 0,5M EDTA, čímž byly odstraněny volné vápenaté ionty nezbytné pro interakci toxinu s membránou. Vzorky byly poté vloženy na 4-5 hodin do vodní lázně o teplotě 37 °C. Po inkubaci byl obsah zkumavek promíchán, krvinky byly odstředěny (12000g, RT, 1 minutu) a supernatant obsahující uvolněný hemoglobin byl odebrán do kyvety pro spektrofotometrické měření. Poté byla změřena absorbance při 541 nm proti slepému pokusu. Takto získané hodnoty byly přepočteny na koncentraci toxinu a procentuelně vztaženy k míře hemolytické aktivity původního CyaA.

Výpočet byl proveden podle vzorce:

$$A_{HEM} = \frac{A_M - A_B}{A_N - A_B} \cdot 100$$

A_M ...absorbance hemoglobinu v supernatantu získaném po odstředění suspenze krvinek inkubované s mutovaným CyaA

A_Nabsorbance hemoglobinu v supernatantu získaném po odstředění suspenze krvinek inkubované s původním nemutovaným CyaA

A_Babsorbance hemoglobinu v supernatantu získaném po odstředění suspenze krvinek inkubované bez CyaA

4.2.7 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Jedná se o elektroforézu v polyakrylamidovém (PAA) gelu za přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). K 20 μl každého vzorku proteinu odebraného pro analýzu pomocí elektroforézy v SDS-PAA gelu bylo přidáno 5 μl 5 \times koncentrovaného vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Vzorky byly zahřívány 5 minut při 95 $^{\circ}\text{C}$ a poté nanесeny na SDS-polyakrylamidový gel složený z 5% zaostřovacího gelu a 7,5% rozdělovacího gelu. Elektroforéza probíhala většinou 1 hodinu v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3) při nastaveném napětí 8 V/cm^2 pro zaostřovací gel a 15 V/cm^2 pro rozdělovací gel, při konstantním proudu 30 mA na jeden gel. Po proběhnutí elektroforézy byl zaostřovací gel odstraněn a rozdělovací gel byl obarven roztokem pro SDS-PAGE s Coomassie Brilliant blue R250 za mírného třepání při teplotě 25 $^{\circ}\text{C}$, aby došlo k vizualizaci rozdělených proteinů v gelu. Rozdělovací gel byl poté vložen do odbarvovacího roztoku pro SDS-PAGE a následně vysušen v celofánové fólii. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit proteinový velikostní standard 0661 (Fermentas).

4.2.8 Práce s primárními buňkami a tkáňovými liniemi

4.2.8.1 Uchovávání tkáňových kultur

V průběhu pokusu byly primární buňky a tkáňové linie udržovány v Petriho misce nebo v kultivační lahvi pro tkáňové kultury v příslušném růstovém médiu po dobu nejdéle 5 dnů.

Tkáňové linie K562 a její modifikované varianty, respektive tkáňové linie CHO a její modifikované varianty byly krátkodobě uchovávány v konzervách (kapitola 4.2.8.2) s 10 % kryoprotektivního roztoku (DMSO) při teplotě -80 $^{\circ}\text{C}$.

4.2.8.2 Příprava buněčných konzerv

Buňky byly převedeny do svého růstového média (buňky K562 do média RPMI 1640, buňky CHO do média F12) a následně byly odstředovány (120 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 3 minuty). Sediment byl resuspendován v čerstvém růstovém médiu. Na jednu kryozkumavku o objemu 1,5 ml bylo v konečné koncentraci použito 50 % buněk v růstovém médiu (500 $\mu\text{l}/\text{ml}$), 40 % fetálního hovězího séra (400 $\mu\text{l}/\text{ml}$) a 10 % kryoprotektantu DMSO (100 $\mu\text{l}/\text{ml}$). Množství buněk v jedné konzervě odpovídalo asi 30% konfluenci Petriho misky, což činí přibližně

10 milionů buněk. Kryozkumavka byla pečlivě uzavřena, okamžitě vložena do zamrazovací nádoby s izopropanolem, a ta byla uložena v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izopropanol zajistil postupné ochlazování směsi v kryozkumavce rychlostí $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu.

4.2.8.3 Rozmrazování buněčných konzerv

Buněčná konzerva byla co nejrychleji rozmrazena na pokojovou teplotu ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vodní lázni. K buňkám byly přidány 3 ml růstového média příslušného k rozmrazovanému buněčnému typu (k buňkám K562 médium RPMI 1640, k buňkám CHO médium F12) a směs byla následně odstředována (120 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3 minuty), aby mohlo být odstraněno kryoprotektivum DMSO. Sediment buněk byl po odstranění supernatantu resuspendován v 10 ml příslušného růstového média a přenesen do Petriho misky (buňky CHO a buňky K562), případně resuspendován v 7 ml příslušného růstového média a přenesen do kultivační lahve pro tkáňové kultury (buňky K562). Buňky byly kultivovány v CO_2 inkubátoru po dobu maximálně čtyř týdnů ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2).

4.2.8.4 Pasážování buněk

Primární buňky BMDC diferencované do podoby makrofágů jsou adherentní a jejich pasážování probíhalo při 80-90% konfluenci buněk (asi 5-6 milionů buněk BMDC na Petriho misku o průměru 9 cm). Adherentní buňky byly během pasážování staženy buněčnou škrabkou do DMEM média a následně odstředovány (120 g, RT, 3 minuty). Supernatant byl odstraněn a sediment buněk byl resuspendován v 10 ml čerstvého DMEM média. Buňky byly poté vysety do Petriho misky asi v 30% konfluenci buněk a kultivovány v CO_2 inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2) po dobu maximálně 5 dnů. Každý druhý den bylo kultivovaným buňkám vyměňováno DMEM médium.

Tkáňové linie CHO a její modifikované varianty jsou adherentní buněčný typ a jejich pasážování probíhalo při 80-90% konfluenci buněk (asi 5-6 milionů buněk na Petriho misku o průměru 9 cm). K adherentním buňkám v Petriho misce bylo přidáno 5 ml 5mM roztoku EDTA a buňky byly inkubovány 15 minut v CO_2 inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. EDTA je chelatační činidlo, které na sebe váže dvojmocné kationty (např. Ca^{2+} , Mg^{2+}) a způsobí tak uvolnění buněk od povrchu, ke kterému adherují. Buňky byly následně odstředovány (120 g, RT, 3 minuty). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v 10 ml čerstvého média F12 a buňky byly v asi 30% konfluenci vysety do Petriho misky a kultivovány v CO_2

inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Každý druhý den bylo kultivovaným buňkám vyměňováno F12 médium.

Tkáňové linie K562 a její modifikované varianty jsou suspenzní buněčný typ, přičemž jejich pasážování probíhalo při dosažení hustoty buněk 7-8 miliónů/ml. Buňky byly odstředovány (120 g, RT, 3 minuty), po odstranění supernatantu byly resuspendovány v 7 ml čerstvého média RPMI 1640 a v hustotě asi 7×10^5 buněk/ml byly přeneseny do kultivační lahve pro tkáňové kultury. Buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂).

4.2.8.5 Stanovení počtu buněk pomocí Bürkerovy komůrky

Do obou polovin Bürkerovy komůrky bylo nanášeno 50 µl suspenze buněk a komůrka byla zakryta krycím sklíčkem, které vytlačilo přebytečné množství tekutiny. Vždy v 16 polích horní i dolní poloviny Bürkerovy komůrky bylo spočítáno množství buněk a byl stanoven průměrný počet buněk v jednom poli o objemu 0,004 µl. Celkový počet buněk v 1 ml buněčné suspenze byl poté stanoven podle vzorce:

$$n = x * 250000$$

n celkový počet buněk v 1 ml buněčné suspenze

x průměrný počet buněk na jedno pole o objemu 0,004 µl

4.2.8.6 Izolace a maturace dendritických buněk z kostní dřeně (BMDC)

BMDC jsou dendritické buňky odvozené z kostní dřeně (z angl. Bone Marrow-derived Dendritic Cells). Buňky byly izolovány podle metodiky Lutze a kolektivu (Lutz *et al.*, 1999). Z myši kmene C57BL/6 (zakoupena z ÚMG AV ČR) staré 6-8 týdnů byly vypreparovány lýtkové a stehenní kosti. Každá kost byla propláchnuta 10 ml 1% PBS pomocí injekční stříkačky s jehlou, dokud nebyla kost průhledná. Vyizolované buňky byly odstředovány (120 g, RT, 3 minuty) a po odstranění supernatantu byly resuspendovány v 10 ml DC-RPMI média. Poté následovalo přečištění přes filtr s velikostí pórů 70 µm. Pomocí Bürkerovy komůrky byl stanoven počet buněk (4.2.8.5) a suspenze byla opět odstředována (120 g, RT, 3 minuty). Sediment buněk byl poté resuspendován v takovém množství média DC-RPMI, aby výsledná koncentrace činila 2×10^6 buněk/ml. Naředěná suspenze buněk byla po 1 ml vyseta do Petriho misek a každá miska byla doplněna 9 ml média DC-RPMI. Buňky byly kultivovány v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Třetí den od izolace bylo k buňkám přidáno

10 ml nového média DC-RPMI. Šestý a osmý den od izolace bylo z každé misky odebráno 10 ml média s buňkami, které bylo odstředováno (120 g, RT, 3 minuty). Supernatant byl odstraněn, buňky byly resuspendovány v 10 ml nového média DC a vráceny do Petriho misky. Následovala kultivace buněk v CO₂ inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂). Sedmý, osmý a devátý den od izolace z kostní dřeně byly buňky připraveny pro další použití. Takto připravené buňky byly diferencovány (díky GM-CSF (20 ng/ml), kterým bylo obohaceno DC-RPMI médium) buď do podoby dendritických buněk, které byly spíš suspenzní povahy, nebo do podoby makrofágů, které byly spíš přisedlé. Pro svoji práci jsem využívala buňky diferencované do podoby makrofágů.

4.2.9 Tranzientní transfekce buněk pomocí Lipofectamine 2000

Transfekce buněk K562 a CHO plazmidy integrinu CD11b, CD18 a jejich modifikovanými variantami (4.1.7) byla provedena pomocí lipofekce s použitím transfekčního činidla Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). V průběhu transfekce byl dodržován postup navržený výrobcem. Nejprve byla naředěna plazmidová DNA pomocí bezsérového média Opti-MEM I (Invitrogen, USA) na požadovanou koncentraci pro transfekci. Koncentrace plazmidové DNA se lišila v závislosti na typu transfekovaných buněk a stanovených podmínkách transfekce. Obdobně bylo naředěno lipofekční činidlo, opět bezsérovým médiem Opti-MEM I. Koncentrace lipofekčního činidla byla také závislá na typu transfekovaných buněk a stanovených podmínkách transfekce. Směs lipofekčního činidla a pufru byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Poté byla smíchána naředěná plazmidová DNA s naředěným Lipofectamine 2000 a směs byla inkubována 20 minut při pokojové teplotě. Komplexy DNA a transfekčního činidla byly velmi opatrně a po kapkách přidány ke kultuře buněk, které byly přes noc inkubovány v příslušném médiu bez antibiotik. Buňky byly s komplexy inkubovány po dobu 6 hodin v 5% CO₂ inkubátoru při 37 °C. Následovala výměna média s komplexy za příslušné médium bez antibiotik. Před dalším zpracováním byly buňky inkubovány 24 hodin v 5% CO₂ při 37 °C.

4.2.10 Tranzientní transfekce buněk pomocí FuGENE6 Reagent

Transfekce buněk K562 plazmidy integrinu CD11b a CD18 (4.1.7) byla provedena pomocí lipofekce s použitím transfekčního činidla FuGENE 6 Reagent (Roche). V průběhu transfekce byl dodržován postup navržený výrobcem. Vodou pro tkáňové kultury byla nejprve

naředěna plazmidová DNA na požadovanou koncentraci pro transfekci. Koncentrace plazmidové DNA se lišila v závislosti na stanovených podmínkách transfekce. Pak bylo naředěno lipofekční činidlo. Do média RPMI 1640 bez séra a antibiotik byl přidán 12,5mM pufr HEPES a příslušné množství transfekčního činidla FuGENE 6 Reagent. Jeho koncentrace byla také závislá na stanovených podmínkách transfekce. Tato směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následně byla smíchána naředěná plazmidová DNA s naředěným FuGENE 6 Reagent a směs byla inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Komplexy DNA a transfekčního činidla byly poté velmi opatrně a po kapkách přidány ke kultuře buněk, které byly přes noc inkubovány v kompletním médiu RPMI 1640 bez antibiotik, doplněným o 12,5mM HEPES. Před dalším zpracováním byly buňky K562 inkubovány 24 hodin v 5% CO₂ při 37 °C.

4.2.11 Příprava stabilních tkáňových linií

Nejprve byly připraveny tranzientně transfekované buňky K562 nebo CHO pomocí lipofekce činidly Lipofectamine 2000 (4.2.9). Pokud bylo požadováno vytvoření stabilní buněčné linie exprimující daný integrin, tak bylo 48 hodin po transfekci vyměněno růstové médium za příslušné médium selekční. U buněk K562 bylo používáno médium RPMI 1640 obsahující selekční antibiotikum Zeocin (ve výsledné koncentraci 300 µg/ml) a G418 (ve výsledné koncentraci 500 µg/ml) (4.1.6). U buněk CHO bylo používáno médium F12 obsahující selekční antibiotikum G418 (ve výsledné koncentraci 1000 µg/ml) (4.1.6). Transfekované buňky byly inkubovány v 5 % CO₂ při 37 °C a selektovány po dobu 3 týdnů. Selekční médium bylo buňkám měněno každý třetí den a buňky byly v případě potřeby pasážovány (4.2.8.4).

4.2.12 Příprava buněk na fluorescenční mikroskopii

4.2.12.1 Příprava skel na mikroskopování

K mikroskopování byla použita kulatá krycí sklíčka o průměru 12 mm (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, SRN), která byla uchovávána v nádobě s 97% etanolem. Před každým použitím bylo kulaté krycí sklíčko pinzetou vyjmuta z nádoby s etanolem, osušeno v proudu vzduchu a krátce opáleno nad kahanem. Sklíčko bylo poté vloženo do jednotlivých jamek 24 jamkové destičky.

4.2.12.2 Podkladová vrstva fibronektinu na mikroskopická skla

Lidský fibronektin byl naředěn pomocí PBS na koncentraci 10 µg/ml. Do jednotlivých jamek 24 jamkové destičky s předem připravenými sklíčky na mikroskopování (4.2.12.1) bylo poté přidáno 100 µl naředěného fibronektinu, který byl pipetou opatrně rozprostřen po celé ploše sklíčka. Takto připravený fibronektin byl přes noc inkubován v 5% CO₂ při 37 °C. Před nanesením buněk byl fibronektin opláchnut 1 ml PBS.

4.2.12.3 Podkladová vrstva BD Matrigelu na mikroskopická skla

BD Matrigel byl naředěn v poměru 50 µl BD Matrigelu ku 450 µl bezsérového média Opti-MEM I (Invitrogen, USA). Do jednotlivých jamek 24 jamkové destičky s předem připravenými sklíčky na mikroskopování (4.2.12.1) bylo poté přidáno 100 µl naředěného BD Matrigelu, který byl pipetou opatrně rozprostřen po celé ploše sklíčka. Takto připravená podkladová vrstva byla přes noc inkubována v 5% CO₂ při 37 °C. Před nanesením buněk byl BD Matrigel opláchnut 1 ml PBS.

4.2.12.4 Podkladová vrstva polylysinu na mikroskopická skla

Roztok polylysinu byl naředěn do výsledné koncentrace 0,05 % v 25mM borátovém pufru (pH 8,5). Do jednotlivých jamek 24 jamkové destičky s předem připravenými sklíčky na mikroskopování (4.2.12.1) bylo poté přidáno 100 µl naředěného polylysinu a destička byla na 1 hodinu vložena do 37 °C inkubátoru. Nepřichycený polylysin byl poté odsán pipetou a jamky byly opatrně promyty 500 µl PBS.

4.2.12.5 Příprava buněk na mikroskopování

Den před zahájením vlastního experimentu byly buňky převedeny do svého růstového média a odstředovány (120 g, RT, 3 minuty). Po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v čerstvém růstovém médiu a pomocí Bürkerovy komůrky byl stanoven počet buněk (4.2.8.5). Suspenze buněk byla následně naředěna v příslušném růstovém médiu tak, aby výsledný počet buněk v jedné jamce činil 2×10^5 . Takto naředěné buňky byly vysety do 24 jamkové destičky buď na samotná mikroskopická sklíčka o průměru 12 mm (buňky BMDC) nebo na mikroskopická sklíčka s podkladovou vrstvou fibronektinu, BD Matrigelu nebo polylysinu (buňky K562). Buňky byly poté umístěny do CO₂ inkubátoru (5 % CO₂, 37 °C) a kultivovány do druhého dne.

4.2.12.6 Inkubace buněk s toxoidem a transferinem

Vypurifikované a fluorescenčně označené (sondou Dyomics-647) specifické mutanty toxinu (CyaA-KP-AC⁺; CyaA-KP-AC⁻ nebo CyaA-AC⁻, 4.2.4), jejichž koncentrace byla stanovena metodou podle Bradfordové (4.2.5), byly naředěny v bezbarvém růstovém médiu příslušných buněk určených k mikroskopování na koncentraci 3 µg/ml. Část buněk (myších makrofágů nebo K562 buněk) byla před přidáním toxoidu preinkubována s PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát) o koncentraci 0,1 µg/ml 4 hodiny ve 37 °C. K buňkám, které byly přes noc inkubovány na mikroskopických sklech v CO₂ inkubátoru (4.2.12.5), případně preinkubovány s PMA, bylo přidáno 500 µl naředěného toxoidu a buňky byly inkubovány při 37 °C po dobu 10 nebo 30 minut. Po 10 minutách, respektive 30 minutách, bylo k buňkám přidáno 100 µl fluorescenčně značeného (sondou Dyomics-547) transferinu naředěného pomocí bezbarvého růstového média na koncentraci 5 µg/ml. Buňky byly inkubovány dalších 10 minut při 37 °C v CO₂ inkubátoru.

4.2.12.7 Fixace buněk a příprava trvalých preparátů

Po uplynutí doby inkubace buněk s toxoidem a transferinem (4.2.12.6) byly buňky promyty nejdříve 1 ml PBS a následně 1 ml octanového pufru (pH 3,5). Poté byly buňky na mikroskopických sklech fixovány 4% paraformaldehydem po dobu 15 minut. Pak byla obarvena jádra pomocí DAPI naředěného v HBSS pufru v koncentraci 4 µg/ml po dobu 5 minut. Trvalé preparáty byly vytvořeny s použitím 10 µl Mowiolu naneseného na podložní sklíčko. Mikroskopická skla se zafixovanými buňkami byla položena do Mowiolu buňkami dolu a okraj mikroskopických sklíček byl natřen bezbarvým lakem, aby bylo zabráněno vysychání preparátu.

4.2.13 Mikroskopická analýza trvalých preparátů

Trvalé preparáty buněk připravené na podložních sklech (4.2.12.7) byly analyzovány pomocí invertovaného fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81 Cell^R při nastavení objektivu se 100 násobným zvětšením (100× O2PH-UPLFLN/1.3 N.A. Oil) a za použití imerzního oleje. Z fluorescenčních filtrů byly použity DAPI, FITC, CFP, YFP, RFP a Cy5. Z každého preparátu byla pořízená obrazová dokumentace pomocí digitální CCD kamery Olympus FV2T Digital B/W Fireware. Snímky byly dále zpracovány pomocí softwaru Cell^R Version 2.0 nebo pomocí programu ImageJ.

4.2.14 Příprava buněk na průtokovou cytometrii

Do mikroskopavek bylo odebráno 1×10^5 buněk transfekovaných plazmidem integrinu CD11b/CD18 určených k analýze a 1×10^5 netransfekovaných buněk sloužících jako negativní kontrola. Buňky byly odstředovány (120 g, 4 °C, 3 minuty). K suspenzi buněk byl přidán buď fluorescenčně značený toxoid CyaA naředěný v kompletním HBSS pufru do výsledné koncentrace 3 µg/ml nebo/a fluorescenčně značená monoklonální protilátka anti CD11b-44-FITC (ředěna 1:80 v kompletním HBSS pufru) nebo/a anti CD18-APC (ředěna 1:25 v kompletním HBSS pufru). Směs byla inkubována 45 minut v ledové lázni. Poté byly buňky odstředovány (120 g, 4 °C, 3 minuty), 2× promyty 0,5 ml HBSS pufru a opět odstředovány (120 g, 4 °C, 3 minuty). Nakonec byla suspenze buněk naředěna ve 100 µl HBSS pufru a do každé mikroskopavky bylo přidáno 10 µl fluoroforu Hoechst 33258, který určil viabilitu buněk. Hoechst se specificky váže na DNA a neproniká do živých buněk. Vzorky byly zpracovávány na přístroji BD LSR II (Biosciences, USA). Analýza metodou průtokové cytometrie je v práci popisována jako FACS analýza.

4.2.15 Selekcce buněk pomocí průtokového cytometru

Buňky K562 transfekované plazmidem integrinu CD11b/CD18 nebo buňky CHO transfekované plazmidem integrinu α_M -CFP/ β_2 -YFP určené k selekci byly připraveny podle standardního protokolu popsaného v kapitole „Příprava buněk na průtokovou cytometrii“ (4.2.14). Buňky K562 byly separovány na přístroji BD FACS Vantage SE (Biosciences, USA) do 6 jamkové destičky se 3 ml RPMI 1640 média jako populace nesoucí integrin CD11b. Buňky CHO nesoucí obě podjednotky integrinu CD11b/CD18 (α_M -CFP/ β_2 -YFP) byly po jedné separovány do samostatných jamek 96 jamkové destičky se 100 µl F12 média. K separování buněk CHO byl používán fluorescenční průtokový cytometr s buněčným sortem BD FACS Vantage SE, který je k dispozici na Ústavu molekulární genetiky AV ČR.

5 Výsledky

5.1 Produkce a purifikace CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻

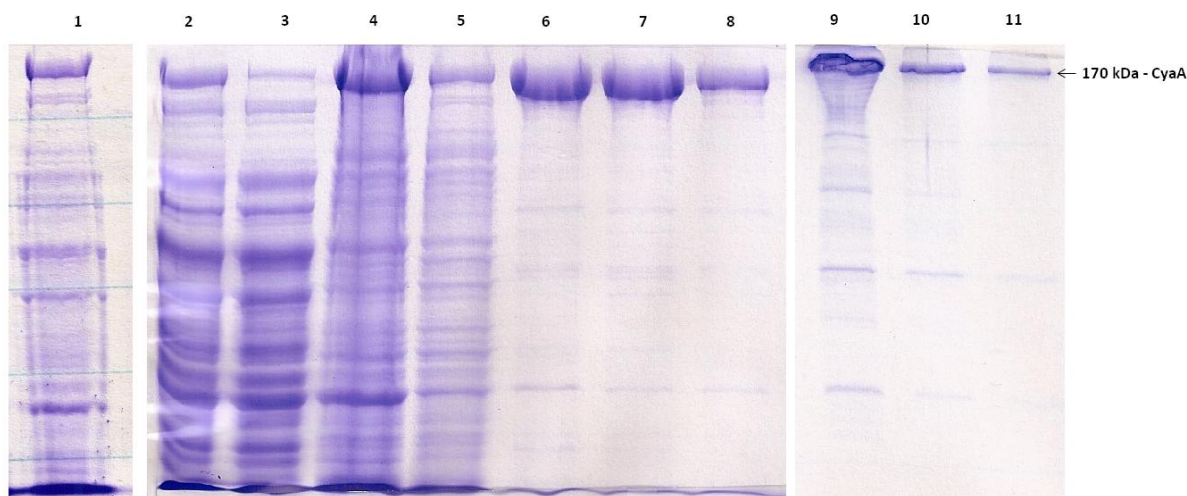
Mutantní varianty CyaA byly produkovány jako rekombinantní proteiny v buňkách *E. coli* XL-1 Blue nebo *E. coli* BL21/pMM100 (4.1.8) ve formě inkluzních tělísek, z nichž byl toxoid posléze purifikován. Plazmid nesoucí gen pro příslušnou variantu CyaA (4.1.7), který byl pod kontrolou *lac* promotoru, byl odebrán ze zásobního roztoku a vnesen transformací teplotním šokem (4.2.3.8) do superkompetentních buněk *E. coli* (4.2.2). Z narostlých bakteriálních kolonií byly připraveny kultury pro expresi CyaA. Exprese proteinu byla spuštěna indukcí *lac* promotoru přidáním IPTG (4.2.4.1). Bakterie *E. coli* byly poté rozbity sonikací, rekombinantní varianty CyaA byly extrahovány z inkluzních tělísek roztokem 8M močoviny (0) a dále purifikovány iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose (4.2.4.3). Následně byly za použití hydrofobní chromatografie na Phenyl-Sepharose toxoidy zakoncentrovány a označeny fluoroforem DY-647-NHS-ester (Dyomics). Kolona s navázaným toxoidem byla promyta izopropanolem pro odstranění bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) a T pufrem pro odmytí nenavázaného fluoroforu (4.2.4.4).

Koncentrace purifikovaných proteinů byla stanovena metodou podle Bradfordové (4.2.5). Výslednou koncentraci toxoidů shrnuje Tabulka 2. Před dalším použitím byly toxoidy ještě charakterizovány na hemolytickou aktivitu (4.2.6).

Tabulka 2: Výsledná koncentrace toxoidů CyaA. Tabulka zobrazuje názvy purifikovaných proteinů a jejich koncentrace, které byly stanoveny metodou podle Bradfordové.

Rekombinantní protein	Výsledná koncentrace proteinu
CyaA-AC ⁻	2,5 mg/ml
CyaA-E570K+E581P-AC ⁺	1,2 mg/ml
CyaA-E570K+E581P-AC ⁻	2,2 mg/ml

Jednotlivé kroky produkce a purifikace toxoidů byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (4.2.7) (Obr. 15).



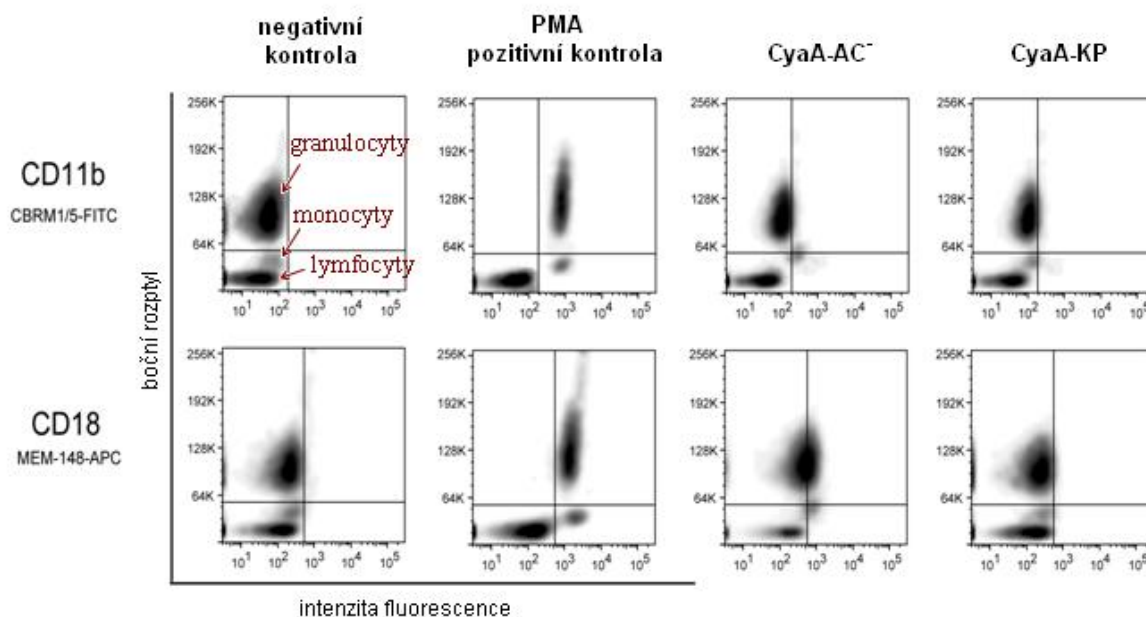
Obr. 15: SDS-PAGE analýza jednotlivých kroků izolace a purifikace CyaA-KP-AC⁺. Obdobně byly analyzovány všechny mutantní varianty CyaA. Alikvóty proteinů v řadě 1-8 byly děleny pomocí 7,5% SDS-PAGE, alikvóty proteinů 9-11 byly děleny pomocí 12,5% SDS-PAGE a gely byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue. (1) toxoid CyaA v *E. coli* po 4 hodinách inkubace s IPTG; (2) Bakteriální lyzát; (3) Supernatant odebraný v průběhu přípravy močovinnového extraktu; (4) Močovinnový extrakt; (5) „Flow through“ močovinnového extraktu na DEAE-Sepharose; (6–8) Jednotlivé frakce z purifikace na DEAE-Sepharose; (9-11) Jednotlivé frakce z purifikace na Phenyl-Sepharose. Přítomnost toxinu o velikosti 170 kDa je vyznačena šipkou.

5.2 Aktivace integrinového receptoru CD11b/CD18 toxoidem CyaA-AC⁻

V práci Fišera a kolektivu (2012) bylo ukázáno, že proteiny CyaA-AC⁻ a CyaA-KP jsou endocytovány odlišnými drahami (Fiser *et al.*, 2012). Vzhledem k tomu, že endocytóza obou toxoidů je s největší pravděpodobností určena endocytickou dráhou jejich receptoru, zajímalo mě, zda přímo integrinová molekula CD11b/CD18 a případně jaký mechanismus je zodpovědný za změnu endocytické dráhy tohoto receptoru. Jedno z možných vysvětlení je to, že integrin CD11b/CD18 se vyskytuje na povrchu buněk v několika konformacích, jež odpovídají aktivnímu či neaktivnímu stavu této molekuly (viz kapitola 2.2.2). Z tohoto důvodu jsem testovala, zda jsou proteiny CyaA-AC⁻ a CyaA-KP schopné ovlivnit konformační stav integrinového receptoru CD11b/CD18 a tím ovlivnit i jeho endocytickou dráhu.

Směs leukocytárních buněk izolovaných z plné krve byla inkubována s proteiny CyaA-AC⁻ a CyaA-KP (1 µg/ml) po dobu 5 minut v 37 °C. Ihned poté byla provedena

analýza konformačního stavu CD11b/CD18 integrinu pomocí vazby specifických protilátek a průtokové cytometrie. Pro detekci aktivní konformace integrinu byly použity monoklonální protilátky CBRM1/5 a MEM-148, rozpoznávající specifické epitopy pouze na otevřené formě CD11b (CBRM1/5) a CD18 (MEM-148) podjednotky. Jak je patrné z Obr. 16, na bodovém grafu znázorňujícím závislost bočního rozptylu světla na intenzitě fluorescence můžeme rozpoznat tři buněčné populace: lymfocyty ve spodní části, populaci monocytů uprostřed a granulocyty v horní části grafu. V prvním sloupci jsou buňky neznačené, sloužící jako negativní kontrola. V druhém sloupci jsou buňky značené CBRM1/5 protilátkou (horní řádek) a MEM-148 protilátkou (spodní řádek), které byly 1 hodinu před analýzou opůsobeny 100 nM PMA při 37 °C. PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát) slouží jako agonista, jenž spouští kaskádu signalizačních drah vedoucí k „inside-out“ signalizaci a k aktivaci CD11b/CD18 do otevřené konformace (viz kapitola 2.2.2, Obr. 8). Tyto buňky slouží jako pozitivní kontrola. Jak je patrné z Obr. 16, zvýšení intenzity fluorescence u populace monocytů a granulocytů opůsobených PMA dobře koreluje se schopností PMA aktivovat CD11b/CD18 molekulu. Intenzita fluorescence u populace lymfocytů se nemění, což odpovídá tomu, že lymfocyty na svém povrchu nenesou CD11b/CD18 integrinový receptor. Jak je dále zřetelné na Obr. 16, inkubace buněk s proteinem CyaA-KP nevede ke změně v intenzitě fluorescence, což znamená, že interakce CyaA-KP s buňkami jednoznačně nevede k aktivaci CD11b/CD18 molekuly. Naproti tomu, inkubace proteinu CyaA-AC⁻ vede ke zvýšení intenzity fluorescence obou podjednotek u monocytární populace, což značí, že CyaA-AC⁻ je schopen aktivovat CD11b/CD18 integrinovou molekulu. Navíc u populace monocytů došlo k významnému zvýšení bočního rozptylu světla, což pravděpodobně souvisí se změnou granularity buněk. Z těchto dat vyplývá, že interakce CyaA-AC⁻ s receptorem CD11b/CD18, na rozdíl od CyaA-KP, vede k aktivaci integrinového receptoru CD11b/CD18. Tato aktivace jde pravděpodobně ruku v ruce se schopností CyaA-AC⁻ zvyšovat intracelulární koncentraci vápníkových iontů (či schopností CyaA-AC⁻ snižovat intracelulární koncentraci draselných iontů) a následných signalizačních událostí uvnitř buňky, spíše než ze samotné interakce toxin-receptor, protože samotná vazba CyaA-KP na povrchu buňky není dostatečná k aktivaci CD11b/CD18.



Obr. 16: Aktivace integrinového receptoru CD11b/CD18 v plné krvi za použití průtokového cytometru. Vzorky lidské krve zbavené červených krvinek byly inkubovány 5 minut s toxoidem CyaA-AC⁻ nebo CyaA-KP ve výsledné koncentraci 1 µg/ml. Jako pozitivní kontrola byly použity buňky lidské krve opůsobené 100 nM PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát), negativní kontrola jsou buňky lidské krve, které nebyly ničím opůsobené. Vzorky byly analyzovány pomocí specifických protilátek na průtokovém cytometru. Graf reprezentuje závislost intenzity fluorescence protilátek na bočním rozptylu světla. V grafu jsou patrné tři ohraničené populace buněk: nahoře jsou granulocyty, uprostřed monocyty a dole lymfocyty.

5.3 Endocytóza CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ v BMDC

Při přípravě experimentu byly myší BMDC převedeny na mikroskopická krycí sklíčka (viz kapitola 4.2.12.5). K buňkám inkubovaným přes noc byla přidána specifická mutanta toxinu (CyaA-AC⁻; CyaA-KP-AC⁺ nebo CyaA-KP-AC⁻) fluorescenčně označená sondou Dyomics-647, která má emisní maximum při vlnové délce 672 nm. Všechny tři toxoidy byly dopředu naředěny v bezbarvém růstovém médiu DC-RPMI na výslednou koncentraci 3 µg/ml. Buňky byly s toxoidem inkubovány ve 37 °C po dobu 20 minut. Poté byl k buňkám přidán fluorescenčně značený transferin (značený Dyomics-547, který má emisní maximum při vlnové délce 574 nm) naředěný v bezbarvém růstovém médiu na koncentraci 5 µg/ml. Buňky byly inkubovány dalších 10 minut při 37 °C (4.2.12.6). Po uplynutí doby inkubace s toxoidem a transferinem následovalo promytí buněk a fixace 4% paraformaldehydem. Nakonec byla pomocí fluoroforu DAPI (emisní maximum při vlnové délce 461 nm) obarvena jádra a trvalé preparáty byly zality do Mowiolu (4.2.12.7). Trvalé preparáty byly analyzovány

na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 81 Cell^R. Pro pořizování fotodokumentace byl na mikroskopu nastaven objektiv se 100 násobným zvětšením, na který byl nanesen imerzní olej. Pro pozorování jader byl používán fluorescenční filtr DAPI (propouští modrou část spektra), na pozorování transferinu byl zvolen filtr RFP (propouští žlutou část spektra) a pro zobrazení fluorescence toxoidů byl vybrán filtr Cy5 (propouští červenou část spektra). Obrazová dokumentace byla pořízena digitální CCD kamerou Olympus FV2T Digital B/W Fireware. Snímky byly dále zpracovány pomocí softwaru Cell^R Version 2.0 a/nebo pomocí programu ImageJ (4.2.13).

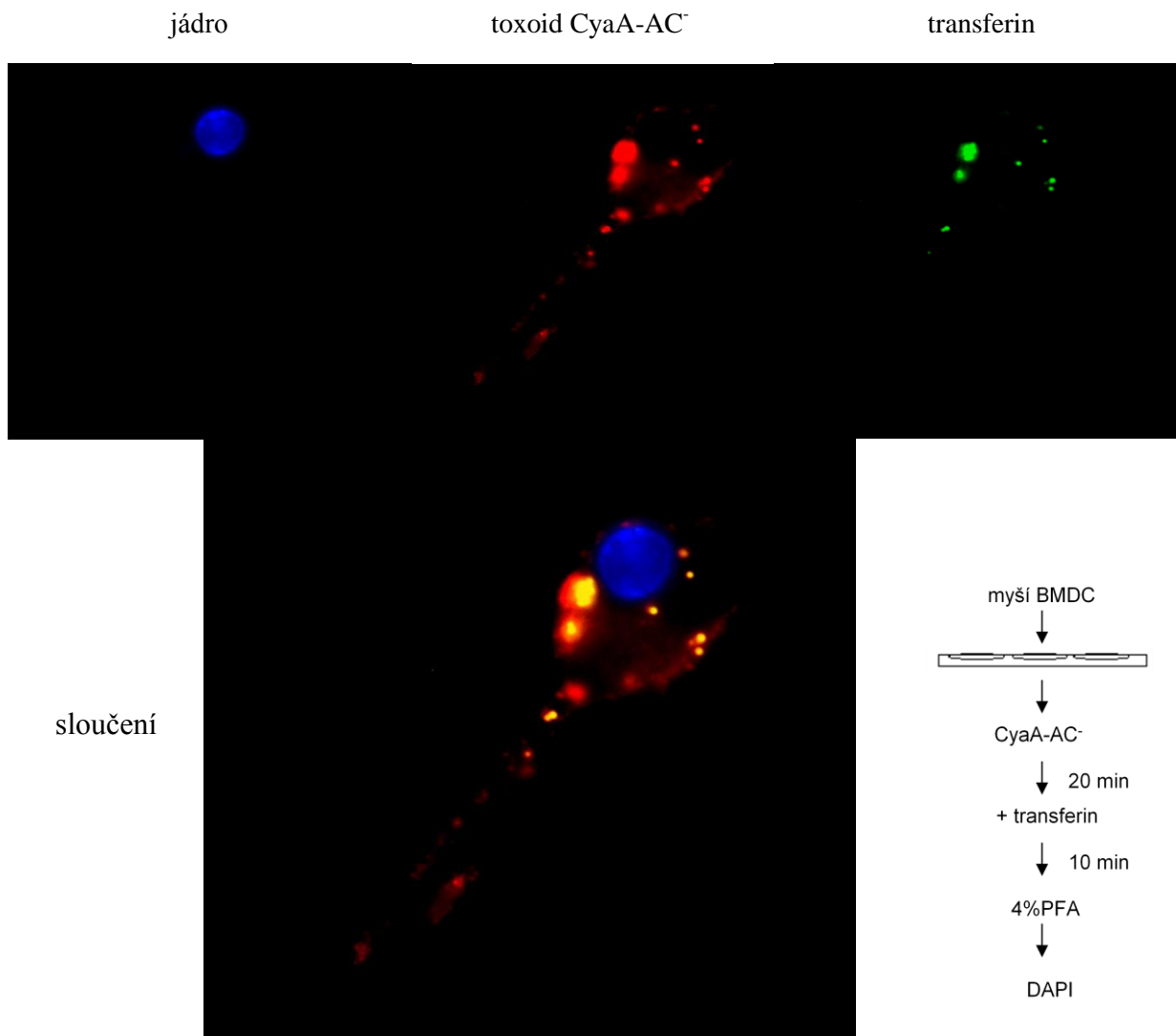
Transferin slouží jako klasický marker při studiu klatrin-dependentní endocytózy. Pokud byl toxoid endocytován a následně dopraven do stejného endozomu jako transferin, tak došlo k prolnutí zelené barvy (reprezentující transferin) a červené barvy (reprezentující toxoid), kolokalizace se tak projevila žlutou barvou. Z toho jsem následně vyhodnotila, že toxoid vstupuje do buněk na klatrinu závislou endocytózou. Pokud ale ke kolokalizaci toxoidu s transferinem nedošlo a bylo možné detekovat oddělenou zelenou a červenou barvu, tak se jednalo o jiný druh endocytózy, který byl na klatrinu nezávislý. Pro doplnění celistvosti obrazu jsou modře zobrazena jádra buněk. Barevné rozlišení je analogické u všech snímků z fluorescenčního mikroskopu použitých v této práci. Vedle každého snímku je navíc naznačen postup přípravy trvalého preparátu, ze kterého byl snímek pořízen.

Na základě výsledků z průtokové cytometrie o aktivaci integrinového receptoru CD11b/CD18 v plné lidské krvi víme, že CyaA-AC⁻ aktivuje integrin, zatímco CyaA-KP integrin neaktivuje (viz Obr. 16). CyaA-AC⁻ nemá enzymatickou, adenylátcyklázovou aktivitu, takže nemůže přeměňovat ATP na cAMP, ale je schopný tvořit póry v plazmatické membráně a během translokace AC domény do cytosolu dochází ke vtoku Ca²⁺ do buněk. Vtok Ca²⁺ dovnitř buněk stimuluje zatím neznámou signalizaci vedoucí k aktivaci integrinového receptoru (2.2.2). Podle hypotézy testované v této práci je vtok vápenatých iontů a následná aktivace integrinu nezbytná pro receptorem zprostředkovanou, na klatrinu závislou endocytózu.

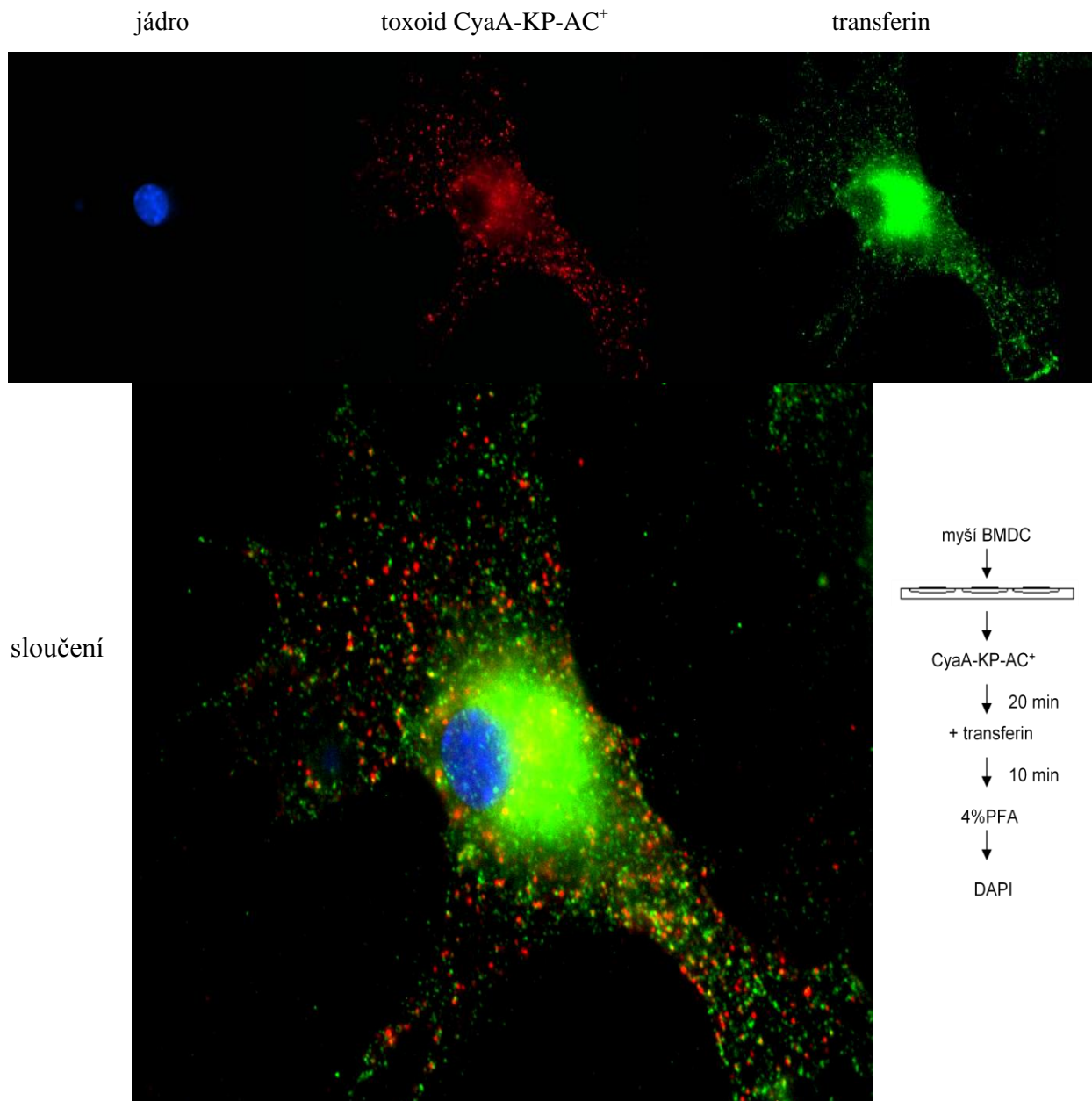
Při mikroskopické analýze endocytózy CyaA-AC⁻ na buňkách BMDC jsem pozorovala zřetelnou kolokalizaci toxoidu s transferinem reprezentovanou žlutou barvou (Obr. 17), což demonstruje, že CyaA-AC⁻ je do myších makrofágů endocytován dráhou závislou na klatrinu.

Endocytóza CyaA-AC⁻ byla poté porovnána s endocytózou CyaA-KP-AC⁺. Tato varianta toxoidu není schopná tvořit póry v plazmatické membráně, ani podpořit vtok Ca²⁺ do buněk. Při mikroskopické analýze toxoidu CyaA-KP-AC⁺ na buňkách BMDC nebyla pozorována žádná, nebo jen velmi slabá kolokalizace s transferinem (Obr. 18). Z toho vyplývá, že toxoid CyaA-KP-AC⁺ vstupoval dovnitř buňky jinou cestou, která je na klatrinu nezávislá.

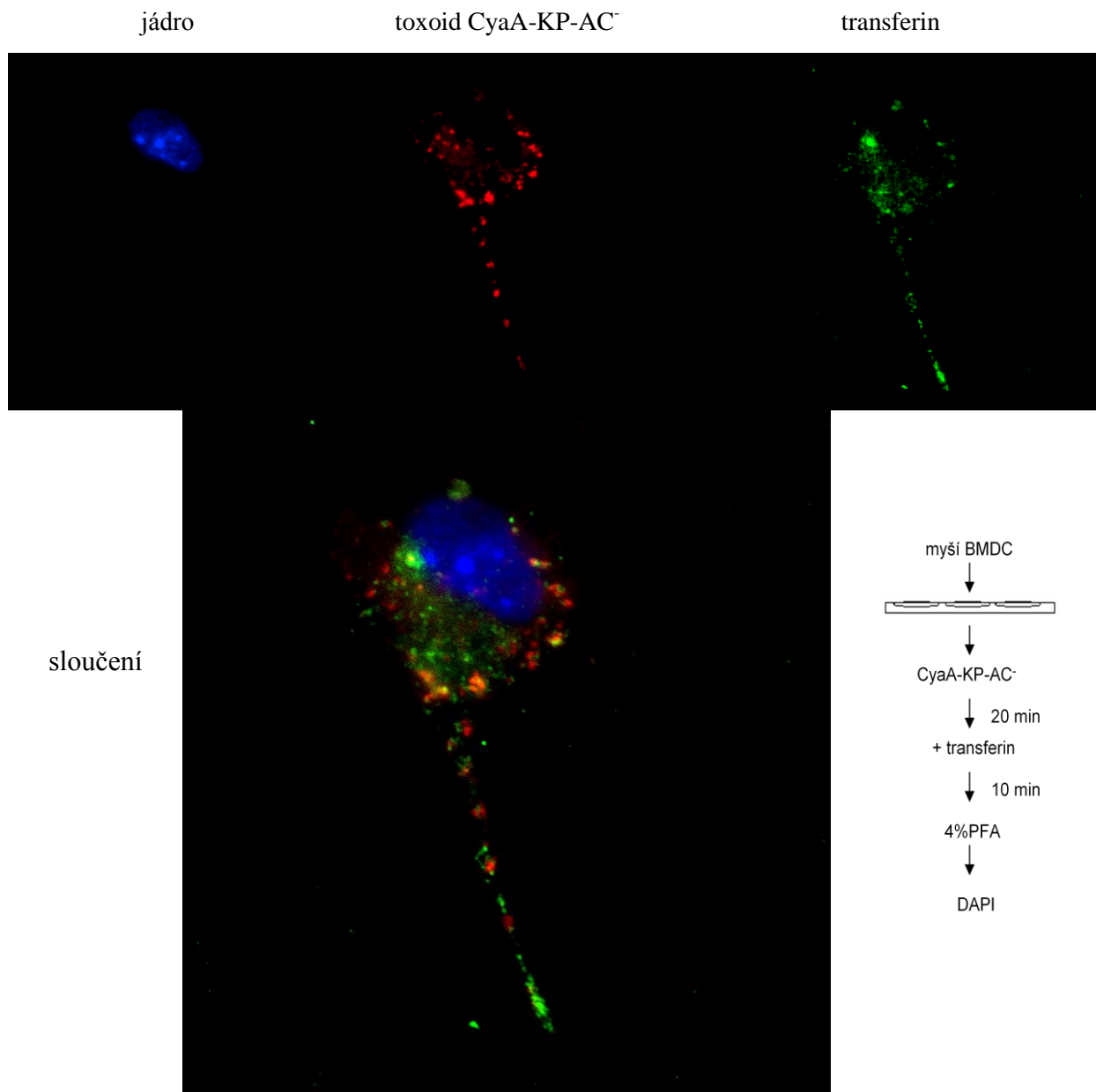
Nicméně mutanta toxinu CyaA-KP-AC⁺ má AC aktivitu, je tedy schopna katalyzovat přeměnu ATP na cAMP. Přestože se u této varianty schopnost translokace AC domény do cytosolu buněk pohybuje pouze v rozmezí 1-2 % oproti divokému typu toxinu CyaA (viz kapitola 4.1.11), tak v buňkách dochází k signifikantnímu zvýšení cAMP, které může ovlivnit endocytózu. Aby bylo vyloučeno, že změnu endocytického vzorce způsobuje zvýšená hladina cAMP, byla připravena mutantní varianta toxinu CyaA-KP-AC⁻, která stejně jako předešlá varianta toxinu (CyaA-KP-AC⁺) není schopná tvořit póry v plazmatické membráně buněk ani umožnit vtok vápenatých iontů, a navíc zcela postrádá enzymatickou, adenylátcyklázovou aktivitu (Basler *et al.*, 2006, Basler *et al.*, 2007). Mikroskopická analýza endocytózy toxoidu CyaA-KP-AC⁻ na buňkách BMDC neukázala žádnou, nebo jen minimální kolokalizaci toxoidu s transferinem (Obr. 19). Z těchto výsledků vyplývá, že toxoid CyaA-KP-AC⁻ je endocytován dráhou nezávislou na klatrinu, stejně jako v případě toxoidu CyaA-KP-AC⁺.



Obr. 17: Mikroskopická analýza CyaA-AC⁻ na buňkách BMDC. Na snímku z fluorescenčního mikroskopu je jádro buňky zobrazeno modrou barvou, toxoid červenou barvou a transferin je reprezentován zelenou barvou. Barevné rozlišení je analogické u všech snímků z fluorescenčního mikroskopu použitých v této práci. Žlutá barva znázorňující kolokalizaci toxoidu s transferinem ukazuje, že CyaA-AC⁻ je v buňkách BMDC endocytován dráhou závislou na klatrinu. Vpravo je naznačen postup při přípravě trvalého preparátu.



Obr. 18: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁺ na buňkách BMDC. Na snímku nepozorujeme téměř žádnou kolokalizaci toxoidu s transferinem, což znamená, že CyaA-KP-AC⁺ je v buňkách BMDC endocytován dráhou nezávislou na klatrinu.



Obr. 19: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁻ na buňkách BMDC. Na snímku nedochází k téměř žádné kolokalizaci toxoidu s transferinem. Mutantní varianta toxinu CyaA-KP-AC⁻ je v myších BMDC endocytována dráhou nezávislou na klatrinu.

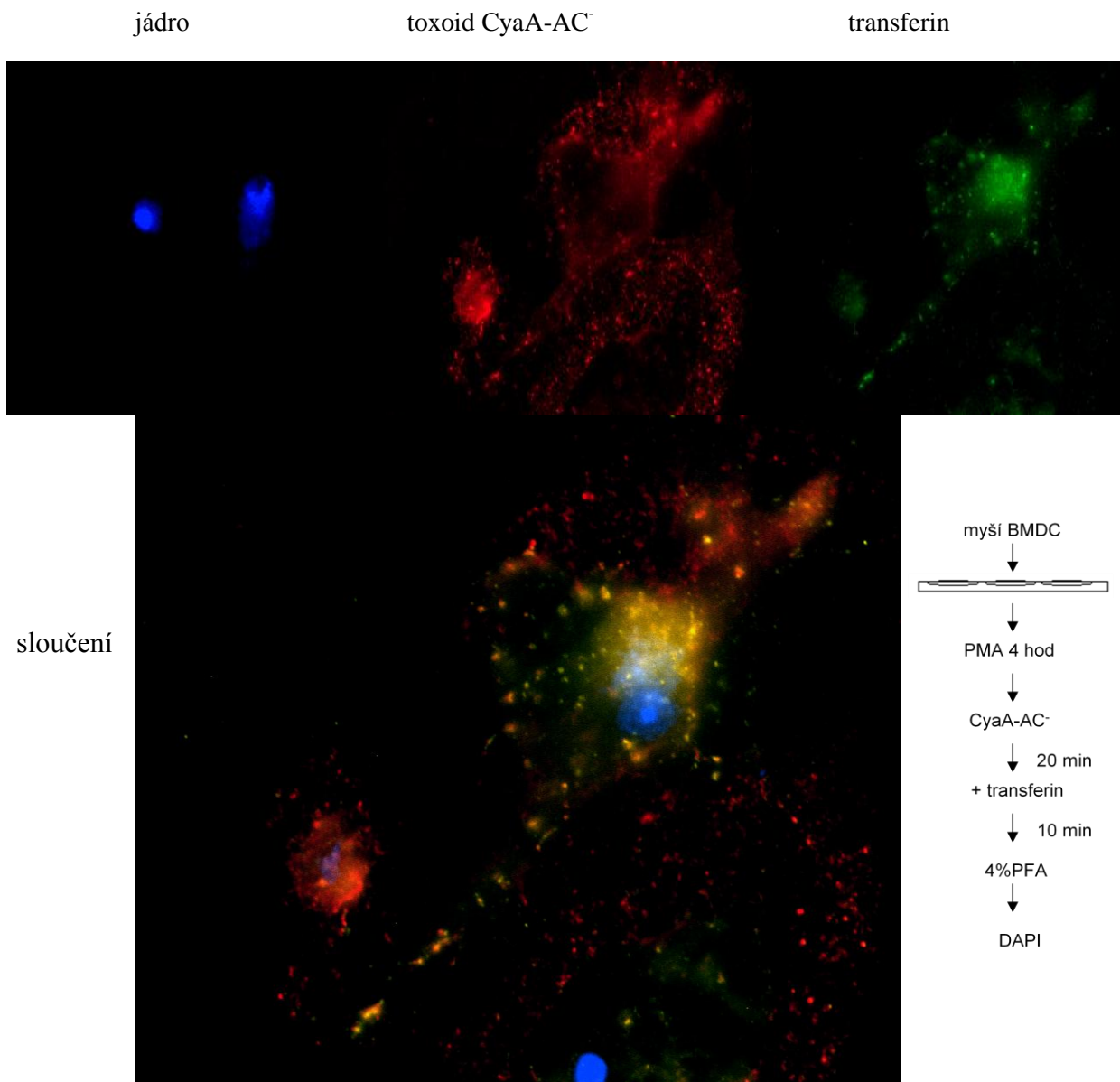
5.4 Endocytóza CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ v BMDC aktivovaných pomocí PMA

Část BMDC byla po převedení na mikroskopická sklíčka 4 hodiny inkubována s PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát) o koncentraci 0,1 µg/ml. Signalizace PMA způsobuje zvýšení koncentrace Ca²⁺ a DAG, což vede k aktivaci proteinu Rap1 a následně k aktivaci integrinu CD11b/CD18 (2.2.2). Aktivace integrinu pomocí PMA byla prokázána průtokovou cytometrií na buňkách lidské krve po přidání specifických protilátek (CBRM 1/5 a MEM-148). Tyto protilátky rozpoznávají otevřenou konformaci integrinového receptoru CD11b/CD18 (viz Obr. 16). Jelikož doposud nejsou k dispozici myší protilátky rozpoznávající aktivovaný stav integrinu, nebylo možné tento experiment potvrdit na BMDC. Dá se ale předpokládat, že u BMDC dochází k aktivaci integrinu stejným mechanismem. Po 4 hodinové preinkubaci buněk BMDC s PMA byly přidány jednotlivé toxoidy a byly vytvořeny trvalé preparáty stejným způsobem, jako je popsáno v předešlé kapitole (5.3). Schéma přípravy trvalých preparátů je opět uvedeno vpravo od snímků z fluorescenčního mikroskopu.

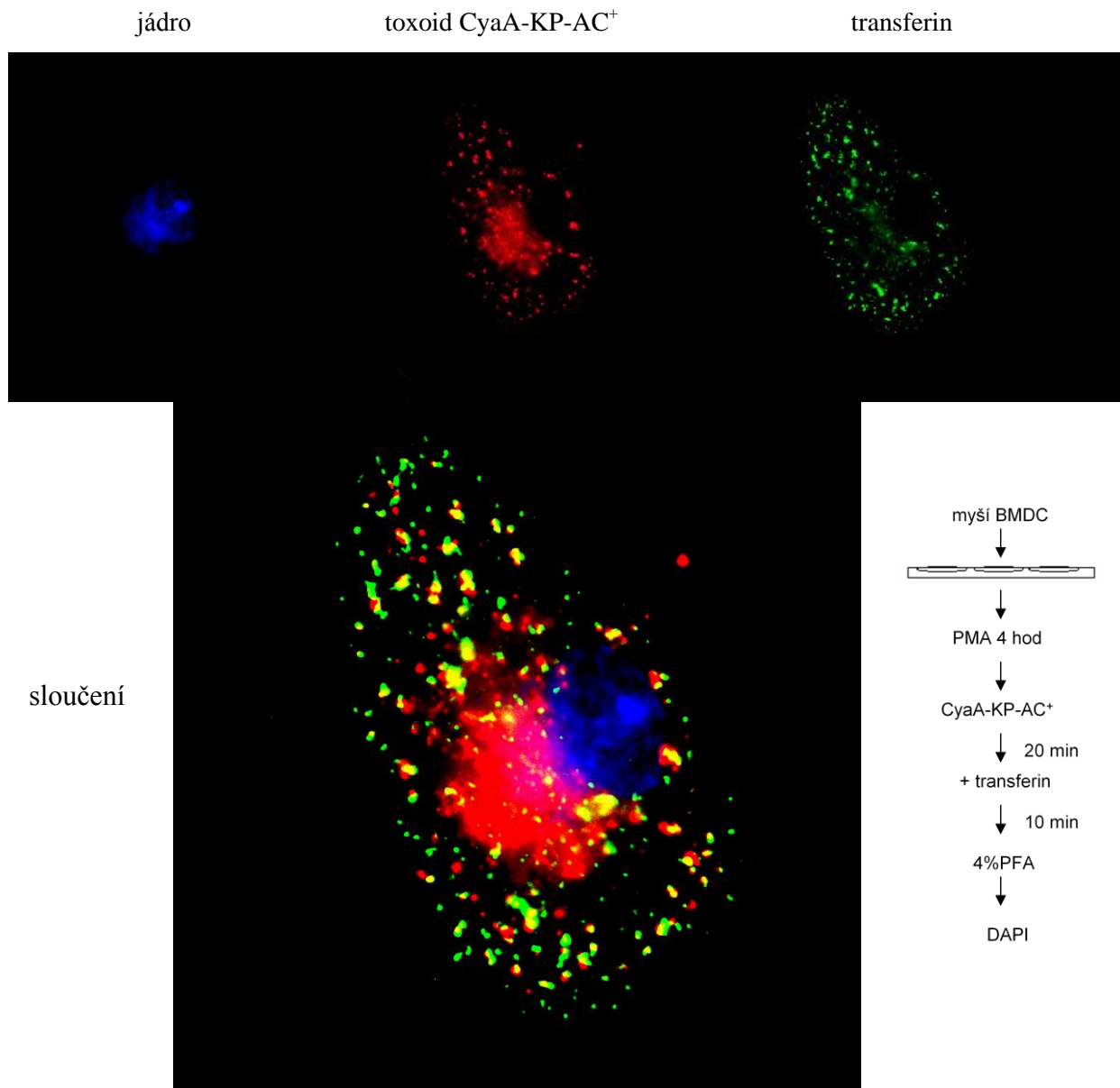
Při mikroskopické analýze endocytózy CyaA-AC⁻ v buňkách BMDC, které byly preinkubovány s PMA, jsem pozorovala kolokalizaci toxoidu s transferinem (Obr. 20). To znamená, že CyaA-AC⁻ je transportován dovnitř aktivovaných BMDC skrze váčky obsahující transferin a tudíž vstupuje do buněk klatrin-dependentní endocytózou.

Endocytóza byla poté analyzována s toxoidem CyaA-KP-AC⁺. U buněk opůsobených pomocí PMA, které měly aktivovaný integrinový receptor, byla pozorována zřetelná kolokalizace toxoidu s transferinem (Obr. 21). Z toho vyplývá, že CyaA-KP-AC⁺ vstupoval do aktivovaných buněk dráhou závislou na klatrinu. U toxoidu CyaA-KP-AC⁺ tak došlo ke změně endocytického vzorce oproti buňkám, které nebyly dopředu opůsobené pomocí PMA.

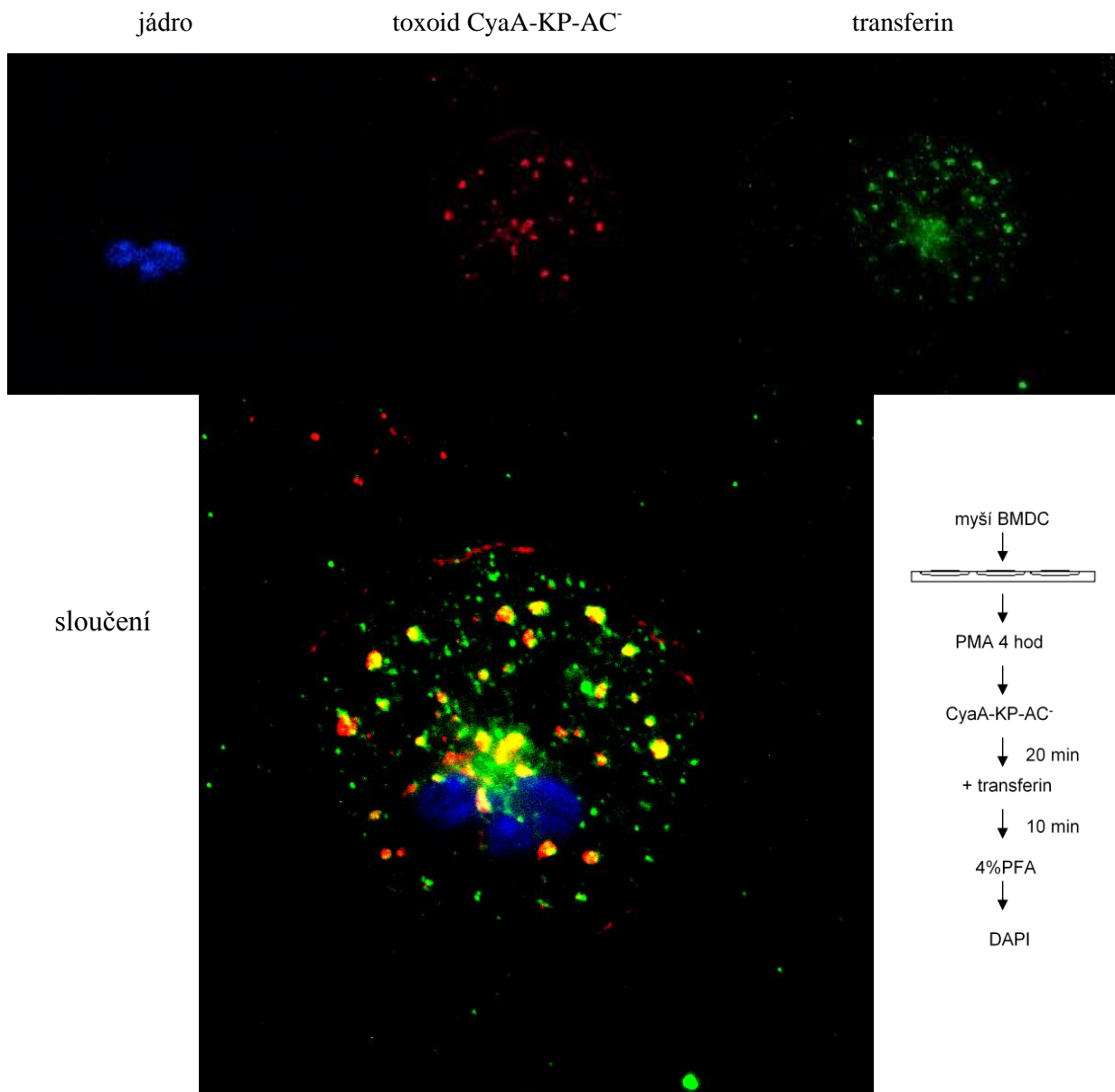
Nakonec byla na buňkách aktivovaných pomocí PMA provedena analýza s toxoidem CyaA-KP-AC⁻. Z Obr. 22 je patrná zřetelná kolokalizace toxoidu s transferinem. Toxoid CyaA-KP-AC⁻ je v aktivovaných BMDC endocytován stejnými váčky jako transferin. Jedná se tedy o klatrin-dependentní endocytózu. Mikroskopická analýza tak potvrdila stejné výsledky jako s toxoidem CyaA-KP-AC⁺.



Obr. 20: Mikroskopická analýza CyaA-AC⁻ na buňkách BMDC aktivovaných pomocí PMA. Žlutá barva znázorňující kolokalizaci toxoidu s transferinem ukazuje, že CyaA-AC⁻ je na aktivovaných BMDC endocytován dráhou závislou na klatrinu.



Obr. 21: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁺ na buňkách BMDC aktivovaných pomocí PMA. Po aktivaci buněk pomocí PMA pozorujeme kolokalizaci toxoidu s transferinem. Došlo ke změně endocytické dráhy CyaA-KP-AC⁺ na dráhu závislou na klatrinu.



Obr. 22: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁻ na buňkách BMDC aktivovaných pomocí PMA. Po aktivaci buněk pomocí PMA pozorujeme zřetelnou kolokalizaci toxoidu s transferinem. CyaA-KP-AC⁻ je v aktivovaných BMDC endocytován dráhou závislou na klatrinu.

5.5 Analýza buněk K562

Pro pochopení molekulárního mechanismu odlišných endocytických drah u CyaA-AC⁻ a CyaA-KP jsem se rozhodla pro mutaci cytoplazmatické části receptoru CD11b/CD18, která ovlivňuje endocytózu. Proto jsem potřebovala otestovat buněčný systém, který nemá nativní formu integrinu a bude vhodný pro toto studium. K tomuto účelu byly zvoleny buňky K562, které na svém povrchu nemají integrin CD11b/CD18. Jedná se o lidskou suspenzní linii získanou z kostní dřeně pacienta s chronickou myelogenní leukémií (CML).

5.5.1 Stabilní linie K562-CD11b/CD18

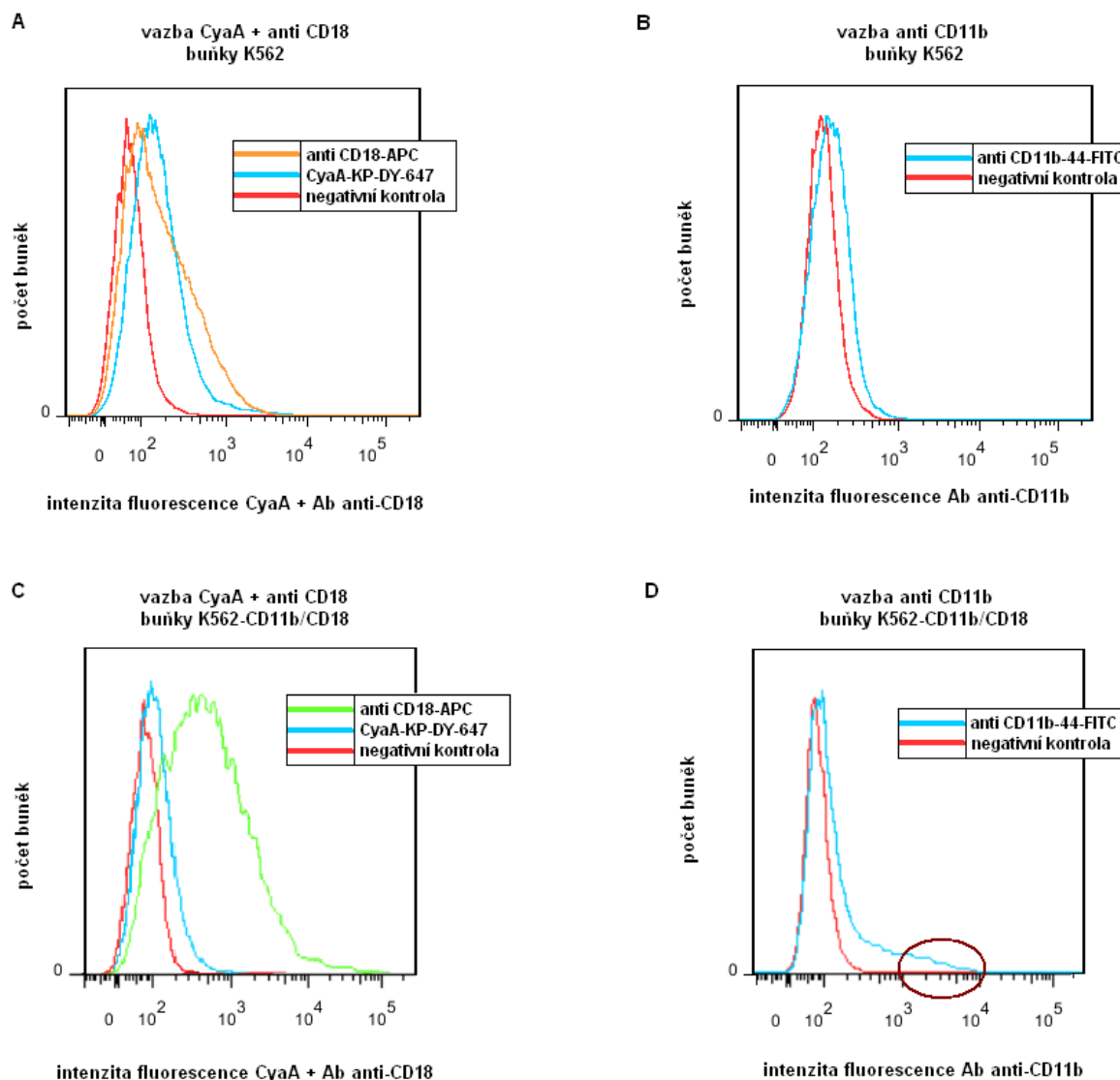
Nejprve jsem začala pracovat se stabilní linií buněk K562 exprimující integrin (označené K562-CD11b/CD18), která byla již dříve připravena v naší laboratoři. Tvorba trvalých preparátů pro mikroskopickou analýzu K562 byla ale odlišná od přípravy primárních buněk BMDC. Tím, že se jedná o suspenzní linii, vznikl velký problém s udržení buněk na mikroskopických sklech. Proto bylo nutné použít podkladovou vrstvu, která by zajistila přichycení buněk. Bylo vyzkoušeno několik materiálů, konkrétně lidský fibronectin (4.2.12.2), polylysin (4.2.12.4) a BD Matrigel (4.2.12.3). Příslušné množství podkladového materiálu bylo nanášeno na mikroskopická sklíčka předem připravená v jednotlivých jamkách 24 jamkové destičky (4.2.12.1) a destička byla vložena do 37 °C inkubátoru. Všechny typy vrstev byly před dalším použitím opláchnuty PBS. Jako nejlepší podkladová vrstva se jevil fibronectin, protože na BD Matrigel se buňky K562 téměř nepřichytily a na polylysinu buňky dokonce lyzovaly. S fibronectinem byla zaznamenána zhruba 50% úspěšnost přichycení buněk, proto byl nadále používán při mikroskopických experimentech.

Do jednotlivých jamek s předem připravenou vrstvou fibronectinu na mikroskopických sklech (4.2.12.2) bylo nanášeno 2×10^5 buněk K562-CD11b/CD18 a buňky byly inkubovány při 37 °C do druhého dne (4.2.12.5). Část buněk byla 4 hodiny preinkubována s PMA (phorbol-12-myristát-13-acetát). Následně byla k buňkám přidána fluorescenčně označená specifická mutanta toxinu (CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ nebo CyaA-KP-AC⁻) v koncentraci 3 µg/ml a buňky byly inkubovány po dobu 20 minut ve 37 °C. Poté byl k buňkám přidán fluorescenčně značený (sondou Dyomics-547) transferin naředěný na koncentraci 5 µg/ml. Buňky byly v CO₂ inkubátoru kultivovány dalších 10 minut při 37 °C (4.2.12.6). Po uplynutí doby inkubace buněk s toxoidem a transferinem byly buňky promyty a následně fixovány 4% paraformaldehydem. Nakonec byla obarvena jádra pomocí fluoroforu

DAPI a zalitím do Mowiolu byly vytvořeny trvalé preparáty (4.2.12.7), jenž byly analyzovány na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 81 Cell^R (4.2.13). Z těchto preparátů ale nebyla vyhotovena žádná fotodokumentace, protože obě mutanty toxinu poskytovaly velmi slabý signál v mikroskopu.

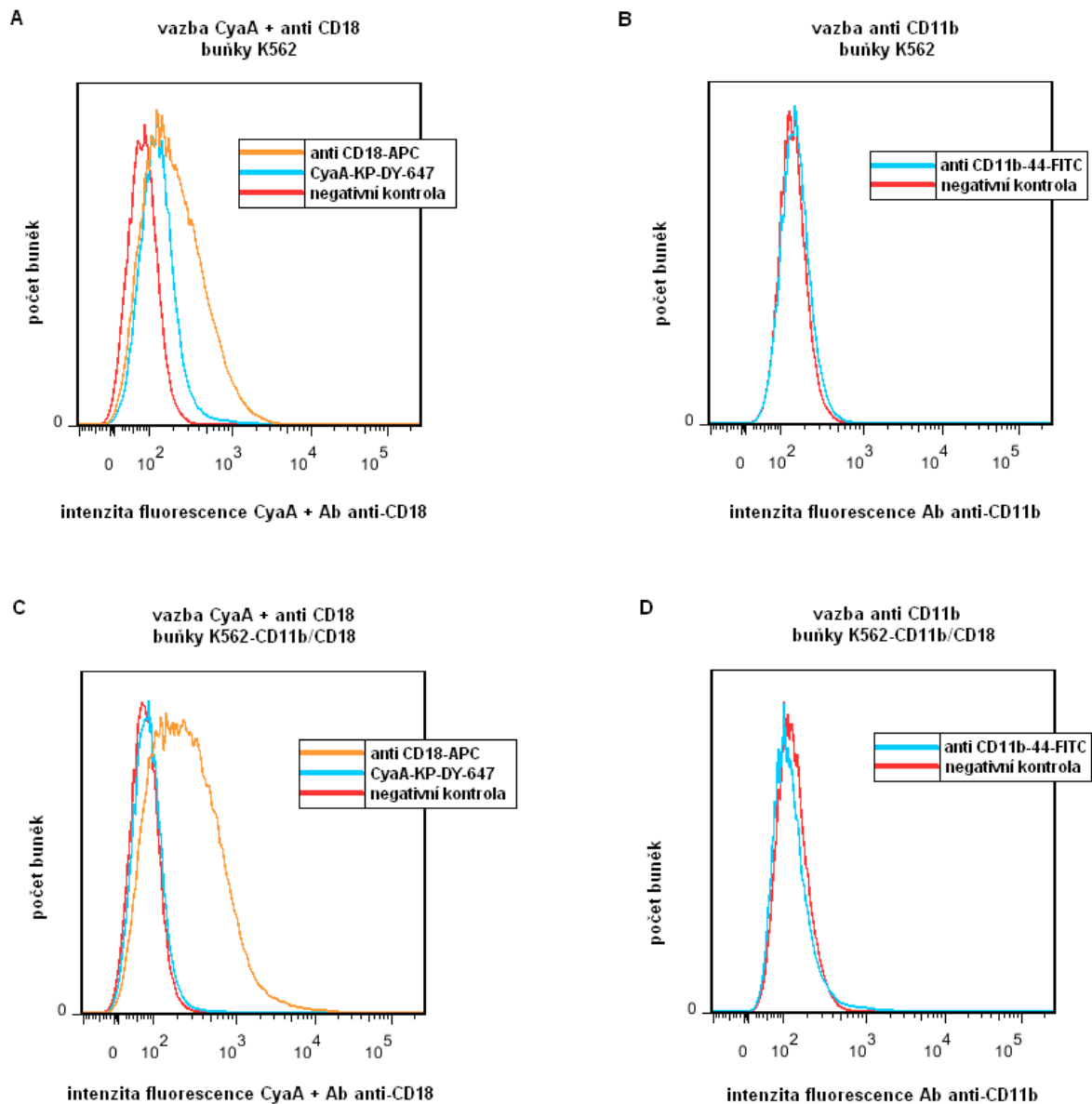
Hlavní příčina mohla být ta, že buněčná linie K562-CD11b/CD18 měla velmi nízkou expresi podjednotky integrinu CD11b, což bylo následně ověřeno pomocí průtokové cytometrie. K562 byly analyzovány jednak na vazbu toxoidu a jednak na vazbu protilátek proti jednotlivým podjednotkám integrinu. Jako negativní kontrola byly použity buňky K562 transfekované CD11b/CD18, ke kterým byl přidán pouze pufr HBSS. K suspenzi buněk určených k analýze průtokovým cytometrem byl přidán buď toxoid CyaA-KP fluorescenčně značený sondou Dyomics-647 (CyaA-KP-DY-647) naředěný v kompletním HBSS pufru do výsledné koncentrace 3 µg/ml nebo/a fluorescenčně značená monoklonální protilátka anti CD11b-44-FITC (ředění 1:80 v kompletním HBSS pufru) nebo/a anti CD18-APC (ředění 1:25 v kompletním HBSS pufru). Po 45 minutách inkubace směsi v lázni voda-led byly buňky promyty a následně naředěny v HBSS pufru. Do každé mikrozkušavky byl nakonec přidán fluorofor Hoechst 33258, který barví specificky DNA a slouží k určení viability buněk (4.2.14). Výsledné histogramy reprezentují pouze subpopulaci živých buněk (negativních na Hoechst).

Ob. 23A a 23B reprezentují buňky K562, Obr. 23C a 23D znázorňují buněčnou linii K562-CD11b/CD18. Z FACS analýzy je patrné, že buňky K562 nevykazovaly žádnou, nebo jen nepatrnou vazbu toxoidu a protilátek. Vazba toxoidu je nejspíš způsobená tím, že se CyaA může s nízkou účinností vázat i na buňky, jenž postrádají integrinový receptor CD11b/CD18 (2.3). Na Obr. 23C je vidět posun v intenzitě fluorescence protilátek u buněk K562-CD11b/CD18, ke kterým byla přidána protilátka rozpoznávající podjednotku integrinu CD18. To znamená, že tyto buňky vykazují silnou expresi podjednotky CD18. Naopak na stejném histogramu není vidět žádný posun v intenzitě fluorescence u buněk K562-CD11b/CD18, ke kterým byl přidán toxoid CyaA-KP. To znamená, že tento toxoid se na buňky K562-CD11b/CD18 neváže. Důvodem je, že tyto buňky mají velmi slabou expresi integrinové podjednotky CD11b, jak ukazuje Obr. 23D, kde jsou buňky K562-CD11b/CD18, ke kterým byla přidána protilátka rozpoznávající podjednotku integrinu CD11b. Vzhledem k tomu, že se CyaA váže právě na podjednotku integrinu CD11b, tak buňky, které tuto podjednotku nemají, nemohou vykazovat ani vazbu toxoidu.



Obr. 23: FACS analýza stabilních transfektantů K562-CD11b/CD18. Buňky byly inkubovány s toxoidem CyaA-KP-DY-647 ve finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a oběma protilátkami rozeznávajícími jednotlivé podjednotky integrinu CD11b/CD18 (anti CD11b-44-FITC, ředění 1:80 v HBSS pufru + anti CD18-APC, ředění 1:25 v HBSS pufru). Jako negativní kontrola byly použity buňky K562, ke kterým byl přidán pouze pufr HBSS (histogramy A a B), respektive buňky K562-CD11b/CD18, ke kterým byl přidán pouze pufr HBSS (histogramy C a D). Histogramy A-D reprezentují závislost intenzity fluorescence toxoidu nebo protilátek na počtu buněk. Hnědý ovál na histogramu D ohraničuje buňky, které byly vybrány k pozdějšímu vytřídění.

Z toho důvodu jsem se rozhodla udělat vytřídění těch buněk („cell sorting“), které na svém povrchu nesou integrinovou podjednotku CD11b (postup selekce je popsán v kapitole 4.2.15). K vytřídění byly zvoleny buňky z FACS analýzy, které jsou na Obr. 23D ohraničeny hnědým oválem.



Obr. 24: FACS analýza vytríděné stabilní linie K562-CD11b/CD18. Buňky byly inkubovány s toxoidem CyaA-KP-DY-647 o finální koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a oběma protilátkami rozeznávajícími jednotlivé podjednotky integrinu CD11b/CD18 (anti CD11b-44-FITC, ředění 1:80 v HBSS pufru + anti CD18-APC, ředění 1:25 v HBSS pufru). Jako negativní kontrola byly použity buňky K562, ke kterým byl přidán pouze pufr HBSS (histogramy A a B), respektive buňky K562-CD11b/CD18, ke kterým byl přidán pouze pufr HBSS (histogramy C a D). Histogramy A-D reprezentují závislost intenzity fluorescence toxoidu nebo protilátek na počtu buněk.

Třídění buněčné populace probíhalo na fluorescenčním průtokovém cytometru BD FACS Vantage SE pomocí laseru detekujícího fluorescenčně značenou protilátku proti CD11b (anti CD11b-44-FITC). Buňky byly separovány do 6 jamkové destičky s růstovým

médiem RPMI 1640 jako populace nesoucí integrin CD11b. Po vytřídění byly buňky 14 dní kultivovány při 37 °C.

Pro ověření exprese jednotlivých podjednotek integrinu na vyselektovaných buňkách byla po 14 dnech kultivace FACS analýza zopakována. Bohužel se ukázalo, že vyselektované buňky opět, a tentokrát zcela, ztratily expresi integrinové podjednotky CD11b, což ukazuje Obr. 24D. Vyselektované buňky nevykazovaly ani vazbu toxoidu (viz Obr. 24C). Zachována zůstala pouze exprese integrinové podjednotky CD18, která je znázorněna posunem intenzity fluorescence protilátky anti-CD18-APC na Obr. 24C. Tuto buněčnou linii jsem proto již nadále nepoužívala.

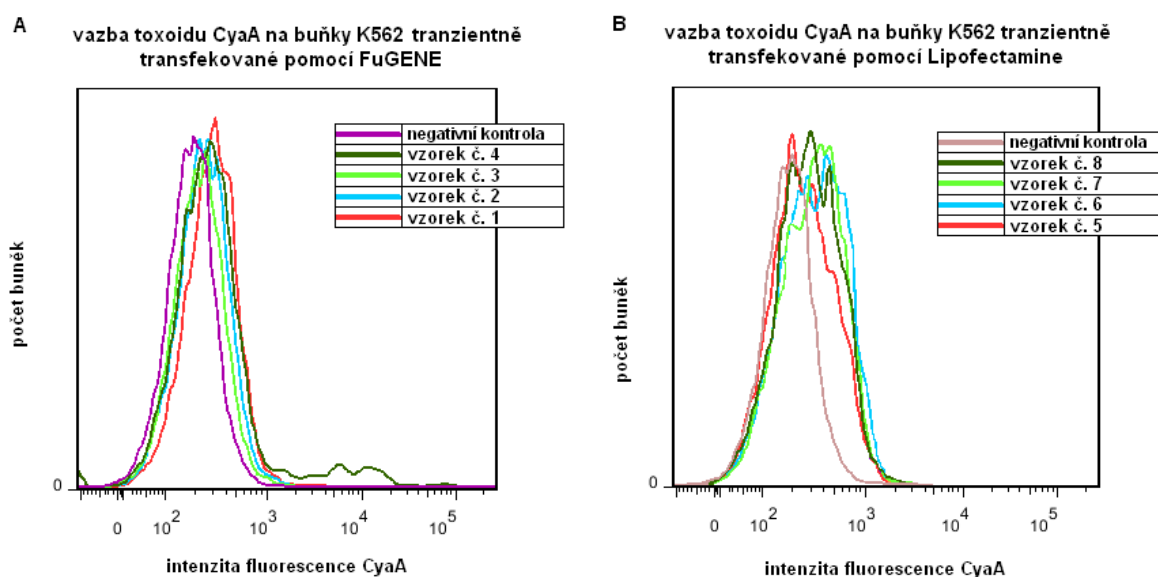
5.5.2 Tranzientní transfekce K562-CD11b/CD18

Vzhledem k tomu, že stabilní buněčná linie pravděpodobně ztrácela expresi CD11b/CD18, jsem se začala zabývat tranzientní transfekcí buněk K562. K zajištění povrchové exprese CD11b/CD18 bylo nutné do buněk vložit DNA kódující tyto dvě podjednotky receptoru. Pro transfekci byla vyžadována vyšší kvalita a čistota DNA, proto byl k izolaci zvolen postup midipreparace pomocí sady Lego (podrobně popsany v kapitole 4.2.3.3) a následné pročištění vyizolované DNA (viz kapitola 4.2.3.4). Plazmid příslušné DNA byl vnesen transformací teplotním šokem (4.2.3.8) do superkompetentních buněk *E. coli* XL-1 Blue (4.2.2). Identita vyizolovaných plazmidů byla ověřena pomocí elektroforézy v 0,6% (w/v) agarózovém gelu. Z gelů byl pořízen elektroforetogram pomocí dokumentačního systému Syngene G (4.2.3.7). Koncentrace vyizolované a pročištěné plazmidové dsDNA byla stanovena spektrofotometricky v kyvetě z křemenného skla (4.2.3.6).

Transfekce buněk K562 plazmidy integrinu CD11b a CD18 byla provedena pomocí lipofekce za použití 2 transfekčních činidel (Lipofectamine 2000 a FuGENE6) v rozdílných poměrech činidla ku DNA a také v různých poměrech DNA podjednotek integrinu CD11b ku CD18. Postup transfekce je popsán v kapitole 4.2.9 a 4.2.10.

Podmínky transfekce byly optimalizovány pomocí detekce exprese CD11b/CD18 na průtokovém cytometru. V této práci je uvedena pouze reprezentativní část vzorků. Pro účely analýzy průtokovou cytometrií byly transfekované buňky inkubovány buď pouze se značeným toxoidem (CyaA-KP-DY-647) ve výsledné koncentraci 3 µg/ml, který by se měl vázat na CD11b molekulu, nebo byly buňky inkubovány s toxoidem CyaA-KP-DY-647 a současně s protilátkami proti oběma podjednotkám integrinu (anti CD11b-44-FITC, ředění

1:80 v HBSS pufru + anti CD18-APC, ředění 1:25 v HBSS pufru), které poskytly přímý důkaz o expresi jednotlivých podjednotek.



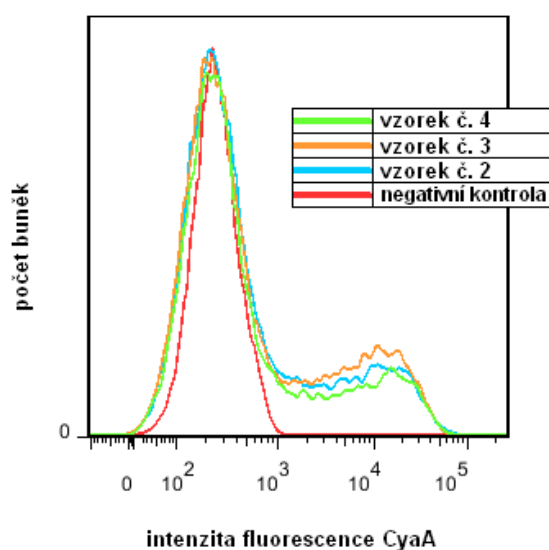
číslo vzorku		1	2	3	4
FuGENE6	poměr CD11b/CD18	1:2	1:2	1:3	1:3
	koncentrace CD11b:CD18 v µg/ml	0,9:1,8	0,9:1,8	0,65:1,95	0,65:1,95
	množství FuGENE	8 µl	10 µl	8 µl	10 µl
číslo vzorku		5	6	7	8
Lipofectamine	poměr CD11b/CD18	1:2	1:2	1:3	1:3
	koncentrace CD11b:CD18 v µg/ml	0,9:1,8	0,9:1,8	0,65:1,95	0,65:1,95
	množství Lipofectaminu	6 µl	8 µl	6 µl	8 µl
K562 – negativní kontrola					

Obr. 25: FACS analýza buněk K562 tranzientně transfekovaných integrinem CD11b/CD18 v různých poměrech DNA a transfekčních činidel. Buňky byly inkubovány s toxoidem CyaA-KP-DY-647. Jako negativní kontrola byly použity netransfekované buňky K562, ke kterým byl přidán pufr HBSS. Histogramy A a B reprezentují závislost intenzity fluorescence toxoidu na počtu buněk.

Na Obr. 25A je vidět posun intenzity fluorescence pouze u vzorku č. 4, který ukazuje vazbu toxoidu CyaA-KP-DY-647 na transfekované buňky. Posun intenzity fluorescence je však natolik malý, že odpovídá úspěšnosti transfekce zhruba 5-10 %. To znamená, že pouze 5-10 % tranzientně natransfekovaných buněk K562-CD11b/CD18 váže toxoid CyaA. U ostatních vzorků nebyla prokázána žádná vazba toxoidu.

Podmínky tranzientní transfekce byly proto dále optimalizovány. Pokud byl k transfekci zvolen nadbytek plazmidové DNA pro podjednotku integrinu CD11b vůči podjednotce CD18 v poměru 2:1, respektive 3:1 a zároveň bylo navýšeno množství transfekčního činidla Lipofectamine 2000 oproti doporučením uvedeným výrobcem na množství 6 μ l, respektive 9 μ l, tak bylo dosaženo zhruba 30% úspěšnosti vazby toxoidu na buňky, jak je vidět na Obr. 26.

vazba toxoidu CyaA na buňky K562 tranzientně transfekované pomocí Lipofectamine

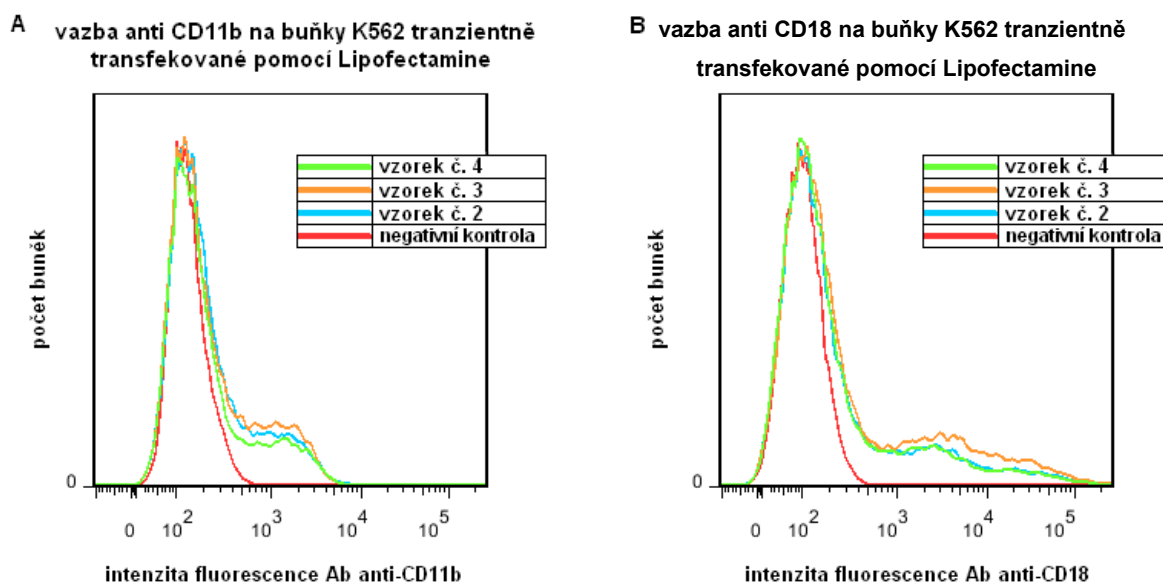


číslo vzorku	1	2	3	4
poměr CD11b/CD18		3:1	2:1	3:1
koncentrace CD11b:CD18 v μ g/ml	K562	1,8:0,6	1,6:0,8	1,8:0,6
množství Lipofectamine	negativní kontrola	6 μ l	9 μ l	9 μ l

Obr. 26: FACS analýza buněk K562 tranzientně transfekovaných integrinem CD11b/CD18 v různých poměrech DNA a transfekčního činidla. Buňky byly inkubovány s toxoidem CyaA-KP-DY-647 ve výsledné koncentraci 3 μ g/ml. Jako negativní kontrola byly použity netransfekované buňky K562, ke kterým byl přidán pufr HBSS. Histogram reprezentuje závislost intenzity fluorescence toxoidu na počtu buněk. Popis vzorků je shrnut v příložené tabulce.

Stejně vzorky byly zároveň podrobeny FACS analýze i na vazbu protilátek proti podjednotkám integrinu CD11b a CD18 (Obr. 27). Jak je zřetelně vidět na Obr. 27A, na kterém jsou zobrazeny transfekované buňky, ke kterým byla přidána protilátka proti podjednotce integrinu CD11b (anti CD11b-44-FITC). Expres podjednotky CD11b byla detekována také zhruba u 30 % buněk, což koreluje s množstvím transfekovaných buněk, na

kteří se váže toxoid. Na Obr. 27B jsou transfekované buňky, které byly inkubovány s protilátkou rozpoznávající podjednotku integrinu CD18 (anti CD18-APC). Jak lze z histogramu vyvodit, posun intenzity fluorescence této protilátky dosahuje hodnot 10^5 , z čehož plyne, že podjednotka integrinu CD18 je exprimována ve větší míře, než podjednotka CD11b, kde posun intenzity fluorescence dosahuje hodnot pouze 10^4 (Obr. 27A).



číslo vzorku	1	2	3	4
poměr CD11b/CD18		3:1	2:1	3:1
koncentrace CD11b:CD18 v $\mu\text{g/ml}$	K562	1,8:0,6	1,6:0,8	1,8:0,6
množství Lipofectamine	negativní kontrola	6 μl	9 μl	9 μl

Obr. 27: FACS analýza buněk K562 tranzientně transfekovaných integrinem CD11b/CD18 v různých poměrech DNA a transfekčního činidla. Buňky byly inkubovány s protilátkami rozeznávajícími jednotlivé podjednotky integrinu CD11b/CD18 (anti CD11b-44-FITC, ředěná 1:80 v HBSS pufru + anti CD18-APC, ředěná 1:25 v HBSS pufru). Jako negativní kontrola byly použity netransfekované buňky K562, ke kterým byl přidán pufr HBSS. Histogramy A a B reprezentují závislost intenzity fluorescence toxoidu na počtu buněk. Popis vzorků je shrnut v příložené tabulce.

Po optimalizaci podmínek byla dosažena úspěšnost transfekce okolo 20-30 %. To znamená, že zhruba 20-30 % transfekovaných buněk neslo na svém povrchu integrinový receptor CD11b/CD18 a byla prokázána vazba toxoidu na buňky.

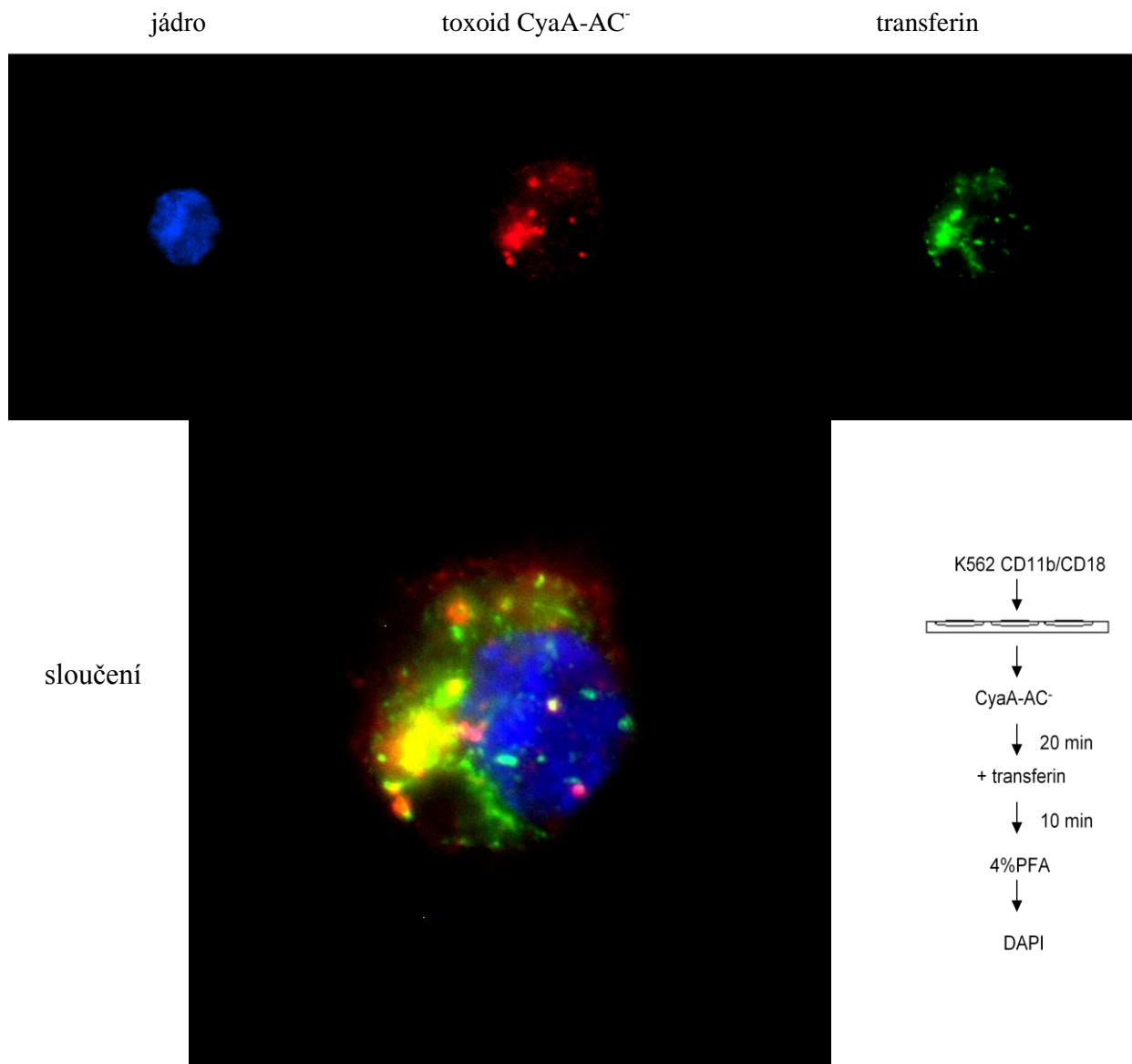
5.6 Endocytóza CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ v tranzientně transfekovaných buňkách K562-CD11b/CD18

Pro otestování, zdali je lidská linie buněk K562 vhodná pro studium mutagenese cytoplazmatické části komplementového receptoru CD11b/CD18, jsem potřebovala ověřit, zda je endocytóza CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ stejná jako na myších primárních buňkách BMDC, které exprimují integrinový receptor v nativní formě. Proto byly z tranzientně transfekovaných buněk K562-CD11b/CD18 třetí den po transfekci vytvořeny trvalé preparáty stejným způsobem, jako je popsáno u stabilních transfektantů K562-CD11b/CD18 (5.3). Buňky byly analyzovány na invertovaném fluorescenčním mikroskopu Olympus IX 81 Cell^R (4.2.13) se stejným nastavením, jako při analýze myších BMDC. Buněčnému jádru byla na snímcích z fluorescenčního mikroskopu přidělena modrá barva, toxoidům CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ červená barva a transferin je zbarven zeleně.

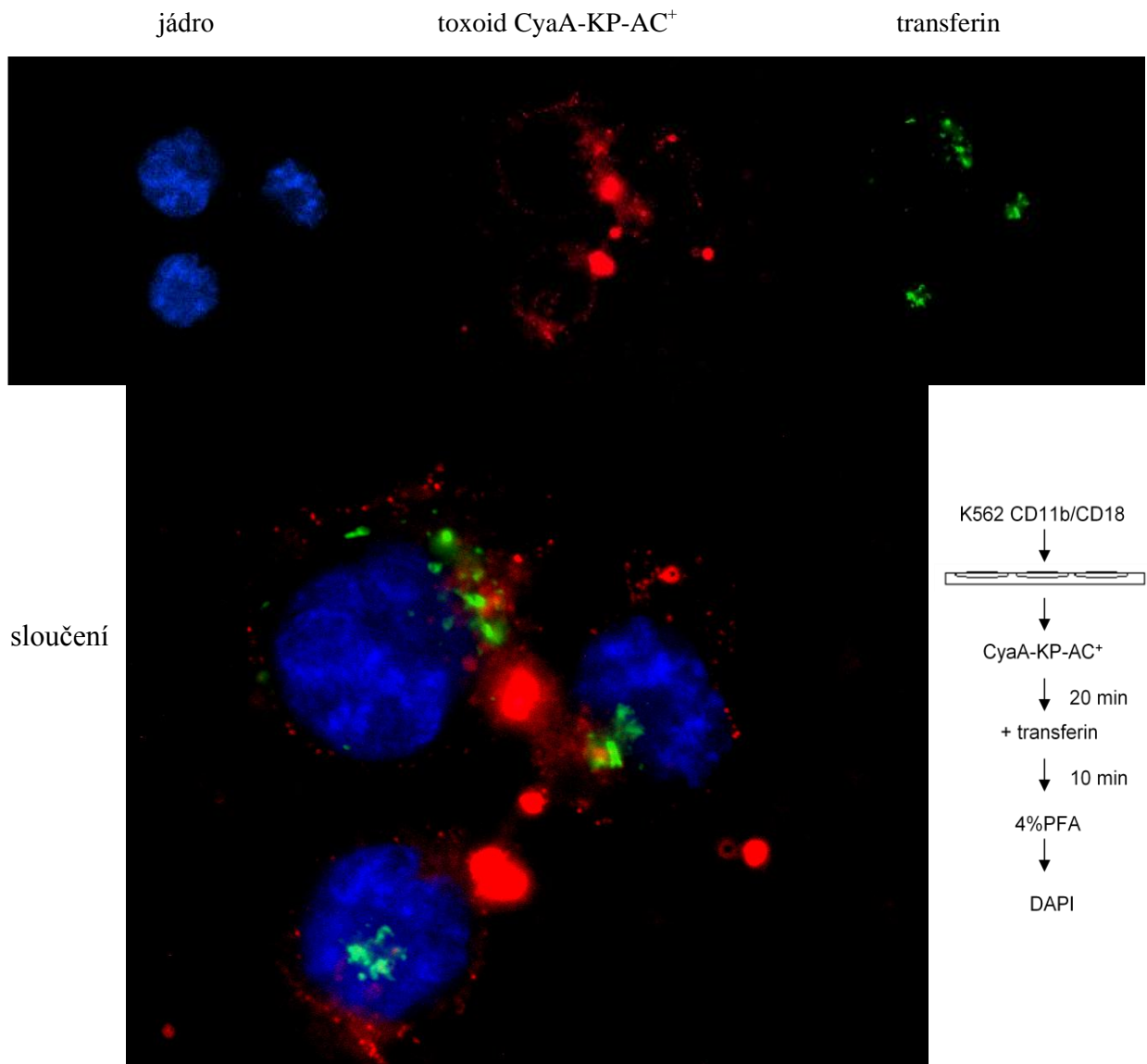
Při mikroskopické analýze CyaA-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18 jsem pozorovala kolokalizaci toxoidu s transferinem (Obr. 28), což demonstruje, že CyaA-AC⁻ vstupuje dovnitř buněk K562 spolu s transferinem, který využívá klatrin-dependentní dráhu.

Obdobně jako u BMDC vypadala i zde situace při srovnávání endocytózy CyaA-AC⁻ s dvojitě mutovaným CyaA-KP-AC⁺, který není schopný podpořit vtok Ca²⁺ do buněk. CyaA-KP-AC⁺ je však v malé míře (přibližně 1-2 % oproti divoké formě CyaA) schopný vyvolat přeměnu ATP na cAMP. Podle naší hypotézy po vazbě CyaA-KP na receptor nedojde k aktivaci integrinu, což navede CyaA-KP do jiné endocytické dráhy, než toxoid CyaA-AC⁻. Při mikroskopické analýze endocytózy CyaA-KP-AC⁺ na buňkách K562-CD11b/CD18 skutečně nebyla pozorována žádná kolokalizace s transferinem (Obr. 29). Toxoid CyaA-KP-AC⁺ tak vstupoval dovnitř buňky jinou drahou, která je na klatrinu nezávislá.

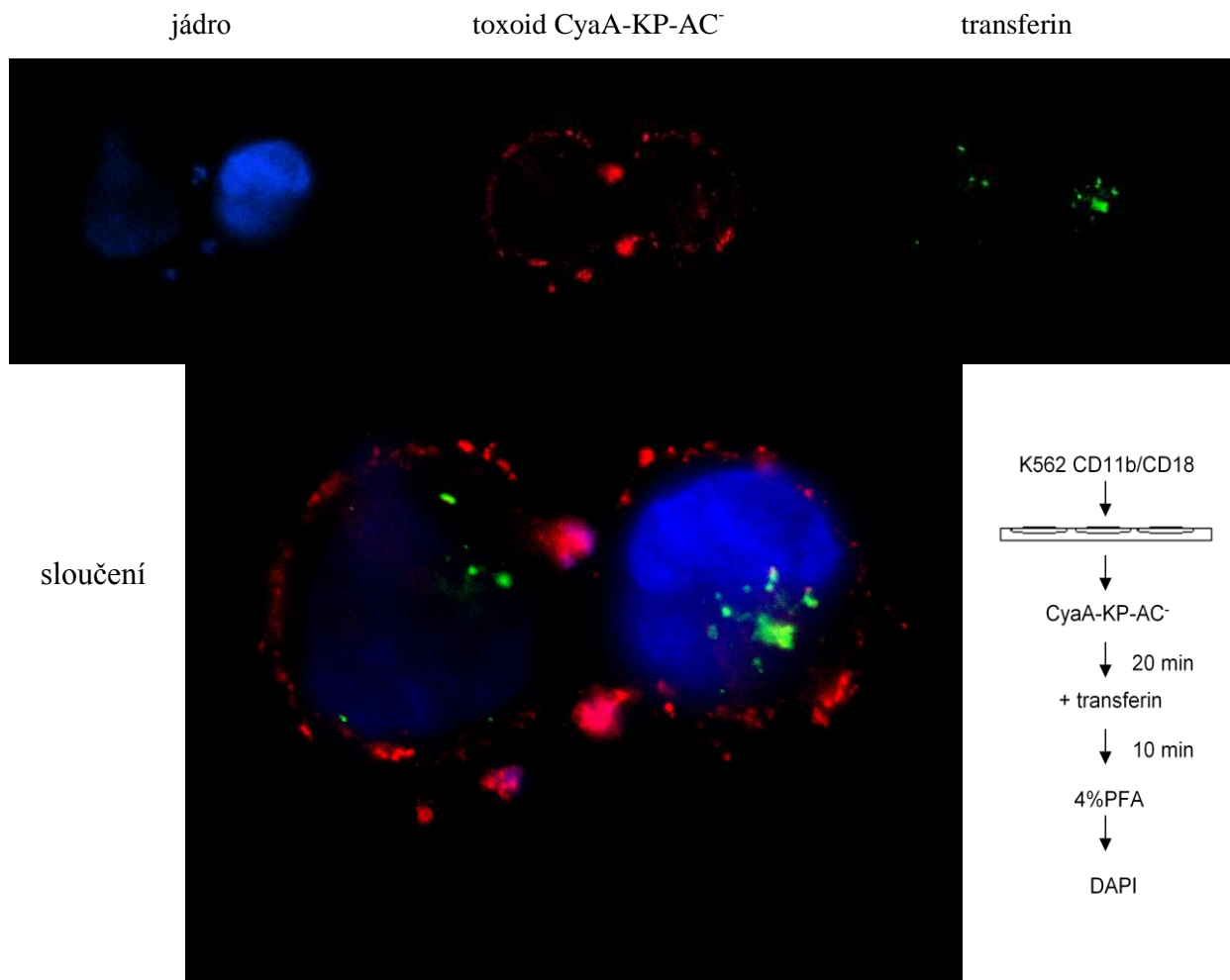
Aby bylo vyvráceno, že změnu endocytického vzorce způsobuje cAMP, byla provedena mikroskopická analýza s toxoidem CyaA-KP-AC⁻, který stejně jako předešlá varianta toxinu (CyaA-KP-AC⁺) není schopný vyvolat vtok vápenatých iontů, a navíc zcela postrádá adenylátcyklázovou aktivitu. Mikroskopická analýza endocytózy toxoidu CyaA-KP-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18 neukázala žádnou, nebo jen minimální kolokalizaci toxoidu s transferinem (Obr. 30). CyaA-KP-AC⁻ tudíž endocytoval dovnitř buněk K562 na klatrinu nezávislou drahou, stejně jako v případě CyaA-KP-AC⁺ a stejně jako v případě BMDC.



Obr. 28: Mikroskopická analýza CyaA-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18. Žlutá barva znázorňující kolokalizaci toxoidu s transferinem ukazuje, že CyaA-AC⁻ je endocytován do buněk K562-CD11b/CD18 dráhou závislou na klatrinu.



Obr. 29: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁺ na buňkách K562-CD11b/CD18. Na snímku nepozorujeme žádnou kolokalizaci toxoidu s transferinem. CyaA-KP-AC⁺ je v buňkách K562-CD11b/CD18 endocytován dráhou nezávislou na klatrinu.



Obr. 30: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18. Na snímku nepozorujeme žádnou kolokalizaci toxoidu CyaA-KP-AC⁻ s transferinem. Tato mutantní varianta toxinu je v buňkách K562-CD11b/CD18 endocytována dráhou nezávislou na klatrinu.

5.7 Endocytóza CyaA-AC⁻, CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ v tranzientně transfekovaných buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA

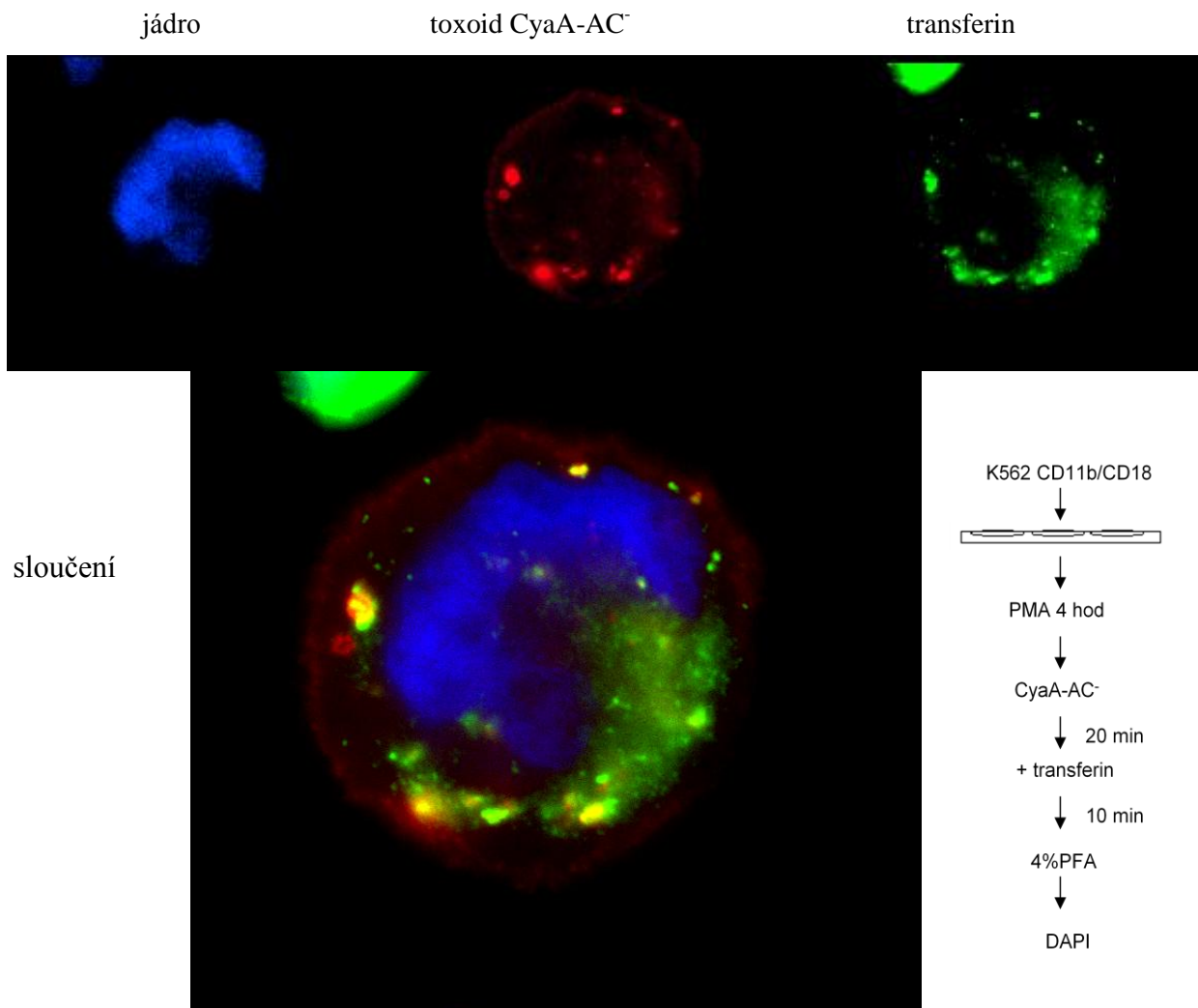
Tranzientně transfekované buňky K562-CD11b/CD18 byly po převedení na mikroskopická sklíčka 4 hodiny inkubovány s PMA o koncentraci 0,1 µg/ml. Poté byly přidány jednotlivé toxoidy a byly vytvořeny trvalé preparáty stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 5.3.

Mikroskopická analýza endocytózy CyaA-AC⁻ u tranzientně transfekovaných buněk K562-CD11b/CD18 potvrdila stejné výsledky jako v případě myších BMDC. U buněk, které byly preinkubovány s PMA, byla pozorována kolokalizace toxoidu CyaA-AC⁻ s transferinem (Obr. 31). Z toho vyplývá, že CyaA-AC⁻ je endocytován dovnitř buněk K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA skrze váčky obsahující transferin a tudíž vstupuje do buněk klatrin-dependentní dráhou.

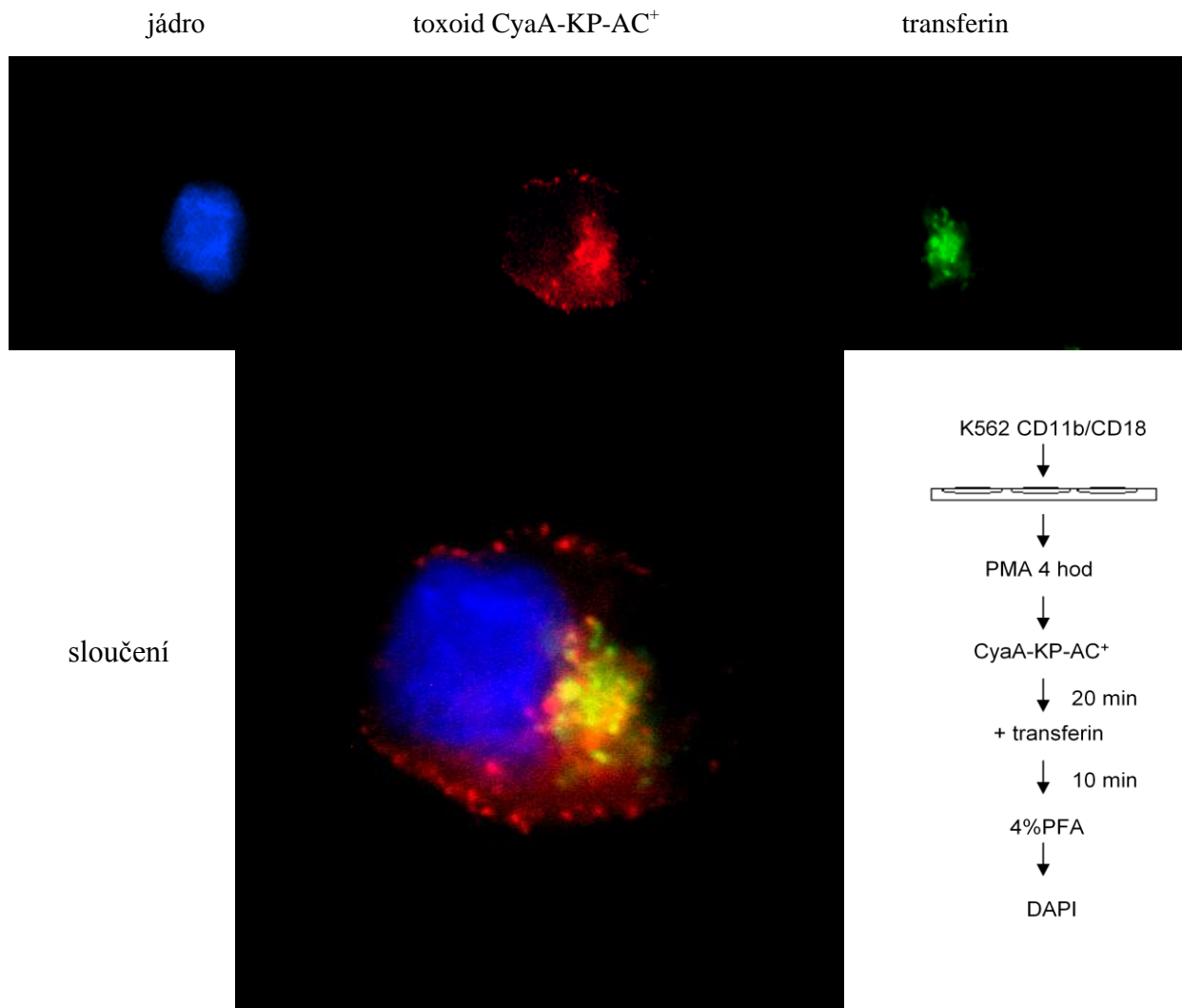
Endocytóza byla poté pozorována s toxoidem CyaA-KP-AC⁺, který není schopný vyvolat vtok Ca²⁺ do buněk. Pokud byly buňky K562 dopředu preinkubované s PMA, který způsobil aktivaci integrinového receptoru CD11b/CD18, tak došlo ke změně endocytózy oproti buňkám, jež nebyly dopředu opůsobené pomocí PMA. Po vystavení aktivovaných buněk K562-CD11b/CD18 působení toxoidu CyaA-KP-AC⁺ byla pozorována kolokalizace s transferinem (Obr. 32). CyaA-KP-AC⁺ tak vstupoval do aktivovaných buněk K562-CD11b/CD18 dráhou závislou na klatrinu.

Mikroskopická analýza poslední varianty toxoidu působícího na tranzientně transfekované buňky K562-CD11b/CD18 také potvrdila předešlá pozorování. I v tomto případě toxoid CyaA-KP-AC⁻, který není schopný vyvolat vtok vápenatých iontů, na buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA kolokalizoval s transferinem (Obr. 33). Byl tudíž endocytován stejnými váčky jako transferin a jedná se proto o klatrin-dependentní endocytózu.

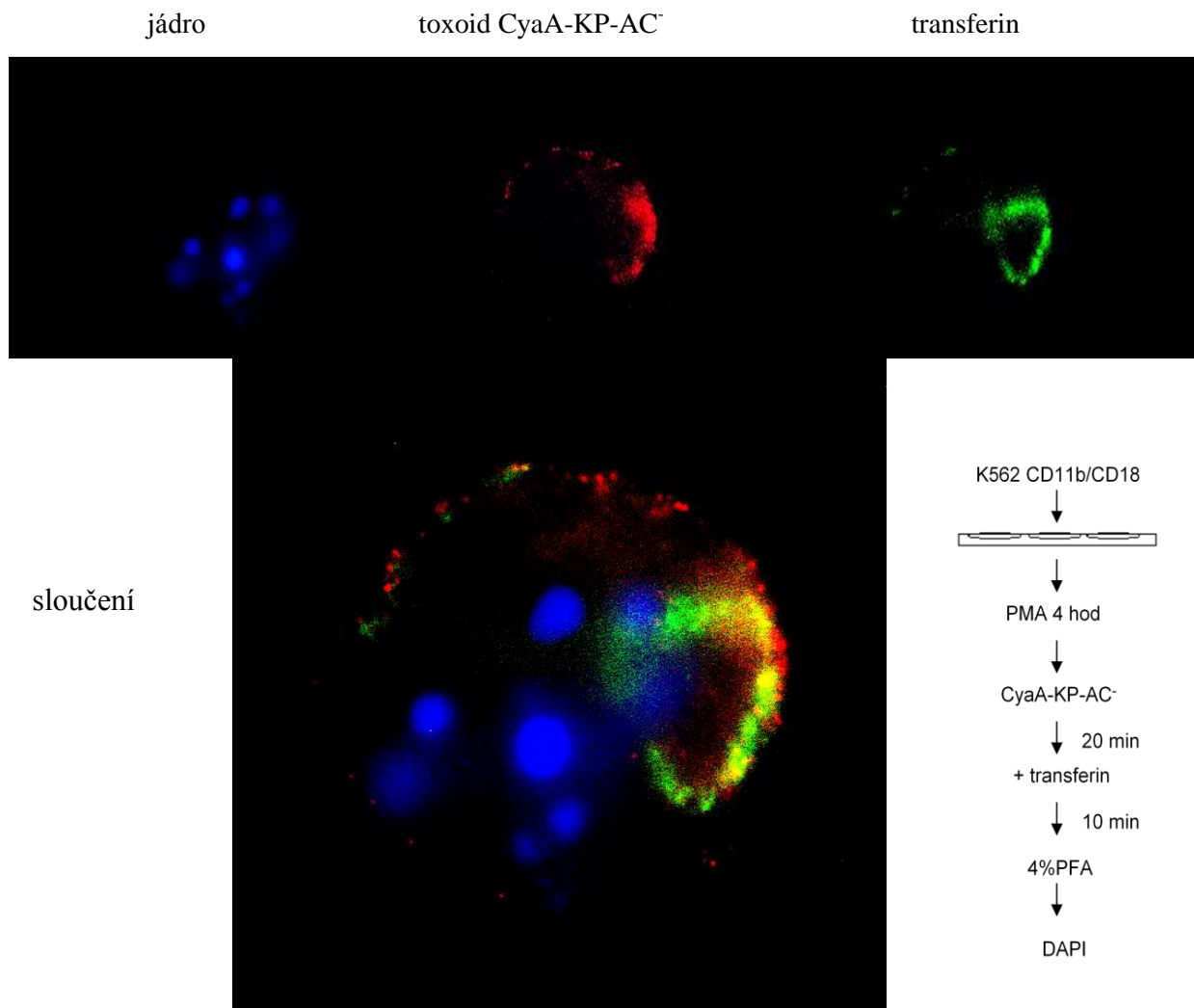
Výsledky mikroskopické analýzy endocytózy jednotlivých mutant toxinu CyaA na tranzientně transfekovaných buňkách K562-CD11b/CD18 se tak shodují s předchozím pozorováním na trvalých preparátech myších makrofágů derivovaných z buněk kostní dřeně.



Obr. 31: Mikroskopická analýza CyaA-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA. Žlutá barva znázorňuje kolokalizaci toxoidu s transferinem, což demonstruje, že CyaA-AC⁻ je na aktivovaných K562-CD11b/CD18 endocytován dráhou závislou na klatrinu.



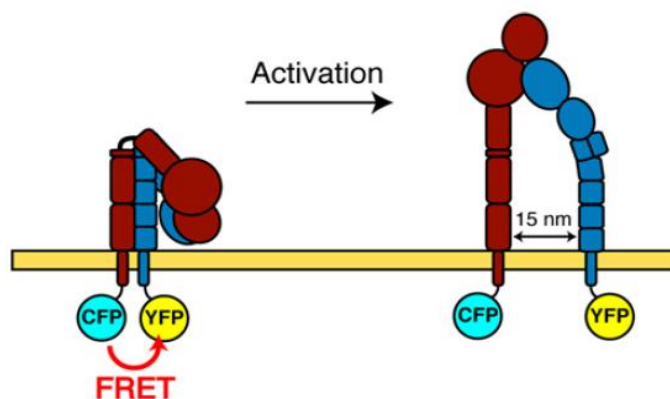
Obr. 32: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁺ na buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA. Po aktivaci buněk pomocí PMA pozorujeme kolokalizaci toxoidu s transferinem, z čehož vyplývá, že v aktivovaných K562-CD11b/CD18 došlo ke změně endocytické dráhy CyaA-KP-AC⁺ na dráhu závislou na klatrinu.



Obr. 33: Mikroskopická analýza CyaA-KP-AC⁻ na buňkách K562-CD11b/CD18 aktivovaných pomocí PMA. Po aktivaci buněk pomocí PMA pozorujeme kolokalizaci toxoidu s transferinem, takže v aktivovaných K562-CD11b/CD18 je CyaA-KP-AC⁻ endocytován dráhou závislou na klatrinu.

5.8 Příprava buněk na analýzu otevřené a zavřené konformace integrinu pomocí metody FRET

Metoda FRET (Försterův rezonanční energetický přenos) byla zvolena pro ověření hypotézy aktivace integrinu po vazbě toxoidu CyaA-AC⁻, který způsobuje vtok vápenatých iontů do buněk. Vzhledem k tomu, že jsem byla schopná detekovat aktivovaný stav integrinu po vazbě specifických protilátek rozpoznávajících otevřenou konformaci integrinu (viz kapitola 5.2), tak jsem chtěla tyto výsledky ověřit pomocí další metody. Z laboratoře mikrobiologie a imunologie Centra pro vakcinační biologii a imunologii Davida H. Smitha v New Yorku jsem obdržela plazmidy jednotlivých podjednotek integrinu, které kódují fluorescenční protein navázaný v cytoplazmatické části integrinu. Konkrétně podjednotka CD11b (α_M -CFP) má na svém C konci navázaný CFP (z angl. Cyan Fluorescent Protein) a podjednotka CD18 (β_2 -YFP) má na svém C konci navázaný YFP (z anglického Yellow Fluorescent Protein). Během aktivace receptoru v důsledku vazby ligandu (například toxoidu), přechází integrin ze sklopené do napřímené konformace. Současně dochází k oddálení obou cytoplazmatických částí. To znamená, že u neaktivní formy integrinu by měla být detekována maximální účinnost přenosu energie, zatímco po aktivaci integrinu by se měla vzdálenost mezi CFP a YFP zvětšit natolik, že by k přenosu energie nemělo docházet (Obr. 34).



Obr. 34: Schématické zobrazení ztráty FRET mezi α_M -CFP a β_2 -YFP během aktivace integrinu. Převzato a upraveno z (Lefort *et al.*, 2009).

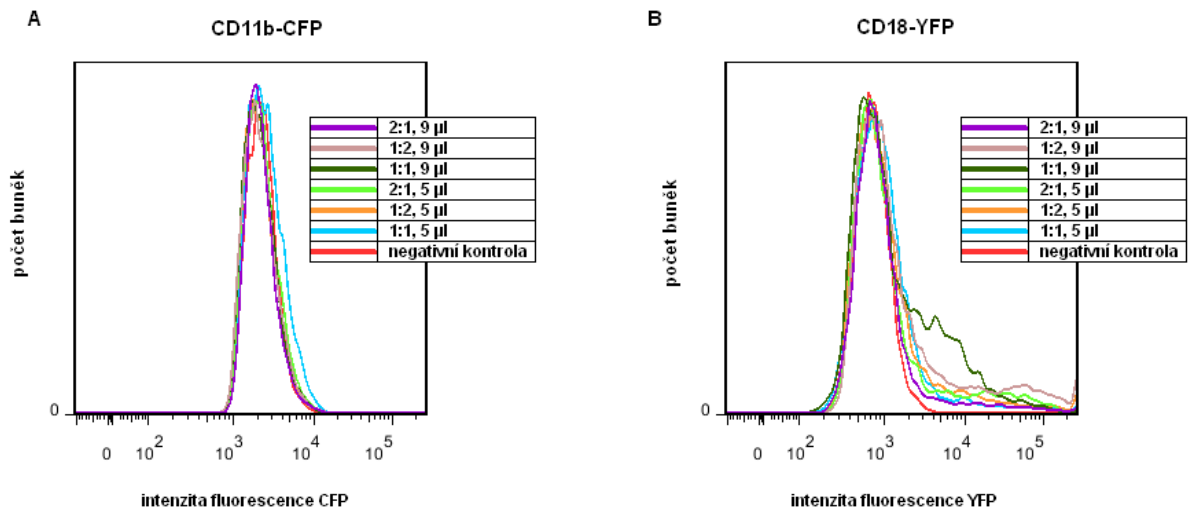
Tento experiment byl započat tím, že byly z obdržených plazmidů připraveny zásobní roztoky DNA (4.2.3.3). Izolované plazmidy byly zkontrolovány sekvenační analýzou (4.2.3.9) ve středisku sekvenování DNA, MBÚ AV ČR v Praze, která potvrdila totožnost

plazmidů. Plazmidy byly poté natransfekovány do CHO buněk (z anglického Chinese hamster ovary), což je adherentní tkáňová linie získaná z vaječníků křečka čínského (*Cricetulus griseus*). Stejně jako v případě buněk K562 bylo vyzkoušeno více variant poměrů DNA a transfekčního činidla.

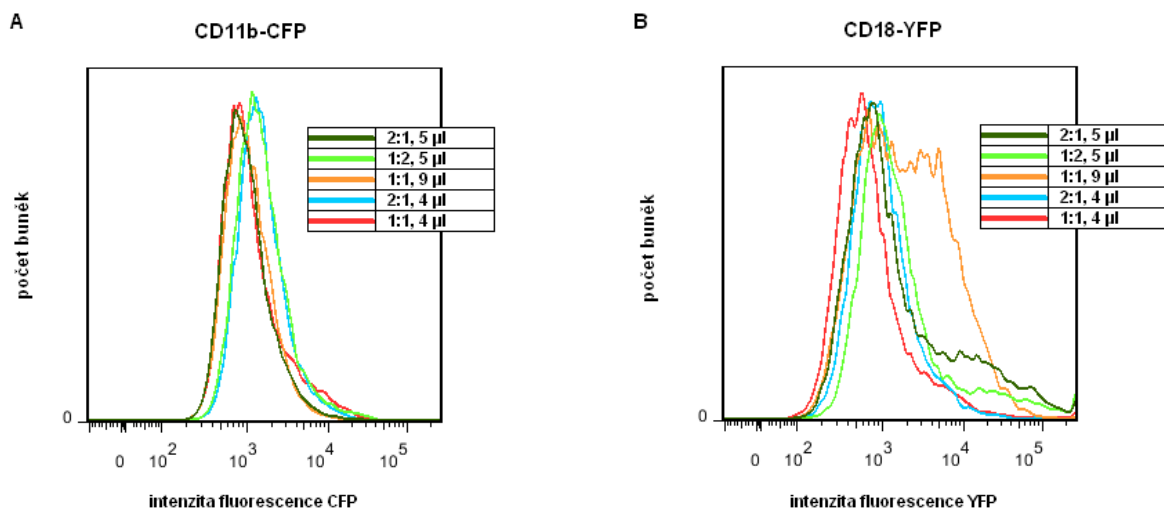
Pomocí selekčního antibiotika G418 byla následně snaha vytvořit stabilní linii transfektantů. Nejprve bylo nutné otestovat citlivost CHO buněk. Bylo potřeba zjistit, při jaké koncentraci selekčního antibiotika začnou netransfekované CHO buňky odumírat. K tomuto účelu byla připravena koncentrační řada selekčního antibiotika G418 v F12 růstovém médiu CHO buněk. Ze zásobního roztoku G418 o koncentraci 100 mg/ml bylo připraveno 10 vzorků s lineárně stoupající koncentrací antibiotika od 100 µg/ml po 1000 µg/ml. Do 10 jamek s CHO buňkami pak byly přidány jednotlivé koncentrace G418 v F12 médiu. Buňky byly inkubovány po dobu 7 dnů ve 37°C a po celou dobu byly pozorovány. Na základě sledování odumírání buněk bylo vyhodnoceno, že buňky CHO začínají odumírat již při koncentraci G418 400 µg/ml, zatímco při koncentraci 1000 µg/ml nebyla nalezena ani jediná intaktní buňka. K selekci byla proto zvolena koncentrace antibiotika G418 1000 µg/ml. Transfekované buňky CHO- α_M -CFP/ β_2 -YFP byly selektovány vždy po dobu 3 týdnů.

Poté byla udělána kontrolní FACS analýza na expresi jednotlivých podjednotek integrinu, která opakovaně prokázala, že podjednotka CD11b-CFP po třech týdnech selekce buněk stále ztrácela svou expresi, jak ukazují Obr. 35 a 36. Selekcí současně ztěžoval fakt, že plazmidy obou podjednotek nesou rezistenci vůči stejnému antibiotiku (G418). Nebylo tedy možné selektovat každou podjednotku zvlášť. Z Obr. 35A vytvořeného na základě FACS analýzy je patrné, že nenastal žádný posun intenzity fluorescence CFP oproti negativní kontrole, kterou představují buňky CHO. Podjednotka integrinu CD11b nesoucí fluorescenční protein CFP tudíž nebyla exprimována. Lepších výsledků bylo dosaženo s podjednotkou integrinu CD18, jenž má na svém C-konci navázaný YFP. U vzorků znázorněných na Obr. 35B došlo k posunu intenzity fluorescence YFP, což dokazuje, že se tato podjednotka integrinu exprimuje, i když u některých vzorků ve větší míře než u jiných vzorků.

Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i při opakování experimentu s odlišnými poměry DNA a transfekčního činidla. Výrazně lépe dopadla pouze exprese CD18-YFP u vzorku s poměrem DNA použité k transfekci α_M CFP/ β_2 YFP 1:1, ke kterému bylo přidáno 9 µl Lipofectaminu, jak je patrné z Obr. 36B. Buňky CHO po třech týdnech selekce opět vykazovaly pouze nepatrnou expresi podjednotky CD11b-CFP blížící se nule (Obr. 36A).



Obr. 35: FACS analýza exprese jednotlivých podjednotek integrinu u buněk CHO transfekovaných α_M CFP ku β_2 YFP v různých poměrech DNA po 3 týdnech selekce. Histogramy A a B reprezentují závislost intenzity fluorescence CFP, respektive YFP na počtu buněk. Popis obrázku vyznačuje poměr DNA α_M CFP/ β_2 YFP při transfekci, druhé číslo znamená množství přidaného Lipofectaminu. Jako negativní kontrola byly použity CHO buňky.

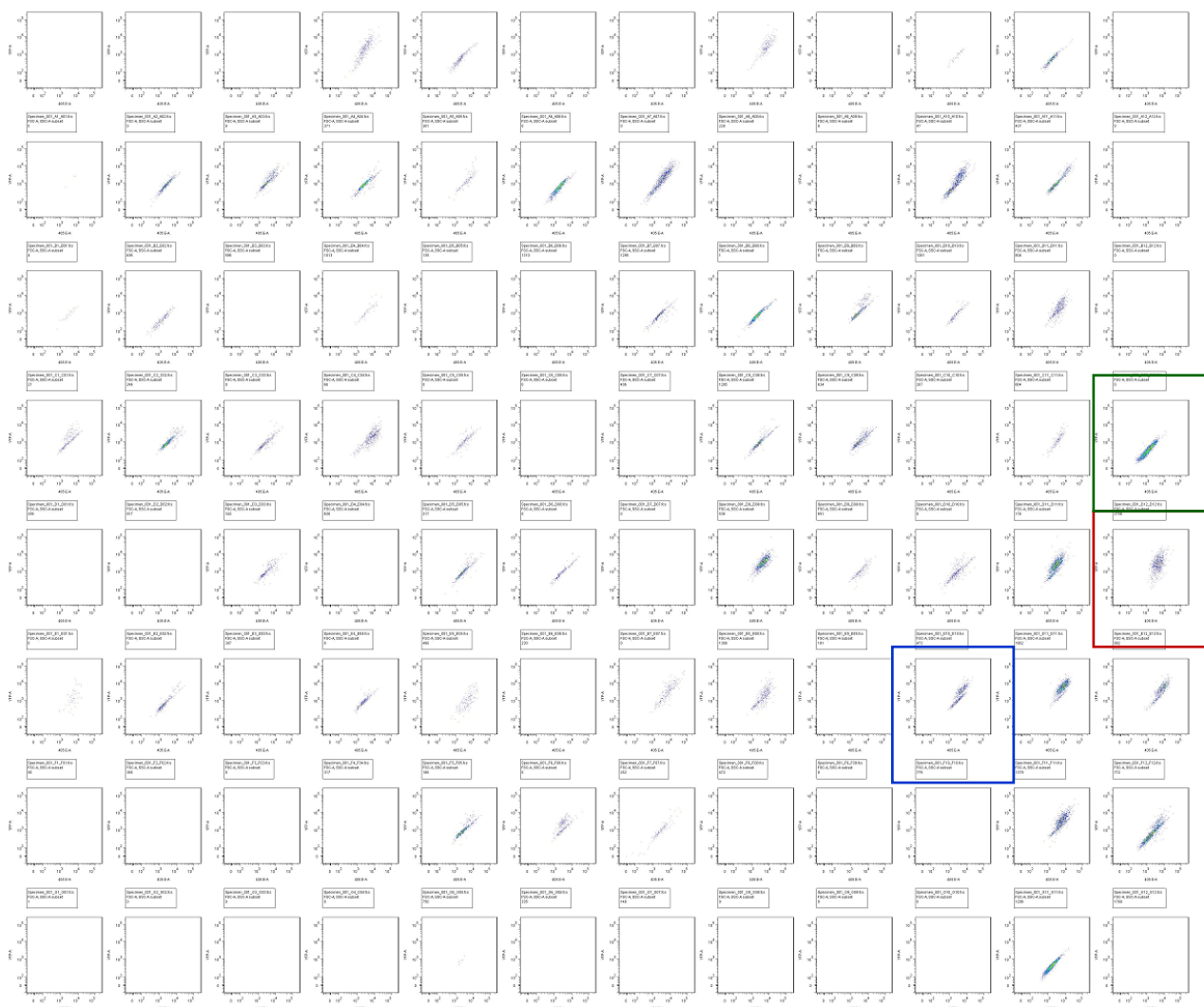


Obr. 36: FACS analýza exprese jednotlivých podjednotek integrinu u buněk CHO transfekovaných α_M CFP/ β_2 YFP v různých poměrech DNA po 3 týdnech selekce. Histogramy A a B reprezentují závislost intenzity fluorescence CFP, respektive YFP na počtu buněk. Popis obrázku vyznačuje poměr DNA α_M CFP ku β_2 YFP při transfekci, druhé číslo znamená množství přidaného Lipofectaminu.

5.8.1 Třídění jednotlivých buněk („Single cell sorting“)

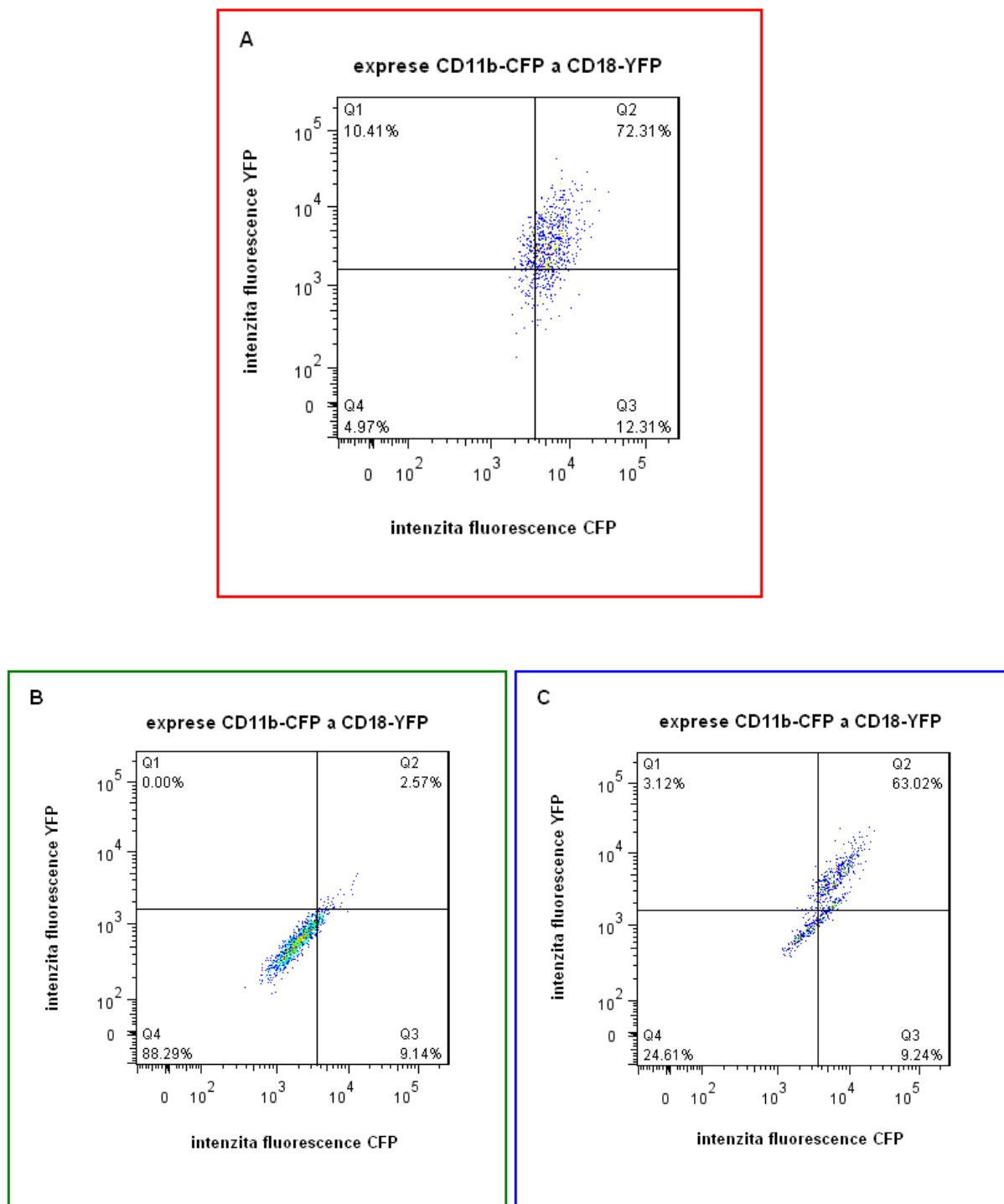
Po selekci pomocí antibiotika G418 jsem se proto rozhodla udělat „single cell sorting“, což je třídění jednotlivých buněk podle vybraných parametrů. Do Petriho misky k buňkám CHO transfekovaným plazmidem integrinu α_M _CFP/ β_2 _YFP byla přidána EDTA. Jedná se o chelatační činidlo, které na sebe váže dvojmocné kationty (např. Ca^{2+} , Mg^{2+}), a způsobí tak uvolnění buněk od povrchu, ke kterému adherují. Buňky byly následně odstředovány a po odstranění supernatantu byl sediment buněk resuspendován v růstovém médiu F12. Na fluorescenčním průtokovém cytometru s buněčným sortem BD FACS Vantage SE byly k separování buněk použity 2 lasery. Jeden s excitační vlnovou délkou 405 nm pro detekci CFP, druhý laser s excitační vlnovou délkou 488 nm pro detekci YFP. Buňky nesoucí obě podjednotky integrinu CD11b/CD18 (α_M _CFP/ β_2 _YFP) byly po jedné separovány do samostatných jamek 96 jamkové destičky. Po vyřídění byly buňky 18 dní kultivovány v inkubátoru při 37 °C a poté byla zopakována FACS analýza (Obr. 37) pro ověření exprese jednotlivých podjednotek integrinu.

Na základě výsledků FACS analýzy byl vybrán jeden buněčný klon, jehož charakteristiky exprese obou podjednotek integrinu jsou znázorněny na Obr. 37 (ohraničený červeným rámečkem) a pak podrobněji na zvětšeném Obr. 38A, ve kterém 72 % buněk (kvadrant Q2) vykazovalo expresi obou podjednotek integrinu, určenou na základě posunu intenzity fluorescence CFP, respektive YFP. Zároveň byla v této jamce pouze jedna populace buněk, zatímco v ostatních jamkách byly většinou rozeznatelné dvě populace. Jako příklad byl zvolen klon buněk na Obr. 37 (ohraničený modrým rámečkem) a pak podrobněji na zvětšeném Obr. 38C. Pro srovnání byl vybrán ještě jeden klon buněk (Obr. 37, ohraničený zeleným rámečkem a pak podrobněji na zvětšeném Obr. 38B), kde jsou buňky, které prakticky neexprimují integrin CD11b/CD18, protože se většina buněk vyskytuje v kvadrantu Q4, ve kterém prakticky nedošlo k posunu intenzity fluorescence CFP ani YFP oproti netransfekovaným buňkám. Respektive tyto buněčné klony ztratily expresi integrinu během osmnáctidenní inkubace. V některých jamkách se pak buňky nevyskytovaly vůbec.



Obr. 37: FACS analýza vyselektovaných buněk CHO ověřující expresi CD11b-CFP a CD18-YFP.

Jednotlivé bodové grafy reprezentují závislost intenzity fluorescence CFP na intenzitě fluorescence YFP. K analýze byly vybrány pouze živé buňky. Červený rámeček ohraničuje vybraný buněčný klon s nejlepší expresí obou podjednotek CD11b-CFP/CD18-YFP, zelený rámeček ohraničuje vybraný buněčný klon s nízkou expresí obou podjednotek CD11b-CFP/CD18-YFP, modrý rámeček ohraničuje vybraný buněčný klon se dvěma populacemi buněk.



Obr. 38: Charakterizace exprese obou podjednotek integrinu na vybraných kloněch vyselektovaných buněk CHO. Jednotlivé bodové grafy reprezentují závislost intenzity fluorescence CFP na intenzitě fluorescence YFP. A) klon s nejlepší expresí α_M -CFP a β_2 -YFP, B) klon s nízkou expresí α_M -CFP a β_2 -YFP, C) klon se dvěma populacemi buněk.

6 Diskuze

Aby bylo možné mikroskopicky analyzovat endocytózu CyaA na živých fagocytech, bylo nutné obejít cAMP signalizační aktivitu toxinu, která vede k buněčné smrti fagocytů. Proto byl připraven fluorescenčně značený CyaA-AC⁻ toxoid (Basler *et al.*, 2006), který nemá enzymatickou, adenylátcyklázovou aktivitu, ale je schopný tvořit póry v plazmatické membráně a během translokace jeho AC domény do cytosolu cílové buňky dochází ke vtoku Ca²⁺. Endocytóza CyaA-AC⁻ byla při mikroskopické analýze srovnávána s dvojitě mutovaným CyaA-E570K+E581P-AC⁺ (dále označován CyaA-KP-AC⁺), který není schopný vyvolat vtok Ca²⁺. Tato varianta toxinu má AC aktivitu, ale schopnost translokace AC domény do cytosolu buněk se pohybuje v rozmezí pouze 1-2 % oproti divokému typu CyaA. Přesto v buňkách dochází k signifikantnímu zvýšení cAMP, které může ovlivnit endocytózu. Již dříve bylo totiž v naší laboratoři ukázáno, že CyaA blokuje proces makropinocytózy v buňkách myší makrofágové linie J774A.1, a to mechanismem závislým na tvorbě cAMP (Kamanova *et al.*, 2008). Zároveň bylo ukázáno, že v makrofázích transfekovaných vektorem kódujícím konstitutivně aktivní mutantu proteinu Rap1 (Rap1A G12V) dochází ke snížení makropinocytózy. Tato mutantní varianta napodobuje aktivaci proteinu Rap1 proteinem Epac (protein aktivovaný vazbou cAMP, z angl. „exchange protein activated by cAMP“) a tedy do jisté míry napodobuje i efekt zvýšení hladiny cAMP v cytosolu makrofágů po jejich vystavení CyaA. Adenylátcyklázový toxin, který není schopen přeměny ATP na cAMP (CyaA-AC⁻), tudíž nezpůsobuje inhibici makropinocytózy v myší makrofágové linii RAW 264.7 (Černý O., osobní sdělení). Proto byla k mikroskopické analýze následně připravena mutantní varianta toxinu CyaA-E570K+E581P-AC⁻ (dále označován CyaA-KP-AC⁻), která, stejně jako mutantní varianta CyaA-KP-AC⁺, postrádá schopnost podpořit vtok vápenatých iontů, ale navíc zcela postrádá enzymatickou aktivitu. Výsledky způsobu endocytózy získané při mikroskopické analýze těchto dvou toxoidů (CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻) se však nelišily. Z mých pozorování lze vyvodit, že zvýšené množství cAMP, které vzniká při použití toxoidu CyaA-KP-AC⁺, neovlivňuje endocytický vzorec toxoidu s mutací E570K+E581P.

Mikroskopická analýza endocytózy fluorescenčně značených toxoidů CyaA-AC⁻ a CyaA-KP prokázala, že každá mutantní varianta toxinu vstupuje do buněk odlišným mechanismem. K charakterizaci obou rozdílných endocytických drah byla zkoumána kolokalizace toxoidů s transferinem, coby markerem klatrin-dependentní endocytózy

(Mousavi *et al.*, 2004). Toxoid CyaA-AC⁻, který je schopný vyvolat vtok Ca²⁺, byl velmi pravděpodobně přepravován časnými a/nebo recyklačními endozomy obsahujícími transferin, protože u něj byla pozorována zřetelná kolokalizace s transferinem. Naopak CyaA-KP-AC⁺ i CyaA-KP-AC⁻ mutantní toxoidy, jež nejsou schopné vyvolat vtok Ca²⁺, byly odstraněny z buněčné membrány mechanismem nezávislým na klatrinu. Nebyla u nich totiž pozorována žádná, nebo jen velmi slabá kolokalizace s transferinem. Z toho vyplývá, že toxoid CyaA-AC⁻ byl endocytován klatrin-dependentní dráhou, kdežto CyaA-KP toxoidy, které mají oslabenou pór-formující doménu, byly odstraněny z buněčného povrchu jiným mechanismem, pravděpodobně makropinocytózou.

Jedním z vytyčených cílů bylo stanovit, jestli závisí endocytóza CyaA-KP a CyaA-AC⁻ na aktivaci integrinu. Tímto se mi podařilo potvrdit, že pokud byl integrin aktivován pomocí vápenatých iontů, jejichž vstup do buněk umožňuje pouze mutantní varianta CyaA-AC⁻, nebo pokud byl integrin aktivován díky použitím PMA, tak byl toxoid endocytován jiným způsobem, než když integrin aktivovaný nebyl. Aktivní forma receptoru vstupovala do buněk pomocí dráhy závislé na klatrinu, zatímco neaktivní forma CD11b/CD18 byla endocytována jinou dráhou.

Tyto výsledky byly získány při experimentech na primárních buňkách myších makrofágů diferencovaných z kostní dřeně (BMDC) a následně ověřeny na lidské myeloidní linii buněk K562. Výsledky získané na myších BMDC byly více signifikantní než na buňkách K562. Příčinou může být to, že u buněk K562 se jedná o mutovanou linii, jejíž signalizační procesy se mohou lišit v porovnání s primárními buňkami.

Shrnu-li, podařilo se tedy potvrdit, že schopnost mobilizovat extracelulární Ca²⁺ ionty do buněk hraje zásadní roli při ovlivnění způsobu, jakým bude toxoid CyaA endocytován. Moje pozorování je v souladu s nedávno publikovanými závěry (Fiser *et al.*, 2012), že schopnost CyaA podpořit vstup vápníku do buněk chrání toxin před rychlým odstraněním z buněčné membrány myší makrofágové linie buněk J774A.1 a prodlužuje tak časový interval, po který mohou CyaA póry permeabilizovat fagocyty.

Tato pozorování jsou navíc v souladu s doposud nepublikovanými výsledky (O. Černý, osobní sdělení), protože pokud došlo za pomoci PMA k aktivaci proteinu Rap1 a následné aktivaci integrinu CD11b/CD18, byl protein směřovaný do klatrin dependentní dráhy, zatímco když nedošlo k aktivaci integrinu a tudíž ani k aktivaci Rap1, byla upřednostněna makropinocytóza.

Výsledky získané s enzymaticky inaktivními, ale pór formujícími CyaA-AC⁻ toxoidy se zdají být vysoce relevantní i pro porozumění působení enzymaticky aktivního CyaA.

K ověření exprese integrinového receptoru CD11b/CD18 na transfekovaných buňkách byla používána průtoková cytometrie. Výsledky FACS analýzy byly obzvláště důležité při optimalizaci podmínek tranzientní transfekce buněk K562. Z výsledků FACS analýzy (5.5.2) lze uzavřít, že nejlepší podmínky transfekce buněk K562 integrinovým receptorem CD11b/CD18 jsou následující: nejlepší poměr DNA je 2 ku 1 CD11b ku CD18 a z transfekčních činidel je lepší Lipofectamine 2000, v množství 9 μ l Lipofectaminu na 2 μ g DNA (viz Obr. 26 a 27). Tranzientně transfekované buňky K562-CD11b/CD18 byly následně použity k mikroskopické analýze, jak je popsáno výše v diskuzi.

Posledním cílem bylo zjistit, jestli je CyaA schopný aktivovat integrinový receptor pomocí vtoku extracelulárních Ca²⁺ iontů. To se mi podařilo nepřímo potvrdit pomocí mikroskopické analýzy, jak je diskutováno výše. Pro studium molekulárního mechanismu aktivace integrinu jsem zvolila metodu FRET (5.8). Nejprve bylo nutné připravit a otestovat buněčný systém, na kterém by bylo možné tento pokus uskutečnit. Pomocí metody „single cell sorting“, což je třídění jednotlivých buněk podle vybraných parametrů, se mi podařilo vytvořit stabilní linii buněk CHO exprimující obě podjednotky integrinu CD11b/CD18 s navázanými fluorescenčními proteiny (α_M -CFP/ β_2 -YFP). Tyto buňky bude možné použít k výše popsané FRET analýze.

7 Závěr

- Zjistila jsem, že toxoid CyaA-AC⁻, jenž umožňuje vtok Ca²⁺, vstupuje do buněk dráhou závislou na klatrinu, zatímco toxoid CyaA-KP-AC⁻, který nemá adenylátcyklázovou aktivitu a není schopný podpořit vtok Ca²⁺, vstupuje do buněk pomocí jiné dráhy, která je na klatrinu nezávislá (pravděpodobně makropinocytózou).
- Preinkubace buněk s PMA, vedoucí k aktivaci komplementového receptoru CD11b/CD18, mění endocytickou dráhu CyaA-KP-AC⁺ a CyaA-KP-AC⁻ na dráhu závislou na klatrinu.
- Zvýšená hladina cAMP neovlivňuje způsob endocytózy receptoru.
- Tyto výsledky potvrzují, že zásadní pro volbu způsobu endocytózy zůstává schopnost vyvolat vtok vápenatých iontů. Existuje totiž korelace mezi vstupem vápenatých iontů do buněk a aktivací receptoru CD11b/CD18. Aktivní forma receptoru vstupuje do buněk pomocí dráhy závislé na klatrinu, zatímco neaktivní forma CD11b/CD18 je endocytována jinou drahou.

8 Použitá literatura

- Agramonte-Hevia, J., Gonzalez-Arenas, A., Barrera, D. and Velasco-Velazquez, M. (2002). Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **34**, 255-266.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2007) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing.
- Alpuchearanda, C.M., Racoosin, E.L., Swanson, J.A. and Miller, S.I. (1994). Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. *Journal of Experimental Medicine* **179**, 601-608.
- Anderson, E.L. (1989) Prevention of pertussis. *Semin Respir Infect* **4**, 284-92.
- Anthis, N.J. and Campbell, I.D. (2011). The tail of integrin activation. *Trends in Biochemical Sciences* **36**, 191-198.
- Arnaout, M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11 CD18. *Blood* **75**, 1037-1050.
- Asada, M., Furukawa, K., Kantor, C., Gahmberg, C.G. and Kobata, A. (1991). Structural study of the sugar chains of human-leukocyte cell-adhesion molecule-CD11 molecule-CD18. *Biochemistry* **30**, 1561-1571.
- Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research* **339**, 269-280.
- 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 2nd gene, CyaC, for activation. *Journal of Bacteriology* **173**, 720-726.
- Basar, T., Havlicek, V., Bezouskova, S., Halada, P., Hackett, M. and Sebo, 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. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 10777-10783.
- Basler, M., Knapp, O., Masin, J., Fiser, R., Maier, E., Benz, R., *et al.* (2007). Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 12419-12429.
- Basler, M., Masin, H., Osicka, R. and Sebo, P. (2006). Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes. *Infection and Immunity* **74**, 2207-2214.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schundler, J., Souček, A. and Vávra, J. (1996) *Lékařská mikrobiologie Marvil*, Praha.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A. (1990). Deletions affecting hemolytic and toxin activities of *Bordetella-pertussis* adenylate cyclase. *Infection and Immunity* **58**, 3242-3247.
- Benmerah, A. and Lamaze, C. (2007). Clathrin-coated pits: vive la difference? *Traffic* **8**, 970-982.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and 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*. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 27231-27239.
- Berton, G. and Lowell, C.A. (1999). Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cellular Signalling* **11**, 621-635.

- Betsou, F., Sebo, 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. *Infection and Immunity* **61**, 3583-3589.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R. and Sebo, P. (2010). *Bordetella* Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its beta(2) Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps. *Plos Pathogens* **6**.
- Confer, D.L. and Eaton, J.W. (1982). Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate-cyclase. *Science* **217**, 948-950.
- Coote, J.G. (1992). Structural and functional-relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **88**, 137-162.
- Critchley, D.R. (2009) Biochemical and Structural Properties of the Integrin-Associated Cytoskeletal Protein Talin. In *Annual Review of Biophysics*. pp. 235-254.
- Diamond, M.S., Garciaaguilar, J., Bickford, J.K., Corbi, A.L. and Springer, T.A. (1993). The I-domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for 4 distinct adhesion ligands. *Journal of Cell Biology* **120**, 1031-1043.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of Endocytosis. In *Annual Review of Biochemistry*. pp. 857-902.
- Eby, J.C., Ciesla, W.P., Hamman, W., Donato, G.M., Pickles, R.J., Hewlett, E.L. and Lencer, W.I. (2010). Selective Translocation of the *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin across the Basolateral Membranes of Polarized Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10662-10670.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E. and Meldolesi, J. (2006). Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *Journal of Cell Science* **119**, 4758-4769.
- Fiser, R., Masin, J., Basler, M., Krusek, J., Spulakova, V., Konopasek, I. and Sebo, P. (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. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 2808-2820.
- Fiser, R., Masin, J., Bumba, L., Pospisilova, E. and Fayolle, C. (2012). Calcium Influx Rescues Adenylate Cyclase-Hemolysin from Rapid Cell Membrane Removal and Enables Phagocyte Permeabilization by Toxin Pores. *PLoS Pathogens*.
- Franco, S.J. and Huttenlocher, A. (2005). Regulating cell migration: calpains make the cut. *Journal of Cell Science* **118**, 3829-3838.
- Galbiati, F., Volonte, D., Meani, D., Milligan, G., Lublin, D.M., Lisanti, M.P. and Parenti, M. (1999). The dually acylated NH₂-terminal domain of G(i1 alpha) is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains - Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated G-protein alpha subunits in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 5843-5850.
- Garcia-Perez, B.E., Hernandez-Gonzalez, J.C., Garcia-Nieto, S. and Luna-Herrera, J. (2008). Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microbial Pathogenesis* **45**, 1-6.
- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A. and Danchin, A. (1988a). The calmodulin-sensitive adenylate-cyclase of *Bordetella-pertussis* - cloning and expression in *Escherichia-coli*. *Molecular Microbiology* **2**, 19-30.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A. and Danchin, A. (1988b). Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate-cyclase hemolysin bifunctional protein of *Bordetella-pertussis*. *Embo Journal* **7**, 3997-4004.

- Gordon, V.M., Leppla, S.H. and Hewlett, E.L. (1988). Inhibitors of receptor-mediated endocytosis block the entry of *Bacillus-anthraxis* adenylate-cyclase toxin but not that of *Bordetella-pertussis* adenylate-cyclase toxin. *Infection and Immunity* **56**, 1066-1069.
- Gordon, V.M., Young, W.W., 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. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 14792-14796.
- Grant, B.D. and Donaldson, J.G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 597-608.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L. and Hewlett, E. (1998). Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin. *Journal of Biological Chemistry* **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*. *Molecular Microbiology* **53**, 1709-1719.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., *et al.* (2001). The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18). *Journal of Experimental Medicine* **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. *Journal of Immunology* **162**, 1910-1916.
- Guo, Q., Shen, Y.Q., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J. (2005). Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. *Embo Journal* **24**, 3190-3201.
- Hanski, E. (1989). Invasive adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 459-463.
- Harris, E.S., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. and Zimmerman, G.A. (2000). The leukocyte integrins. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23409-23412.
- Hořejší, V. and Bartůňková, J. (2009) *Základy imunologie* Nakladatelství TRITON, Praha.
- Humphries, M.J., McEwan, P.A., Barton, S.J., Buckley, P.A., Bella, J. and Mould, A.P. (2003). Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends in Biochemical Sciences* **28**, 313-320.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-687.
- Jacobson, K. and Dietrich, C. (1999). Looking at lipid rafts? *Trends in Cell Biology* **9**, 87-91.
- Jin, M., Andricioaei, L. and Springer, T.A. (2004). Conversion between three conformational states of integrin I domains with a C-terminal pull spring studied with molecular dynamics. *Structure* **12**, 2137-2147.
- Kamanova, J., Kofronova, O., Masin, J., Genth, H., Vojtova, J., Linhartova, I., *et al.* (2008). Adenylate cyclase toxin subverts phagocyte function by RhoA inhibition and unproductive ruffling. *Journal of Immunology* **181**, 5587-5597.
- Ladant, D., Glaser, P. and Ullmann, A. (1992). Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 2244-2250.
- Ladant, D. and Ullmann, A. (1999). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology* **7**, 172-176.
- Lakowicz, J.R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy* New York: Springer Science + Business Media, LLC.

- Laoide, B.M. and Ullmann, A. (1990). Virulence dependent and independent regulation of the *Bordetella-pertussis* cya operon. *Embo Journal* **9**, 999-1005.
- Lee, H.S., Lim, C.J., Puzon-McLaughlin, W., Shattil, S.J. and Ginsberg, M.H. (2009). RIAM Activates Integrins by Linking Talin to Ras GTPase Membrane-targeting Sequences. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 5119-5127.
- Lefort, C.T., Hyun, Y.M., Schultz, J.B., Law, F.Y., Waugh, R.E., Knauf, P.A. and Kim, M. (2009). Outside-In Signal Transmission by Conformational Changes in Integrin Mac-1. *Journal of Immunology* **183**, 6460-6468.
- Legate, K.R., Wickstrom, S.A. and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & Development* **23**, 397-418.
- Lisanti, M.P., Scherer, P.E., Vidugiriene, J., Tang, Z.L., Hermanowskivosatka, A., Tu, Y.H., et al. (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *Journal of Cell Biology* **126**, 111-126.
- Locht, C. (2001). *Bordetella pertussis* virulence factors. *Medecine Et Maladies Infectieuses* **31**, 20S-28S.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L.J., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**, 77-92.
- Mazzone, A. and Ricevuti, G. (1995). Leukocyte CD11/CD18 integrins - Biological and clinical relevance. *Haematologica* **80**, 161-175.
- McMahon, H.T. and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 517-533.
- Mercer, J. and Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-535.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J. and Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize beta(2) integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 5355-5360.
- Mould, A.P., Barton, S.J., Askari, J.A., McEwan, P.A., Buckley, P.A., Craig, S.E. and Humphries, M.J. (2003). Conformational changes in the integrin beta A domain provide a mechanism for signal transduction via hybrid domain movement. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 17028-17035.
- Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T. and Kjekens, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochemical Journal* **377**, 1-16.
- Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guernonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C. and Sebo, P. (2000). Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: Delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infection and Immunity* **68**, 247-256.
- Osickova, A., Masin, J., Fayolle, C., Krusek, J., Basler, M., Pospisilova, E., et al. (2010). Adenylate cyclase toxin translocates across target cell membrane without forming a pore. *Molecular Microbiology* **75**, 1550-1562.
- Osickova, A., Osicka, R., Maier, E., Benz, R. and 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. *Journal of Biological Chemistry* **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. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 9695-9697.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., *et al.* (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* **35**, 32-40.
- Parton, R.G. and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 185-194.
- Pollard, T.D. and Earnshaw, W.C. (2008) Cell biology Saunders Elsevier.
- Porter, J.F., Connor, K. and Donachie, W. (1994). Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology-Sgm* **140**, 255-261.
- Preston, A., Parkhill, J. and Maskell, D.J. (2004). The Bordetellae: Lessons from genomics. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 379-390.
- Rappoport, J.Z. (2008). Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochemical Journal* **412**, 415-423.
- Razani, B., Woodman, S.E. and Lisanti, M.P. (2002). Caveolae: From cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews* **54**, 431-467.
- Rogel, A. and 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. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 22599-22605.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D. (1995). Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26370-26376.
- Ross, G.D. and Vetvicka, V. (1993). CR3 (CD11b, CD18) - a phagocyte and NK cell-membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clinical and Experimental Immunology* **92**, 181-184.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G.W. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**, 673-682.
- Sakamoto, H., Bellalou, J., Sebo, P. and Ladant, D. (1992). *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin. Structural and functional independence of the catalytic and hemolytic activities. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 13598-13602.
- Sastre, L., Kishimoto, T.K., Gee, C., Roberts, T. and Springer, T.A. (1986). The mouse leukocyte adhesion proteins Mac-1 and Lfa-1 - studies on messenger-RNA translation and protein glycosylation with emphasis on Mac-1. *Journal of Immunology* **137**, 1060-1065.
- Sebo, P. and Ladant, D. (1993). Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli* alpha-haemolysin translocator. *Molecular Microbiology* **9**, 999-1009.
- Shattil, S.J., Kim, C. and Ginsberg, M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 288-300.
- Swanson, J.A. and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology* **5**, 424-428.
- Vojtova, J., Kofronova, O., Sebo, 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. *Microscopy Research and Technique* **69**, 119-129.

- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., *et al.* (2009). Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin. *Faseb Journal* **23**, 2831-2843.
- von Wintzingerode, F., Schattke, A., Siddiqui, R.A., Rosick, U., Gobel, U.B. and Gross, R. (2001). Bordetella petrii sp nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and amended description of the genus Bordetella. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 1257-1265.
- Weiss, A.A. and Hewlett, E.L. (1986). Virulence factors of Bordetella pertussis. *Annual Review of Microbiology* **40**, 661-686.
- Welch, R.A. (1995) Phylogenetic analyses of the RTX toxin family, pp. 195-206.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R. and Berkowitz, S.A. (1980). Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**, 3841-3844.
- Yakubenko, V.P., Lishko, V.K., Lam, S.C.T. and Ugarova, T.P. (2002). A molecular basis for integrin alpha(M)beta(2) ligand binding promiscuity. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 48635-48642.
- Yalamanchili, P., Lu, C.F., Oxvig, C. and Springer, T.A. (2000). Folding and function of I domain-deleted Mac-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 21877-21882.
- Zaretzky, 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. *Molecular Microbiology* **45**, 1589-1598.
- Zhang, L. (1999). The alpha(M)beta(2) integrin and its role in neutrophil function. *Cell Research* **9**, 171-178.