

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

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**Přírodovědecká fakulta**  
Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Lucia Motlová

**Adenylát-cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, jeho  
konformace a iontová rovnováha v hostitelské buňce**

**Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*, its conformation  
and ion balance in host cell.**

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

Praha 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.8.2011

Podpis

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Ivovi Konopáskovi, CSc za cenné rady, pomoc při vypracovávání diplomové práce a především trpělivost a ochotu vždy si na mě udělat čas.

Srdečně také děkuji RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za jeho neocenitelnou odbornou pomoc při experimentech a mnoho inspirace při tvorbě diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů Peteru Šebovi, Ph.D. za to, že jsem měla možnost pracovat v jeho laboratoři.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za odbornou pomoc Mgr. Evě Pospíšilové, Ladislavu Bumbovi, Ph.D., Jiřímu Mašínovi, Ph.D., RNDr. Janu Krůškovi, CSc. a Mgr. Alešovi Bendovi, Ph.D.

Mé poděkování patří také celému kolektivu laboratoře fyziologie bakterií a to především RNDr. Janě Beranové, Ph.D., Mgr. Petře Liškové, Lucii Jánské a RNDr. Gabriele Seydlové, Ph.D. za celkovou podporu a utvoření těch nejlepších možných podmínek pro studium po lidské stránce.

Na závěr bych chtěla poděkovat celé své rodině, za podporu při studiu a nekonečnou trpělivost.

Tato diplomová práce vznikla v letech 2009-2011 v rámci grantů: MŠMT Výzkumný záměr MSM0021620858 Signaling and cellular response mechanisms GAAV Výzkumný záměr Molekulární mechanismus průniku adenylát-cyklázového toxinu do fagocytů.

## ABSTRAKT

Adenylát-cyklázový (CyaA, ACT) toxin je jedním z hlavních virulenčních faktorů bakterie *Bordetella pertussis*. Ačkoli se CyaA váže na mnoho typů membrán, předpokládá se, že jeho receptorem je integrin CD11b/CD18, který je exprimován na povrchu myeloidních buněk. CyaA patří do rodiny RTX toxinů-hemolyzinů. CyaA působí na hostitelské buňky dvěma na sobě nezávislými aktivitami. Jednou z nich je přeměna ATP na cyklické AMP, kterou zajišťuje adenylát-cyklázová (AC) doména po translokaci do cytozolu hostitelské buňky, při které dochází ke vstupu vápenatých kationtů do hostitelské buňky. Translokace je pravděpodobně iniciována interakcí monomeru CyaA s cílovou membránou. Druhá aktivita CyaA je tvorba kanálu, selektivního pro kationty, který může způsobit koloidně osmotickou lyzi cílových buněk. Kanálo-tvorná aktivita je zajišťována RTX hemolyzinovou doménou a předpokládá se u ní oligomerizace, i když bylo zjištěno, že únik draselných kationtů z hostitelské buňky způsobuje CyaA ve formě monomeru. Také není jasné, zda by k oligomerizaci CyaA docházelo v roztoku, nebo až po interakci s hostitelskou membránou.

Cílem této práce bylo zkoumat tok sodných iontů na membráně myších makrofágů J774A.1, které na svém povrchu exprimují CD11b/CD18 integrin. Pro dosažení tohoto cíle byly použity fluorescenční metody. Konkrétně se jednalo o sledování změny koncentrace sodných kationtů v cytozolu buněk J774A.1 obarvených sondou SBFI/AM pomocí emisního poměrového měření nebo sondou Sodium Green pomocí sledování změny doby dohasínání v časovém rozlišení.

Dalším cílem práce bylo zkoumání oligomerizace CyaA na různých membránových systémech, mimo jiné i na membránách makrofágů s CD11b/CD18 integrinem. Zde jsme využili fluorescenční metodu měření FRET v časovém rozlišení.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** adenylát-cyklázový toxin, *Bordetella pertussis*, fluorescenční rezonanční přenos energie, lipozom, oligomerizace CyaA, transport sodných kationtů

## **ABSTRACT**

Adenylate cyclase (CyaA, ACT) toxin is one of the major virulence factors of *Bordetella pertussis*. Although CyaA binds to many types of membranes, it is assumed that the integrin CD11b/CD18 is its receptor which is expressed on the surface of myeloid cells. CyaA belongs to the family of RTX toxin-hemolysins. CyaA acts on the host cells by two independent activities. One of them is the conversion of ATP to cyclic AMP, which is catalyzed by adenylate cyclase (AC) domain after its translocation into the cytosol of the host cell, which leads to the entry of calcium cations into the host cell. Translocation is probably initiated by interaction of CyaA monomer with the target membrane. The second activity is the formation of CyaA channel selective for cations, which probably causes colloid osmotic lysis of target cells. The channel forming activity is provided by RTX hemolysin domain which most probably forms oligomers, although it was found that CyaA as a monomer causes leakage of potassium cations from the host cell. It is also not clear whether the oligomerization of CyaA would occur in solution, or after interaction with the host membrane.

The aim of this study was to examine the flow of sodium ions on the membrane of murine macrophages J774A.1, which express integrin CD11b/CD18 on their surface. Fluorescence methods have been used to achieve this goal. Specifically, changes in concentration of sodium cations were monitored in the cytosol of J774A.1 cells labeled with probe SBFI/AM using emission ratiometric measurement or with probe Sodium Green by time resolved observation of lifetime changes.

Another goal of this work was to study CyaA oligomerization on different membrane systems, including the membranes of macrophages with CD11b/CD18 integrins. For this purpose we used the fluorescence method of measuring FRET in time resolution.

**KEY WORDS:** adenylate cyclase toxin, *Bordetella pertussis*, fluorescence resonance energy transfer, liposome, oligomerization CyaA, sodium influx

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	9
1. ÚVOD .....	11
2. PŘEHLED LITERATURY .....	13
2.1. <i>Bordetella pertussis</i> .....	13
2.2. Adenylát-cyklázový toxin CyaA.....	15
2.2.1. Struktura CyaA .....	15
2.2.2. Funkce CyaA.....	17
2.3. Tok iontů na membráně hostitelských buněk ovlivněných CyaA .....	18
2.3.1. Vstup vápenatých kationtů do buněk způsobený CyaA a jeho důsledky.....	19
2.3.2. Únik draselných kationtů z buněk způsobený CyaA a důsledky tohoto děje .....	20
2.4. Oligomerizace CyaA při tvorbě kationt-selektivního kanálu.....	21
2.4.1. Oligomerizace RTX hemolyzinů .....	21
2.4.1.1. Interakce RTX hemolyzinů s membránou .....	23
2.4.2. Oligomerizace CyaA.....	23
2.4.2.1. Interakce CyaA s membránou .....	24
2.5. Repetitivní část molekuly CyaA .....	25
3. MATERIÁL A METODY .....	27
3.1. Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení .....	27
3.1.1. Seznam použitých chemikálií .....	27
3.1.2. Přístrojové vybavení.....	28
3.1.3. Roztoky a pufry.....	29
3.1.4. Kultivační média .....	33
3.1.4.1. Tekutá kultivační média pro bakteriální kultury.....	33
3.1.4.2. Tuhá kultivační média pro bakteriální kultury.....	34
3.1.4.3. Kultivační média pro tkáňové linie .....	35
3.1.5. Použité tkáňové linie .....	35
3.1.6. Bakteriální kmeny .....	35
3.1.7. CyaA a jeho použité deriváty.....	36
3.2. Metody a pracovní postupy .....	36
3.2.1. Produkce a purifikace CyaA a jeho derivátů .....	36
3.2.1.1. Uchovávání bakteriálních kmenů.....	36
3.2.1.2. Příprava superkompetentních buněk <i>Escherichia coli</i> .....	36
3.2.1.3. Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk.....	37
3.2.1.4. Produkce toxinu v 500ml kulturách .....	37
3.2.1.5. Příprava močovinového extraktu CyaA a jeho derivátů .....	38
3.2.1.6. Purifikace proteinu ionexová chromatografií na DEAE-Sepharose .....	38
3.2.1.7. Purifikace proteinu hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose.....	39
3.2.1.8. Příprava extraktu C-konce CyaA .....	39
3.2.1.9. Purifikace C-konce CyaA afinitní chromatografií na Glutathion-Agarose.....	39
3.2.1.10. Odstranění Glutathionu dialýzou .....	40
3.2.1.11. Purifikace C-konce CyaA afinitní chromatografií na Ni-Sepharose.....	40
3.2.2. Stanovení vlastností a množství proteinu CyaA a jeho derivátů.....	41
3.2.2.1. SDS-polyakrylamid elektroforéza.....	41
3.2.2.2. Stanovení koncentrace proteinů .....	41
3.2.2.3. Příprava suspenze erytrocytů .....	41
3.2.2.4. Stanovení hemolytické aktivity proteinu .....	42
3.2.3. Charakteristika fluorescenční sondy SBFI/AM .....	42
3.2.4. Charakteristika fluorescenční sondy Sodium Green.....	45
3.2.5. Měření vstupu sodných kationů do buňky .....	47

3.2.5.1. Příprava a barvení SBFI/AM buněk pro měření .....	47
3.2.5.2. Měření emisního spektra buněk obarvených SBFI/AM .....	47
3.2.5.3. Měření poměru emisních vlnových délek buněk obarvených SBFI/AM .....	47
3.2.5.4. Příprava a barvení Sodium Green/TA buněk pro měření.....	48
3.2.5.5. Měření doby dohasínání sondy Sodium Green .....	48
3.2.6. Ověření vstupu sondy SBFI-AM do makrofágů J774.1 na fluorescenčním mikroskopu Cell <sup>R</sup> .....	49
3.2.7. Ověření vstupu sondy Sodium Green do buňky na konfokálním mikroskopu Leica.....	50
3.2.8. Ověřování oligomerizace CyaA pomocí FRET měřeného v časovém rozlišení.....	50
3.2.8.1. Fluorescenční rezonanční energetický přenos .....	50
3.2.8.2. Charakterizace sond Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 594.....	51
3.2.8.3. Barvení sondou Alexa Fluor .....	53
3.2.8.4. Měření oligomerizace pomocí FRET v časové rozlišení .....	53
3.2.8.5. Příprava lipozomů .....	55
3.2.8.6. Hrubá izolace membrán makrofágů J774.1 .....	56
4. VÝSLEDKY .....	57
4.1. Tok sodíku přes membránu myších makrofágů J774.1 působením CyaA.....	57
4.1.1. Měření vstupu sodných kationů do buněk makrofágů způsobených CyaA pomocí fluorescenční sondy SBFI/AM.....	57
4.1.2. Pokusy o optimalizaci barvení makrofágů sondou SBFI/AM .....	59
4.1.3. Ověření měření pomocí sondy SBFI/AM na mikroskopu Cell <sup>R</sup> .....	61
4.1.4. Měření vstupu sodných kationů do buněk makrofágů po působení CyaA – časově rozlišená fluorescence Sodium Green .....	64
4.1.5. Ověření vstupu sondy sodium green do buněk na fluorescenčním mikroskopu.....	65
4.2. Ověření oligomerizace CyaA v roztoku, na lipozomech a izolovaných makrofágových membránách .....	66
4.2.1. Měření oligomerizace CyaA v pufru TNE pomocí časově rozlišené fluorescence.....	66
4.2.1.1: Eliminace vlivu močoviny na oligomerizaci CyaA .....	68
4.2.1.2. Měření pozadí fluorescence donoru CyaA-detox-A488 při sledování FRET ..	69
4.2.2. Měření oligomerizace CyaA na lipozomech ze sojových lipidů .....	70
4.2.3. Měření oligomerizace CyaA na syntetických lipozomech DMPC .....	71
4.2.4. Měření oligomerizace CyaA na membránách makrofágů J774A.1 .....	72
4.2.4.1. Ověření vazby toxinu do membrána makrofágů J774A.1 .....	73
4.3. Prokazování interakce tryptofanů z RTX hemolyzinové oblasti, která by mohla mít zásadní vliv na získávání nativní konformace CyaA .....	75
4.3.1. Měření homoFRET pomocí změny anizotropie s použitím Red-edge efektu.....	75
4.3.2. Měření homoFRET pomocí vybělování vzorku a měření anizotropie.....	76
5. DISKUZE.....	77
5.1. Vstup sodných kationů do makrofágů J774A.1 .....	77
5.2. Oligomerizace CyaA toxinu v roztoku a v membránách .....	78
5.2.1. Oligomerizace CyaA-detox v roztoku .....	79
5.2.2. Oligomerizace CyaA-detox na lipozomech .....	80
5.2.3. Oligomerizace CyaA-detox na izolovaných membránách obsahujících integrin CD11b/CD18 .....	80
6. SOUHRN .....	82
7. SEZNAM LITERATURY .....	83



## SEZNAM ZKRATEK:

AC	adenylát-cyklázový
AK	aminokyselina/aminokyseliny
AM	acetoxylmethylester
AMP	adenosin-5'-monofosfát
APC	buňky prezentující antigeny (z angl. <b>Antigen Presenting Cells</b> )
APS	persulfát amonný
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CaM	kalmodulin
cAMP	adenosin-3',5'-cyklický monofosfát
CBS	vazebné místo pro kalmodulin (z angl. <b>Calmodulin Binding Site</b> )
CyaA	adenylát-cyklázový toxin
CyaA-AC <sup>-</sup>	enzymaticky neaktivní verze CyaA toxinu
Da	dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DEAE	diethylaminoethyl
DMEM	médium pro tkáňové kultury z angl. <b>Dulbecco's Modified Eagle's</b>
Medium	
DMPC	dimyristoylfosfatidylcholin
DMSO	dimethyl sulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FCS	z angl. <b>Fetal Calf Serum</b>
FRET	Fluorescenční (Försterův) rezonanční přenos energie
GST	glutathion-S-transferáza
HBSS	z angl. <b>Hank's Balanced Salt Solution</b>
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová
His-Tag	hexahistidinová značka
Hly	hemolyzinová doména RTX toxinů
IPTG	isopropyl β-D-thiogalaktopyranosid
J774A.1	myší makrofágová buněčná linie
K <sub>d</sub>	disociační konstanta
LB médium	Luria-Bertani médium pro bakteriální kultury
LP filtr uvedeno	z angl. <b>Long Pass</b> filtr – nepropouští kratší vlnové délky než je
LPS	lipopolysacharid
MDO	obohacené médium pro kultivaci bakterií
NA	numerická apertura
NAD	nikotinamidadenosindinukleotid
NLR	z angl. <b>NOD-Like Receptors</b>
NOD	z angl. <b>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</b>
OD	optická denzita
PAGE <b>Gel Electrophoresis</b> )	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. <b>PolyAcrylAmide</b>
PRRs	z angl. <b>Pattern Recognition Receptors</b>
SBFI/AM	z angl. <b>Sodium binding BenzoFuran Isophthalate</b>
SE	sukcinimidylester
RPM	frekvence otáčení za minutu (z angl. <b>Revolutions Per Minutes</b> )
RPMI Medium	médium pro tkáňové linie z angl. <b>Roswell Park Memorial Institute</b>

RTX	označení skupiny cytotoxinů nesoucích RTX vápník vazebnou doménu (z angl. Repeats in ToXin)
SDS	dodecylsulfát sodný
SP filtr	z angl. <b>S</b> hort <b>P</b> ass filtr – nepropouští delší vlnové délky než je uvedeno
SPC	sojový fosfatidylcholin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEV proteáza	z angl. <b>T</b> obacco <b>E</b> dge <b>V</b> irus protease
TISS	z angl. <b>T</b> ype <b>I</b> <b>S</b> ecretion <b>S</b> ystem
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
UV	ultrafialové záření

# 1. ÚVOD

*Bordetella pertussis* je původcem černého kašle, závažné lidské choroby, která je nebezpečná především pro kojence a předškolní děti. Tato bakterie produkuje řadu toxických látek. Jedním z jejích nejdůležitějších virulenčních faktorů je adenylát-cyklázový toxin (CyaA), patřící do rodiny RTX hemolyzinů (z angl. **R**epeats in **T**o**X**in). CyaA se váže na buňky s receptorem CD11b/CD18 (CR3), mezi které patří makrofágy, dendritické buňky, neutrofilů a některé T a B buňky. Jako ostatní RTX hemolyziny se váže do membrány hostitelských buněk a tvoří póry, které propouští monovalentní kationty, což může vést až ke koloidně osmotické lyzi napadených buněk. CyaA toxin má i další nástroj k napadení cílových buněk, a to adenylát-cyklázovou doménu, která se translokuje přes cytoplazmatickou membránu eukaryotických buněk zatím ne příliš prozkoumaným mechanismem a po aktivaci buněčným kalmodulinem přeměňuje buněčné ATP na cyklické AMP. Při translokaci zároveň vpouští do cytozolu vápenaté kationty. Při nízkých koncentracích CyaA vede konverze ATP na cAMP k narušení signalizace v buňce. U makrofágů to může vést ke ztrátě baktericidních schopností a případnému spuštění apoptózy. Při vysokých koncentracích CyaA dochází k rychlému snížení koncentrace ATP v buňce, což vede k nekróze buňky.

Vlastnosti CyaA jsou zkoumány z mnoha důvodů. Jedním z nich je vylepšení současných vakcín proti dávivému kašli. V poslední době se i v zemích, ve kterých je povinné očkování proti dávivému kašli (včetně České republiky), objevuje více případů tohoto onemocnění (Fabiánová, et al., 2009). CyaA není součástí těchto vakcín, ale intenzivně se zkoumají jeho detoxifikované mutanty, kterými by se dnes používané vakcíny vylepšily. Dalším důvodem zkoumání CyaA je vývoj rekombinantních vakcín odvozených právě od CyaA, které umožní navození imunity proti oligopeptidu, který může pocházet z téměř libovolného patogena nebo nádorové buňky. Adenylát-cyklázová doména CyaA by zde fungovala jako přenašeč takového oligopeptidu do cílových imunokompetentních buněk. Mechanismus vazby CyaA na biologické membrány ještě není přesně znám. Jeho podrobné zkoumání by však mohlo přispět k terapeutickému využití tohoto toxinu.

Má práce navazuje především na výsledky Evy Pospíšilové, Jany Vojtové-Vodolánové a Ladislava Bumby z Mikrobiologického ústavu Akademie věd České republiky a Radovana Fišera z katedry genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK.

Cílem mé práce bylo pomocí fluorescenčních metod sledovat různé interakce CyaA

s membránou.

Poté, co Radovan Fišer prokázal vstup vápenatých kationtů do buněk působením adenylát-cyklázové domény (Fiser, et al., 2007) a Eva Pospíšilová prokázala únik draselných kationtů z buněk s integrinem CD11b/CD18 působením RTX domény CyaA pomocí poměrových fluorescenčních měření (Pospisilova, 2010), bylo mou úlohou zjistit zda a jakým způsobem dochází ke vstupu sodných kationtů do buněk s CD11b/CD18 integrinem působením CyaA toxinu.

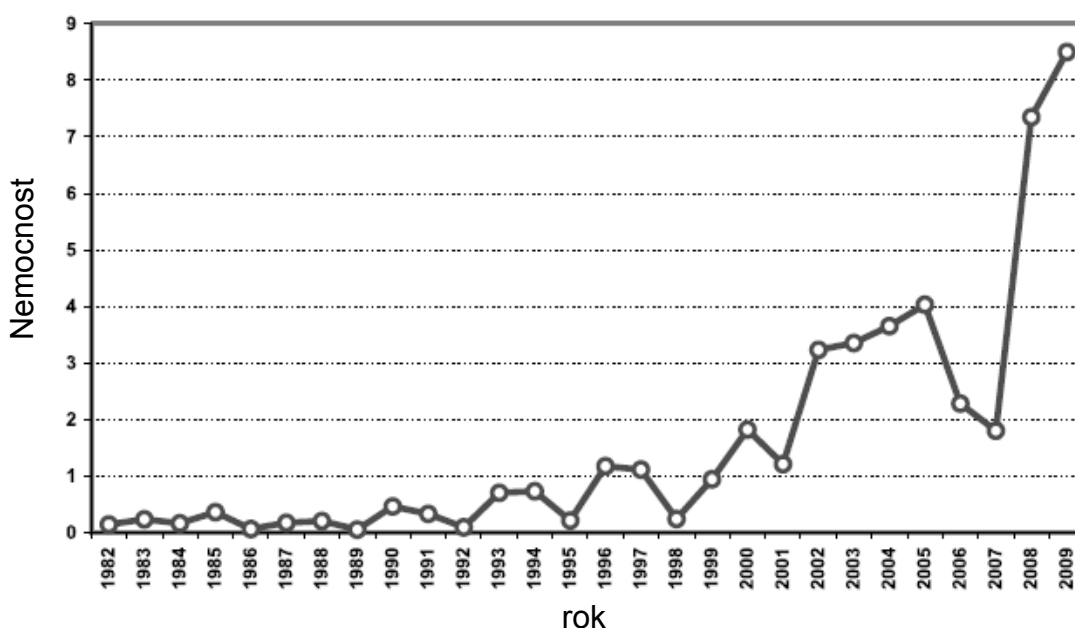
Mým dalším úkolem bylo potvrdit oligomerizaci CyaA při tvorbě póru studovanou už mými předchůdci (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009) a pokusit se zjistit, zda k ní dochází před vstupem do hostitelské membrány, nebo až po něm. K řešení tohoto úkolu jsem využila metody měření fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET), která umožňuje zjišťovat vzdálenost dvou molekul např. pomocí časově rozlišené fluorescence. Při měření jsme postupovali od jednodušších systémů po složitější – od měření proteinů v roztoku, přes proteiny lipozomu až po interakci CyaA s membránami izolovanými z makrofágů, které obsahují integrin CD11b/CD18.

Mým posledním úkolem bylo zjistit, zda dva tryptofany obsažené v C-konci CyaA tvoří jádro balení CyaA do nativní konformace, která je podmínkou správné funkce CyaA a která je intenzivně zkoumána Ladislavem Bumbou (Laboratoř molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ AVČR). K tomuto úkolu jsme opět zvolili zjišťování FRET tentokrát metodu měření anizotropie fluorescence.

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1. *Bordetella pertussis*

*Bordetella pertussis* je gramnegativní, nepohyblivý, striktně aerobní kokobacil. Je striktně lidský patogen. Způsobuje respirační onemocnění, dávivý/černý kašel (pertuse). Onemocnění se přenáší aerosolem či přímým kontaktem. Černý kašel ohrožuje život především kojencům a předškolních dětí. Před zahájením očkování patřila pertuse k nejčastějším příčinám úmrtí v dětském věku. V zemích, kde se očkování zavedlo, došlo téměř k vymýcení dávivého kašle. V posledních letech ale počet případů nakažených v těchto zemích (včetně ČR) opět stoupá (Obr. 1). Důvodem je pravděpodobně příliš krátkodobá imunizace vakcínou proti černému kašli a existence rezervoáru infekce mezi dospělými, kteří už nemusí přeočkování povinně podstupovat.



Obr. 1: Pertuse v ČR, 1982-2009, nemocnost - počet onemocnění dávivým kašlem na 100000 obyvatel, (Fabiánová, et al., 2009)

*Bordetella pertussis* disponuje velkým množstvím virulenčních faktorů. Dělí se na adheziny, které po proniknutí bakterie do dýchacích cest interagují s řasinkovým epitelem průdušek, a na toxiny, které se začínají produkovat až v pozdějších fázích onemocnění, když se bakterie dostatečně pomnoží, ničí řasinkový epitel a dostávají se dál do organismu (Hewlett, 1997).

Mezi adheziny patří například filamentózní hemaglutinin (Sato, et al., 1983), pertaktin, fimbrie, tracheální kolonizační faktor (Finn and Stevens, 1995) a další (Hewlett, 1997). Mezi toxiny patří tracheální cytotoxin, pertusový toxin, dermonekrotický toxin a adenylát-cyklázový toxin (Goldman, et al., 1982; Hewlett, 1997).

Tracheální cytotoxin hraje pravděpodobně největší úlohu v časných fázích patogeneze. Funguje jako exotoxin. Jako jediný přímo poškozuje buňky řasinkového epitelu (Goldman, et al., 1982; Hewlett, 1997; Luker, et al., 1993).

Dermonekrotický toxin je endotoxin (Cowell, et al., 1979). Na průběh černého kašle nemá pravděpodobně velký vliv. U mutant *B. pertussis*, které měly poškozenou produkci dermonekrotického toxinu, nebyla oproti divokému kmeni snížena virulence (Weiss and Goodwin, 1989). Jeho funkce v průběhu onemocnění, není přesně známa.

Pertusový toxin je exotoxin, který je na rozdíl od ostatních virulenčních faktorů (Carbonetti, 2010) produkován pouze *B. pertussis*. Řadí se mezi hlavní adhezni a kolonizační faktory a je zodpovědný za systémové projevy pertuse. Mechanismus jeho působení je velice dobře popsán. Patří do skupiny A-B toxinů. Tato skupina bakteriálních proteinových toxinů se skládá ze dvou částí. Část A má enzymatickou aktivitu způsobující toxické působení molekuly a B-část zajišťuje vazbu na cílovou buňku a umožňuje A-komponentě vstoupit do buňky (Gill, 1978; Tamura, et al., 1982). A-komponenta pertusového toxinu (také S1) po vstupu do cytozolu hydrolyzuje NAD a přenáší produkt této hydrolýzy, ADP-ribózu, na cysteinový zbytek blízko C- konce  $\alpha$  podjednotky heterotrimerických G proteinů z  $G_i$  rodiny savčích buněk (Katada, et al., 1983). Tato modifikace inhibuje signální dráhy spojené s těmito G proteiny.

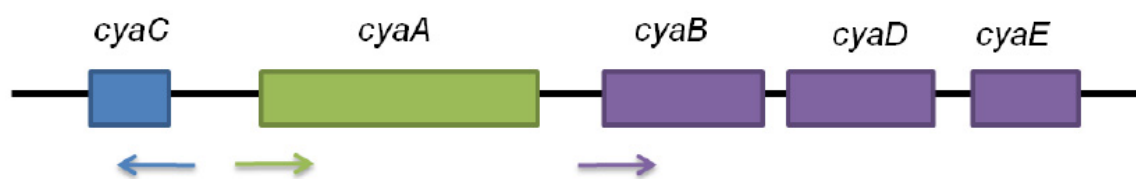
Adenylát-cyklázový toxin je nejdůležitějším virulenčním faktorem *B. pertussis*. Mutanty, které tento toxin neprodukují, jsou mnohem méně úspěšné v kolonizaci dýchacích cest infikovaných myši než divoký kmen (Khelef, et al., 1992; Weiss, et al., 1984). Toxin je prokazatelně zodpovědný za apoptózu alveolárních makrofágů, které se dostanou do kontaktu s *B. pertussis* (Gueirard, et al., 1998). Zdá se, že adenylát-cyklázový toxin je faktorem úniku *B. pertussis* před imunitním systémem hostitele. Toxiny *B. pertussis* jsou součástí nebuněčných vakcín, která se v poslední době začíná užívat místo celobuněčné vakcíny. Součástí acelulární vakcíny jsou inaktivovaný pertusový toxin, filamentózní hemaglutinin, aglutinogeny fimbrií a pertaktin. Adenylát-cyklázový toxin ani jeho toxoidy nejsou součástí nebuněčné vakcíny.

## 2.2. Adenylát-cyklázový toxin CyaA

Adenylát-cyklázový toxin (ACT, AC-Hly nebo CyaA) patří do rodiny tzv. RTX toxinů/hemolyzinů (podle anglického Repeats in ToXin). Mimo *B. pertussis* ho v pozměněných formách produkují i *B. parapertussis* a *B. bronchiseptica* (Fabiánová, et al., 2009; Novotny, et al., 1985). Gen pro jeho tvorbu je na chromozomu bakterie. Molekula CyaA se skládá z 1706 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 177 kDa. Jeho prostorové uspořádání v hostitelské membráně zatím není známa, krystalizována byla zatím jen adenylát-cyklázová doména ve vazbě na kalmodulin (Guo, et al., 2005).

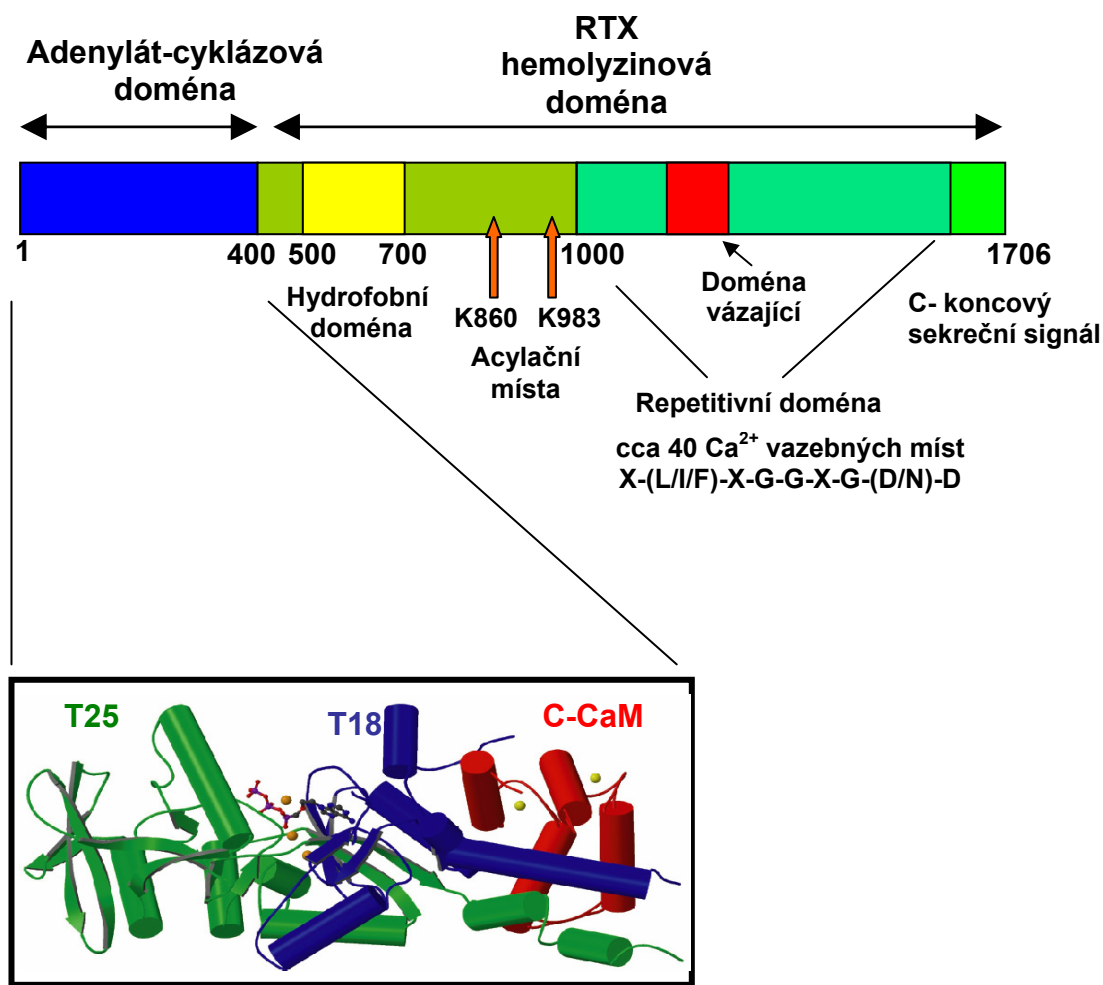
### 2.2.1. Struktura CyaA

Gen pro CyaA leží v *cya* lokusu (Obr. 2). Díky studiím porovnávajícím homologie genů pro CyaA a  $\alpha$ -hemolyzin *Escherichia coli*, který je modelovým zástupcem RTX hemolyzinů, bylo zjištěno, že *cya* lokus obsahuje také geny *cyaBDE* (Glaser, et al., 1988) zajišťující sekreci CyaA a gen *cyaC* (Barry, et al., 1991), který je přepisován v opačném směru než gen *cyaA* a jehož produkt posttranslačně modifikuje CyaA.



Obr. 2: Schematické znázornění *cyaCABDE* lokusu. Gen *cyaA* kóduje toxin CyaA. Geny *cyaBDE* kódují proteiny nezbytné pro sekreci CyaA. Geny *cyaABDE* jsou přepisovány do jedné mRNA ze společného promotoru umístěného před genem *cyaA*. Geny *cyaBDE* mají také vlastní promotor ležící mezi geny *cyaA* a *cyaB*. Gen *cyaC* kóduje acyltransferázu nutnou pro posttranslační modifikaci CyaA a je přepisován v opačném směru z vlastního promotoru. Převzato z Pospíšilová 2010.

Toxin je z DNA přepisován a překládán v neaktivní formě tzv. proCyaA, která je aktivována acyltransferázou CyaC palmytoylací lyzinu 983 (Hackett, et al., 1994) a lyzinu 860 (Masin, et al., 2005). Acylace je nezbytná pro interakci CyaA s jakoukoli hostitelskou buňkou. Navíc se ukázalo, že je důležitá i pro interakci s CD11b/CD18 integrinem (El-Azami-El-Idrissi, et al., 2003), který je lokalizován na povrchu buněk imunitního systému, jako jsou makrofágy, neutrofilové, dendritické buňky a NK buňky, a je receptorem pro CyaA (Ross and Vetvicka, 1993).



Guo *et al.*, 2005

Obr. 3: Schematické znázornění CyaA. CyaA je protein se skládá z RTX hemolyzinové domény a z invazivní adenylát-cyklázové (AC) domény. AC doména po translokaci do buňky váže buněčný kalmodulin (CaM). Na obrázku je vidět krystalová struktura AC domény s C-koncovým úsekem kalmodulinu (C-CaM) v komplexu s analogem ATP (adefovir difosfát) (Převzato z Guo, Shen *et al.* 2005).

Molekula CyaA se skládá ze dvou hlavních domén, které mohou do jisté míry fungovat nezávisle na sobě. Na N-konci CyaA je katalytická adenylát-cyklázová doména tvořená asi 400 aminokyselinami a na C-konci je RTX hemolyzinová doména tvořená asi 1306 aminokyselinami. Schematicky je struktura znázorněna na Obr. 3.

Adenylát-cyklázová (AC) doména se skládá ze dvou menších částí T25 a T18. Část T25 (1 – 224 AK) nese katalytické místo, kde dochází ke přeměně ATP na cAMP. Část T18 nese vazebné místo pro kalmodulin, který je pro aktivaci enzymatické funkce AC domény nezbytný (Wolff, *et al.*, 1980).

RTX hemolyzinová doména se dá rozdělit na několik segmentů.

- Hydrofobní segment (500 – 700 AK) je pravděpodobně zodpovědný za vznik



transmembránového kationt-selektivního kanálu (Benz, et al., 1994b) a interakci s hostitelskou membránou, pravděpodobně zde vznikají amfipatické  $\alpha$ -helixy (Osicková, et al., 1999).

- V úseku 800-1000 AK je acylační segment, kde se nachází dva lyziny, které jsou posttranslačně modifikovány palmitoylací (K860 a K983).
- Segment 1000 – 1650 obsahující nonapeptidové repetitivní sekvence bohaté na glycin a aspartát (L/I/F) X G G X G X D X (L/I/V/W/Y/F) typické pro RTX hemolyziny (Welch, 1991; 2001), které vážou vápenaté kationty a jsou zásadní pro skládání proteinu do nativní konformace (Rose, et al., 1995). Mezi aminokyselinovými zbytky 1166-1281 se nachází segment zodpovídající za vazbu na CD11b/CD18 receptor (El-Azami-El-Idrissi, et al., 2003).
- Na C-konci CyaA je umístěný segment, který obsahuje sekreční signál v délce asi 60 aminokyselin. (Sebo and Ladant, 1993; Stanley, et al., 1991). Je to další společný znak RTX hemolyzinů, které jsou díky tomuto signálu v jednom kroku sekretovány sekrečním systémem typu I (TISS z angl. **Type I Secretion System**) z cytozolu bakterie přímo do extracelulárního prostoru, C-koncem napřed (Linhartova, et al., 2010).

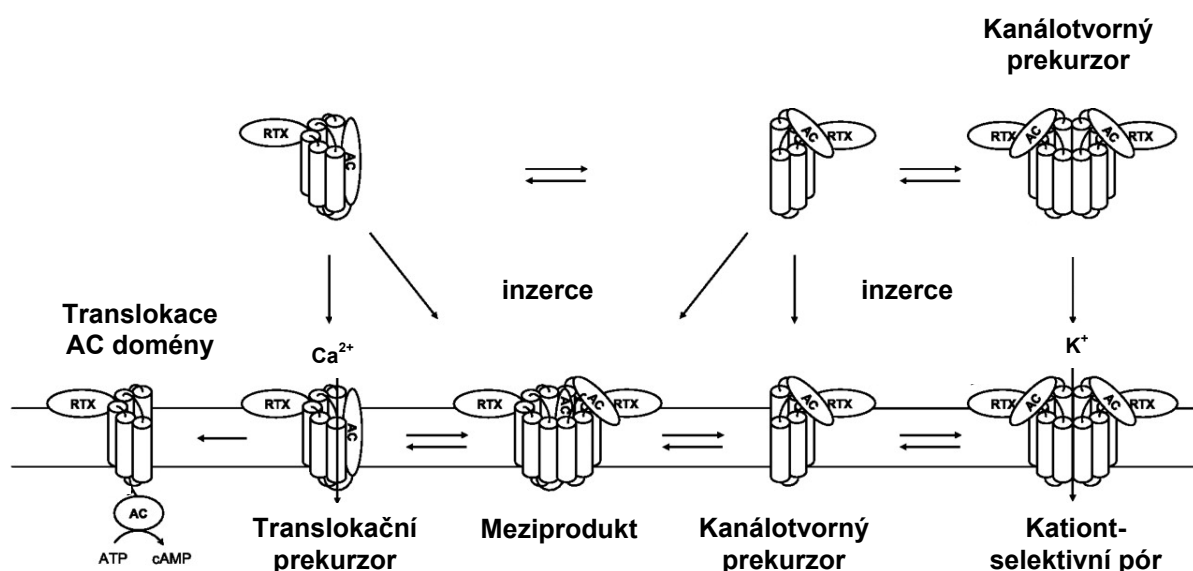
### 2.2.2. Funkce CyaA

Adenylát-cyklázový toxin je jedním z nejdůležitějším virulenčních faktorů patogenních bordetel. Tento toxin rychle eliminuje baktericidní schopnosti fagocytů (Confer and Eaton, 1982; Vojtova, et al., 2006). Po nasednutí na hostitelskou buňku je jeho AC doména translokovaná cytoplazmatickou membránou mechanismem, který zatím není přesně popsán. AC doména katalyzuje přeměnu ATP na cAMP (Ladant and Ullmann, 1999; Vojtova, et al., 2006) a způsobuje tak intoxikaci buňky. Molekula cAMP je jako druhý posel zásadní pro signalizaci v buňce.

RTX hemolyzinová doména působí nezávisle jako kanálotvorný cytotoxin (Benz, et al., 1994b; Osicková, et al., 1999; Vojtova, et al., 2006), který způsobuje jako hemolyzin lyzi červených krvinek (Bellalou, et al., 1990). CyaA tvoří malý kationtselektivní kanál o průměru 0,6-0,8 nm (Benz, et al., 1994b), který může způsobit i koloidně-osmotickou lyzi.

Oligomerizace CyaA, která souvisela s kanálotvornou aktivitu CyaA, byla potvrzena v různých membránových systémech (Benz, et al., 1994b; Osicková, et al., 1999; Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). V této části práce se oligomerizací bude zabývat celá kapitola.

Zdá se, že adenylátcyklázová a kanálotvorná aktivita CyaA působí na sobě nezávisle. Účinek jejich působení se sčítá do výsledné cytotoxické aktivity (Basler, et al., 2006; Hewlett, et al., 2006). V současnosti byl vytvořen model působení CyaA na membránu hostitelských buněk, který předpokládá současnou existenci dvou různých konformerů v membráně hostitelské buňky zároveň. Jeden konformer translokuje adenylát-cyklázovou doménu do cytozolu hostitelské buňky a intoxikuje ji. Druhý konformer vytvoří hemolyzinový kanál (Obr. 4)(Osicková, et al., 1999; Vojtova-Vodolanova, et al., 2009).



Obr. 4: Model nezávislého působení translokačního a kanálotvorného prekurzoru a jejich interakce s membránou. Převzato (Osicková, et al., 1999) a upraveno.

### 2.3. Tok iontů na membráně hostitelských buněk ovlivněných CyaA

Bylo zjištěno, že CyaA přímo ovlivňuje iontové složení cytozolu (Obr. 5) a elektrochemický membránový gradient buněk. Bylo poměrně překvapivě potvrzeno, že AC doména během svojí translokace vpouští do buňky vápenaté kationty (Fiser, et al., 2007), ačkoli se předpokládalo, že je to způsobeno spíše RTX hemolyzinovou doménou. Dále bylo zjištěno, že RTX hemolyzinová doména, která tvoří kationt-selektivní pór způsobuje únik draselných kationtů z buňky (Gray, et al., 1998; Pospisilova, 2010). Vstup chloridových aniontů do buněk působením CyaA není pravděpodobný, protože se předpokládá, že kanál pro ionty tvořený CyaA je kationt selektivní (Benz, et al., 1994b). Vstup sodných kationtů do buněk opůsobených CyaA ještě nebyl zvlášť zkoumán.

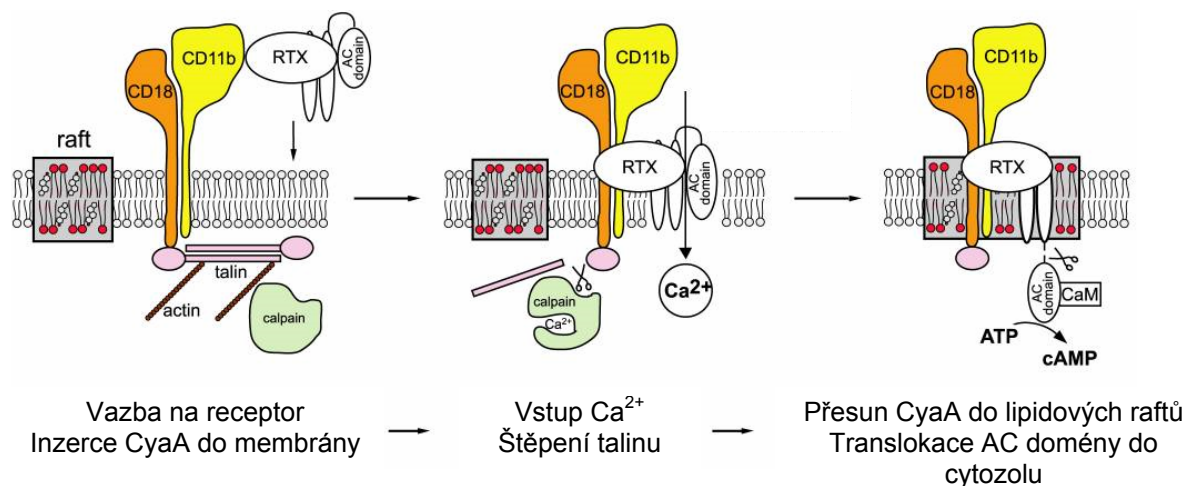
Cytosol (mM)		Krevní oběh (mM)	
K <sup>+</sup>	139	K <sup>+</sup>	4
Na <sup>+</sup>	12	Na <sup>+</sup>	145
Ca <sup>2+</sup>	<0,0002	Ca <sup>2+</sup>	1,8
Cl <sup>-</sup>	4	Cl <sup>-</sup>	116

Obr. 5: Typické iontové složení krevního oběhu a intracelulárního prostoru savčích buněk. Převzato: (Lodish, et al., 2005).

### 2.3.1. Vstup vápenatých kationtů do buněk způsobený CyaA a jeho důsledky

Regulace cytozolické koncentrace vápenatých kationtů, hraje významnou úlohu v přenosu signálu buněk. Mnoho esenciálních enzymů v signalizačních kaskádách je na vápenatých kationtech přímo závislých, stejně tak jako mnoho dalších regulačních proteinů. Zdá se, že hlavním cílem CyaA v hostiteli jsou myeloidní fagocyty, které na svém povrchu exprimují integrin CD11b/CD18 (CR3, Mac-1,  $\alpha_M\beta_2$ ) (Guermontprez, et al., 2001), i když se CyaA s menší afinitou váže i na mnoho dalších buněk, které tento integrin na svém povrchu neexprimují (Gordon, et al., 1989; Ladant and Ullmann, 1999). Jde zřejmě o nespecifickou primární vazbu na N-glykozylované proteiny na membránovém povrchu (Morova, et al., 2008). Integrin CD11b/CD18 je vázán pomocí talinu na aktinový cytoskelet buňky (BurrIDGE and Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Translokace AC domény CyaA do buněk s CD11b/CD18 integrinem je dvoukroková (Obr. 6) (Bumba, et al., 2010). V prvním kroku po navázání CyaA na integrin se do membrány integruje translokační prekurzor CyaA, který umožní, ne přesně známým mechanismem, vstup vápenatých kationtů z extracelulárního prostoru (Fiser, et al., 2007). Tyto vápenaté kationty aktivují cysteinovou proteázu zvanou kalpain (Yan, et al., 2001), která rozštěpením talinu uvolní CD11b/CD18 integrin z vazby na cytoskelet a umožní mu tak přesunout se do lipidových raftů bohatých na cholesterol. V lipidových raftech je dokončena translokace AC domény do cytozolu cílových buněk a po aktivaci kalmodulinem CyaA přeměňuje ATP na cAMP (Bumba, et al., 2010; Fiser, et al., zasláno k publikaci). Vstup vápenatých kationtů je tak přímo zodpovědný za aktivitu AC domény v cytozolu.



Obr. 6: Dvoukroková translokace AC domény do cytozolu buněk s CD11b/CD18 integrinem. 1. krok – vazba na receptor, inzerce CyaA do membrány způsobující vstup Ca<sup>2+</sup>, který aktivuje proteázu kalpain, která odštěpí integrin CD11b/CD18 od cytoskeletu. 2. krok – přesun CyaA do lipidových raftů, kde je dokončena translokace AC domény do cytozolu a po její aktivaci dochází k přeměně ATP na cAMP (Bumba, et al., 2010).

Zvýšení cytosolické koncentrace cyklického AMP má velký inhibiční vliv na mnoho funkcí alveolárních makrofágů, exprimujících na svém povrchu CD11b/CD18 integrin, které jsou pravděpodobně fyziologickým cílem CyaA. Signální dráhy ovlivňující funkce makrofágů nejsou podrobně známy, ví se ovšem, že se signalizace účastní protein kináza A (PKA) a Epac proteiny, které jsou cAMP přímo aktivovány stejně jako PKA (Aronoff, et al., 2005). Mezi funkce inhibované zvýšenou koncentrací cAMP patří fagocytóza (Aronoff, et al., 2004), produkce reaktivních kyslíkových radikálů při oxidativním vzplanutí (Dent, et al., 1994), či produkci prozánětlivých faktorů, jako je TNF $\alpha$  (Rowe, et al., 1997). Bylo také prokázáno, že zvýšení hladiny cAMP působením CyaA a následná signalizace mohou vést k toleranci patogena vyvoláním částečně maturovaného stavu u dendritických buněk (Boyd, et al., 2005) či k apoptóze makrofágů (Gueirard, et al., 1998).

### 2.3.2. Únik draselných kationtů z buněk způsobený CyaA a důsledky tohoto děje

Eva Pospíšilová ve své diplomové práci v roce 2010 potvrdila únik draselných kationtů působením CyaA z buněk s CD11b/CD18 integrinem, a sice z myších makrofágů J774A.1. Únik draselných kationtů z buněk působením CyaA byl pozorován už dříve, ale na buňkách které integrin CD11b/CD18 na svém povrchu neměly (Gray, et al., 1998). Eva dále potvrdila pomocí série mutant s ovlivněnou hemolytickou či adenylátcyklázovou aktivitou, že za únik draselných kationtů je zodpovědná RTX hemolyzinová doména, která tvoří kationt selektivní kanál o průměru 0,6 - 0,8 nm (Benz, et al., 1994b), až k úniku

draselných kationtů je nutná strukturní integrita celého toxinu CyaA.

K úniku draselných kationtů dochází, narozdíl od vstupu vápenatých kationtů (Fiser, et al., 2007), i když se na buňky neváže nový toxin a v membráně hostitele jsou pouze již vložené molekuly CyaA. Zdá se tedy, že kanál pro draselné kationty je buď stále otevřený, nebo se otvírá a zavírá v několika sekundových intervalech, jak bylo ukázáno na černých lipidových membránách (Basler, et al., 2006).

Pokles vnitrobuněčné koncentrace draselných iontů může aktivovat cytoplazmatický komplex zvaný NALP3 inflamazom (Petrilli, et al., 2007). Inflamazom pak dále aktivuje kaspázu-1 štěpící pro-IL-1 $\beta$  a pro-IL-18 na jejich aktivní formy, které jsou dále uvolňovány z buněk (Sutterwala, et al., 2007) a uplatňují se při infekci, zánětu a autoimunitních procesech (Dinarello, 1998). Aktivace kaspázy-1 může také vést k pyroptóze (buněčná smrt) často spojené se zánětlivou reakcí (Fink and Cookson, 2005). Bylo potvrzeno, že působení CyaA a především kanálotvorné aktivity, dochází k aktivaci NALP3 inflamazomu (Dunne, et al., 2010; Pospisilova, 2010).

Inflamazom NALP3 (kryopyrin) patří k NLR (z angl. NOD-Like Receptors), které rozpoznávají především bakteriální komponenty (Inohara, et al., 2005). NLR patří mezi cytozolické PRRs (z angl. Pattern Recognition Receptors). PRRs patří k vrozené imunitě, která jako první reaguje při obraně proti patogenům, a rozpoznávají mikroorganismy díky konzervovaným mikrobiálním strukturám – PAMPs (z angl. Pathogen Associated Molecular Patterns) a poškození buňky díky DAMPs (z angl. Danger Associated Molecular Patterns). Vrozená imunita je geneticky daná a nemění se při opakované aktivaci patogenem.

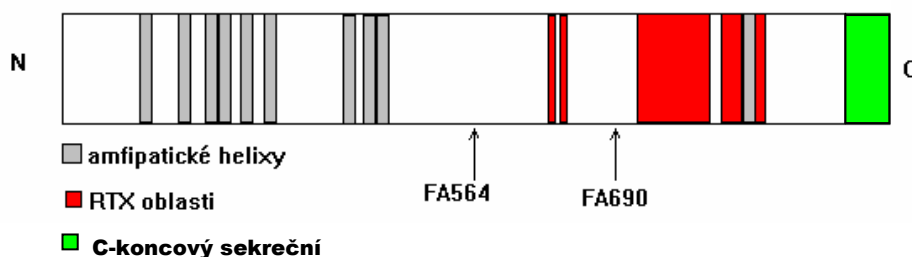
## **2.4. Oligomerizace CyaA při tvorbě kationt-selektivního kanálu**

Některé gramnegativní bakterie produkují tzv. RTX hemolyziny, které slouží jako vlivné virulenní faktory v hostitelské buňce. Mezi RTX hemolyziny patří i adenylát-cyklázový toxin *B. pertussis* a sdílí s nimi některé vlastnosti důležité pro jeho virulenci. Jednou z nich je pravděpodobně i oligomerizace molekul RTX hemolyzinů při tvorbě kanálu, který způsobuje lyzi cílových buněk.

### **2.4.1. Oligomerizace RTX hemolyzinů**

RTX hemolyziny se řadí do skupiny cytolytických RTX toxinů. Do rodiny RTX toxinů

dále patří metaloproteázy a lipázy. Proteiny v rodině RTX toxinů spojuje podobná organizace genů, které je kódují, a některé strukturní a funkční podobnosti (Obr. 7). RTX toxiny například vyžadují posttranskripční modifikaci. Jedná se o acylaci, bez které jsou produkované toxiny biologicky neaktivní, protože je narušena jejich interakce s hostitelskou buňkou (Lally, et al., 1999). Sekrece RTX toxinů z buňky probíhá bez vzniku periplazmatického meziprojektu a je závislá na rozpoznání C-konce RTX toxinu pomocí ABC (z angl. ATP-Binding Cassette) přenašeče (Coote, 1992; Higgins, 1992). Gen pro tento přenašeč se nachází na operonu, který obsahuje i gen pro RTX toxin. RTX toxin obsahuje nonapeptidové repetitivní sekvence bohaté na glycin a aspartát. Počet repetitivních sekvencí ve spektru RTX toxinů je různý - 6-40 (Lally, et al., 1999). RTX toxiny jsou podle specifity vazby na cílové buňky děleny na RTX hemolyziny, které se váží na širší spektrum hostitelských buněk, a na RTX leukotoxiny, které se vážou jen na specifické buněčné typy a liší se i v závislosti na hostiteli (Lally, et al., 1999). Mezi RTX hemolyziny patří mimo adenylát-cyklázový toxin *B. pertussis* také  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) *E. coli* (Cavalieri, et al., 1984), který je nejvíce prozkoumaný, či toxin ApxI bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Frey, et al., 1991; Lally, et al., 1999). Vzhledem k tomu, že je  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) *E. coli* považován za typického zástupce RTX hemolyzinů budu se v dalším popisu věnovat už jen jemu.



Obr. 7 Schématická struktura  $\alpha$ -hemolyzinu (HlyA). FA označuje polohu zbytku mastné kyseliny.- Na C-konci je sekreční signál. Převzato (Fiser, 2003; Soloaga, et al., 1998) a upraveno.

V N-koncové oblasti HlyA tvoří aminokyselinové zbytky amfipatické  $\alpha$ -helixy zodpovědné za tvorbu transmembránových kanálů (Hyland, et al., 2001). Protein HlyA tvoří v biologických membránách póry o průměru asi 1-3 nm (Bhakdi, et al., 1986). Kanály tvořené HlyA jsou kationt-selektivní a naplněné vodným roztokem (Benz, et al., 1994b). HlyA vytváří transmembránové kanály v různých typech buněčných membrán např. erytrocytech teplokrevných obratlovců (Cortajarena, et al., 2001), leukocytech a epiteliálních buňkách (Lally, et al., 1999). Zabudovává se i do fosfolipidových váček

(lipozomů) (Hyland, et al., 2001) a do černých lipidových membrán (Benz, et al., 1994b).

Je pravděpodobné, že hemolytická aktivita RTX hemolyzinů souvisí s tvorbou oligomerů. Toxin HlyA působí jako oligomer při hemolýze (Ludwig, et al., 1993) i při kanálotvorné aktivitě v černých lipidových membránách (Benz, et al., 1989). Na černých lipidových membránách ukazují kooperativní závislost kanálotvorné aktivity na koncentraci toxinu i HlyA *Proteus vulgaris*, HlyA *Morganella morganii* (Benz, et al., 1994a) či ApxI A *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Maier, et al., 1996).

Existují i starší publikované výsledky, které naznačují, že tvorbu kanálů HlyA *E. coli* zajišťují monomery. Tyto výsledky byly získány na různých membránových systémech, a sice membránách králičích erytrocytů (Bhakdi, et al., 1986), na lipozomech (Menestrina, 1988) i na černých lipidových membránách (Ropele and Menestrina, 1989).

#### 2.4.1.1. Interakce RTX hemolyzinů s membránou

Zkoumání RTX hemolyzinů v různých membránových systémech objasňuje specifitu vazby na různé hostitelské membrány, ale nemusí nutně vysvětlovat jejich fyziologickou funkci. Navíc toxiny, které mají širší spektrum hostitelských buněk, mohou působit různě na různé typy buněk. Je to dáno způsobem interakce s membránou nebo možného spuštění signální kaskády přes receptor, na který se mohou vázat (Lally, et al., 1999). Například HlyA *E. coli* se umí navázat do membrány lipozomu a vytvořit v ní pór (Menestrina, 1988). Bylo prokázáno, že pro vazbu a inzerci HlyA do lipozomového váčku není třeba ani jeho acylace, ani vazba  $\text{Ca}^{2+}$  do jeho repetitivních sekvencí, které jsou typické pro RTX hemolyziny, ale stačí hydrofobní segment samotného toxinu, který se nachází na jeho N-konci (Hyland, et al., 2001). Acylace HlyA (Hardie, et al., 1991; Issartel, et al., 1991; Stanley, et al., 1994) a vazba  $\text{Ca}^{2+}$  do repetitivních sekvencí (Boehm, et al., 1990; Ludwig, et al., 1988) jsou na druhé straně nezbytné pro hemolytickou aktivitu tohoto toxinu. Bylo prokázáno, že hemolýza ani cytolytická funkce HlyA není závislá na vazbě na integrin CD11a/CD18, který byl zvažován jako receptor HlyA. Vazba HlyA na cílové buňky je tedy nespecifická (Valeva, et al., 2005).

#### 2.4.2. Oligomerizace CyaA

Kanál tvořený CyaA toxinem je menší než kanál tvořený HlyA *E. coli*. Hemolytická aktivita CyaA je také mírnější v porovnání s HlyA (Benz, et al., 1994b).

Aktivita AC domény je přímo úměrná translokaci této domény do cytozolu cílových

buněk, což naznačuje, že na cílové buňky působí jako monomer(Gray, et al., 1998). Kanálotvorná aktivita CyaA se ovšem vykazuje závislost na koncentraci CyaA vyššího řádu, což znamená, že hemolyzinový kanál je tvořen více než jednou molekulou CyaA(Gray, et al., 1998). Bylo zjištěno, že toxin *CyaA* bakterie *B. pertussis* působí ve formě oligomerů na různých umělých membránách (Benz, et al., 1994b; Osicková, et al., 1999; Szabo, et al., 1994) i na erythrocytech (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). Navzdory tomu se ukázalo, že únik draselných kationtů z erythrocytů, za který je zodpovědná právě RTX hemolyzinová doména CyaA (Pospisilova, 2010), vyvolává CyaA i formě monomerů(Gray, et al., 1998). Autor tohoto pozorování oligomerizaci nevylučuje. Jeho výsledky prozrazují, že k oligomerizaci CyaA pravděpodobně dochází až na membráně erythrocytů a že k prvnímu kontaktu a vložení se do membrány hostitele dochází ve formě monomeru CyaA, který je schopen způsobit únik draselných kationtů z erythrocytů. Jednoznačný důkaz o oligomerizaci CyaA při tvorbě kanálů v erythrocytech byl podán komplementačními studiemi s jednotlivými nefunkčními toxiny. Byly vytvořeny páry různých mutant s delecemi v různých úsecích, které se v daném páru nepřekrývaly. Jednotlivé páry byly přidány k cílovým buňkám a sledovala se jejich hemolytická aktivita, která se z velké části obnovila (Bejerano, et al., 1999; Iwaki, et al., 1995).

Oligomerizace CyaA ještě nebyla zkoumána u buněk s CD11b/CD18, které jsou zřejmě cílovými buňkami pro CyaA (Guermontez, et al., 2001). Také bylo pozorováno, že na arteficiálních membránách (černé lipidové membrány) se kanály tvořené CyaA často otvíraly a zavíraly, což by mohlo znamenat dynamickou rovnováhu mezi oligomery a monomery na membráně, které by často disociovaly (zrušení kanálu) a znovu oligomerizovaly (vytvoření kanálu) (Benz, et al., 1994b).

#### 2.4.2.1. Interakce CyaA s membránou

Cílovými buňkami pro CyaA jsou myeloidní buňky, které na svém povrchu exprimují CD11b/CD18 integrin, přes který je vazba a cytotoxicita CyaA uskutečněna (Guermontez, et al., 2002). CyaA se vkládá i do membrány lidských a ovčích erythrocytů a způsobuje u ovčích způsobuje i hemolýzu, ačkoli erythrocyty na svém povrchu neexprimují CD11b/CD18 integrin (Hanski, 1989). CyaA se zabudovává i do membrány lipozomů a způsobuje jejich lyzi. Na rozdíl od ostatních membránových systémů, k lyzi lipozomů nemusí být CyaA acylován, dokonce neacylovný pro-CyaA vykazuje větší efektivitu vazby do lipozomů než acylovaný CyaA. Naznačuje to, že studium účinku CyaA

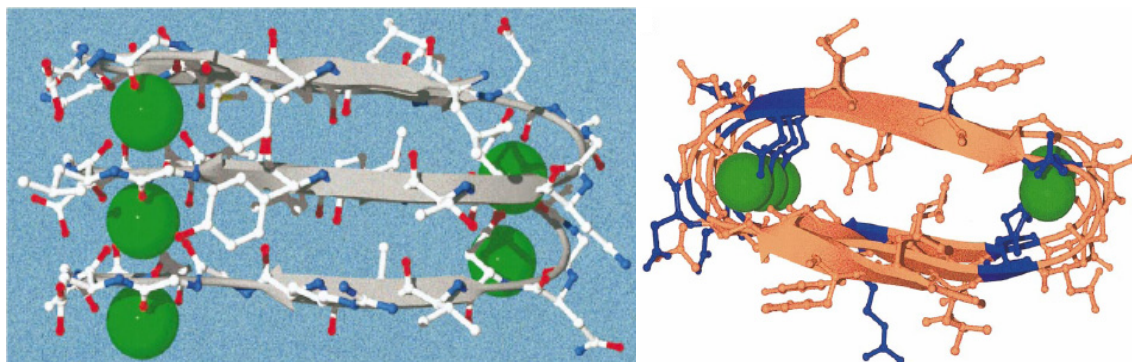


na lipozomových membránách, nemusí mít stejné výsledky jako vazba na biologické membrány a výsledky na lipozomech tedy nemusí být úplně relevantní pro biologickou aktivitu CyaA (Masin, et al., 2004).

## 2.5. Repetitivní část molekuly CyaA

CyaA jako i ostatní RTX hemolyziny obsahuje aminokyselinové repetitivní sekvence. U RTX hemolyzinů se tyto repetitivní sekvence nachází na C-konce. U CyaA jsou mezi aminokyselinami 1006 a 1638 (Khelef, et al., 1992). Repetitivní sekvence fungují jako vazebná místa pro vápenaté kationty. Po jejich vazbě dojde ke změně konformace CyaA (Hewlett, et al., 1991). Repetitivní doména se těsně sbalí a dehydratuje a dosáhne stabilní struktury (Chenal, et al., 2009). Tato změna má zásadní význam pro vazbu CyaA na biologické membrány a translokaci AC domény do cytozolu hostitelských buněk (Gray, et al., 1998; Rogel, et al., 1991). Také pravděpodobně vysvětluje způsob sekrece CyaA přes bakteriální membránu. V bakteriálním cytosolu je nízká koncentrace vápenatých kationtů, tedy i CyaA zde má rozvolněnou strukturu a snadněji projde sekrečním kanálem. CyaA se v tomto stavu dostane do extracelulárního prostoru hostitele, které je na vápenaté kationty bohatší, a tak se spustí sbalení CyaA do plně funkční konformace (Chenal, et al., 2009).

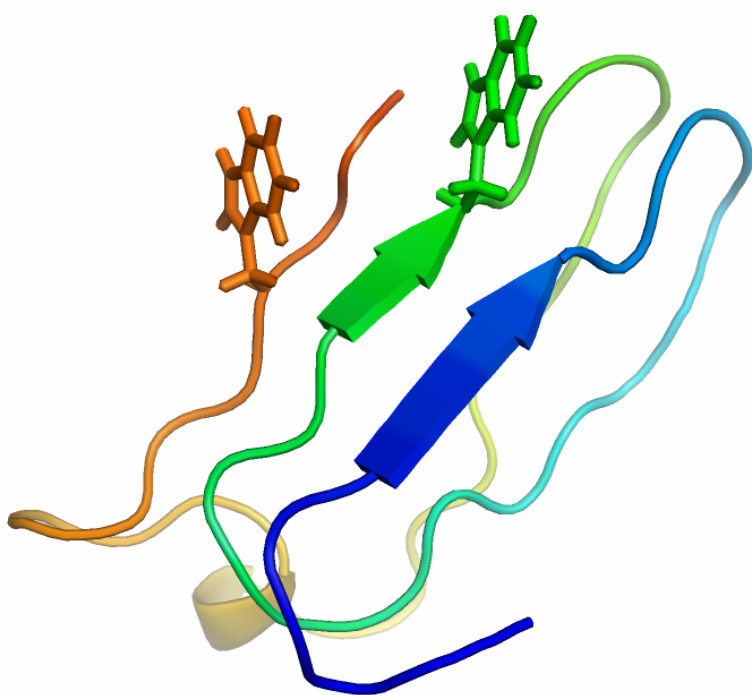
Model trojrozměrné struktury repetitivních oblastí byl vytvořen na základě měření elektronové paramagnetické rezonance (Rhodes, et al., 2001). Repetitivní sekvence CyaA jsou svinuty do spirály, která je tvořena  $\beta$ -listy s očkami. Tato struktura se nazývá beta-roll, nebo beta sheet helix (Obr. 8).



Obr. 8: Trojrozměrná struktura repetitivní oblasti. Vlevo je pohled z roviny kolmé na osu peptidového řetězce, vpravo je pohled ve směru osy řetězce. V pravé části jsou polární zbytky znázorněny hnědě, hydrofobní modře, ionty  $\text{Ca}^{2+}$  v obou modelech zeleně. Převzato (Fiser, 2003; Rhodes, et al., 2001).

Vazba vápenatých kationtů do repetitivních sekvencí je ovlivněna sekvencí C-konce.

Vápenaté kationty jsou schopny se vázat až na sekundární struktury proteinu. Bylo zjištěno, že RTX nonapeptidové repetice se nejsou schopny sbalit do beta-rollu v přítomnosti vápenatých kationtů bez C koncové oblasti (zbytky 1631-1652 ) (Sotomayor Perez, et al., 2010). Na pozici 1621 a 1645 sekvence CyaA leží tryptofany. Jedna z hypotéz předpokládá, že by vzájemná interakce aromatických kruhů těchto tryptofanů mohla stabilizovat strukturu nesbaleného CyaA natolik, aby byl schopen vázat vápenaté kationty do repetitivních sekvencí a sbalit se tak do funkční konformace (Ladislav Bumba, nepublikované výsledky) (Obr. 9).



Obr. 9: Úsek CyaA C-koncové oblasti znázorňující tryptofany (pozice 1631-zelená a 1652-oranžová), stojící pravděpodobně na počátku balení CyaA a první beta roll hemolyzinové oblasti (zelená a modrý šipka). Model vytvořil Radovan Fišer programem Rosetta (nepublikovaná data).

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Chemikálie, materiál a přístrojové vybavení

##### 3.1.1. Seznam použitých chemikálií

$\beta$ -merkптоethanol, Calbiochem, Německo.  
Akrylamid, Serva, Německo.  
Ampicilin, Biotika, SR.  
Antibiotika (10 000 U/ml penicilin G, 10 mg/ml streptomycin a 25  $\mu$ g/ml amphotericin B), 100x koncentrovaný roztok, Sigma-Aldrich, USA.  
Alexa Fluor 488/SE (sukcinimidylester), Invitrogen, USA.  
Alexa Fluor 594/SE (sukcinimidylester), Invitrogen, USA.  
Bacto-trytone, Oxoid, Velká Británie.  
Bakteriologický agar, Oxoid, Velká Británie.  
Coomassie Brilliant Blue R-250, Serva, Německo.  
Diethylaminoethyl–Sephарosa (DEAE-Sephарosa) CL-6B, Sigma-Aldrich, USA.  
Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA.  
Dihydrogenfosforečnan sodný (dihydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA.  
Dimyristoyl-L-alfa-fosfatidylcholin, Avanti polar lipids, Inc, USA.  
Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM), PAA Laboratories, Rakousko.  
Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, Německo.  
Ethanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Ethyldiamintetraoctová kyselina (EDTA), Serva, Německo.  
Fosfatidylcholin sojový SPC S IIa, Sigma-Aldrich, USA.  
Glukosa (25 % roztok), Přípravna médií, ČR.  
Glutathion, Sigma-Aldrich, USA.  
Glutathion-Agarosa, Sigma-Aldrich, USA.  
Glycerol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Hovězí sérový albumin Albumin Fraktion V (BSA), Carl Roth, Německo.  
Hydrogenfosforečnan disodný (dodekahydrát), Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Hydroxid sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Chlorid amonný, Sigma-Aldrich, USA.  
Chlorid draselný, Lachema, ČR.  
Chlorid sodný, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Chlorid vápenatý, Lachema, ČR.  
Chloroform, Lachema, ČR.  
Ionomycin, Sigma-Aldrich, USA.  
Isopropanol, Lachema, Neratovice, Česká republika.  
Izopropyl  $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA.  
Kvasničný extrakt, Oxoid, Anglie.  
Kyselina octová, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Kyselina orthofosforečná 85 %, Lach-Ner, s. r. o., ČR.  
Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES), Serva, SRN.  
L-glutamin (3 % roztok), Přípravna médií, ČR.  
Methanol, Lach-Ner, s. r. o., ČR.

Močovina, Merck, Německo.  
N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (TEMED), Serva, Německo.  
N,N'-methylen-bisakrylamid, Serva, Německo.  
Ni-Sepharosa, Sigma-Aldrich, USA.  
Nigericin sodium salt, Fluka, USA.  
Persulfát amonný (APS), Serva, Německo.  
Phenyl-Sepharosa CL-4B, Pharmacia, Praha, ČR.  
Pluronic F-127, Sigma-Aldrich, USA.  
Proteinový standard PageRuler Unstained Protein Ladder, Fermentas International Inc., Kanada.  
Pyruvát (1,1 % roztok), Přípravna médií, ČR.  
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) médium, Přípravna médií, ČR.  
Sephadex G-25, Sigma-Aldrich, USA.  
SBFI/AM (sodium benzofuranisophtalate/acetoxymethylester), Invitrogen.  
Síran sodný, Sigma-Aldrich, USA.  
Thiamin hydrochlorid, Calbiochem, Německo.  
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Serva, Německo.  
Tris.Hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Německo.  
Triton X-100, Serva, Německo.  
Triton X-100, Amersham, USA.  
Tween 20, Sigma-Aldrich, USA.  
Valinomycin, Sigma-Aldrich, USA.

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

### 3.1.2. Přístrojové vybavení

Bürkerova komůrka, Marienfeld, Německo.  
Centricon Amicon MW 10000 cut-off, Millipore, Billerica, USA.  
Centrifuga Eppendorf 5415 R, Eppendorf AG, Německo.  
Centrifuga MiniSpin<sup>R</sup>, Eppendorf AG, Německo.  
Centrifuga Sorvall RC26 Plus, Du Pont Instruments, USA.  
Digitální váhy HF-2000G, A&D Weighing, USA.  
Digitální váhy, Mettler, Bonn, Německo.  
Dioda NanoLED-280 (nebo 460), Horiba Jobin Yvon, UK, jako světelný zdroj pro měření v časovém rozlišení.  
Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, USA.  
Optický Filtr 3RD410LP, Omega Filters, USA.  
Optický Filtr 3RD490SP, Omega Filters, USA.

Optický Filtr 3RD490LP, Omega Filters, USA.

FluoroMax-3, Jobin Yvon Horiba, Francie.

FluoroHub Single photon counting controller, Jobin Yvon Horiba, Francie.

Fluorescenční mikroskop Cell<sup>R</sup>, Olympus IX 81, Hamburg, Německo.

Invertovaný mikroskop IX 71, Olympus, Japonsko.

Konfokální mikroskop TCS SP2, Leica, Německo.

LiposoFast, Avestin, Kanada.

Mrazicí box (-20 °C), Zanussi, Řím, Itálie.

Mrazicí box (-80 °C), Jouan, Paříž, Francie.

pH-metr, inoLab Level 1, WTW, Německo.

Předvážky Nagemma, OWA Labor, Berlin, Německo.

Spektrofotometr SECOMAM S.250I+, ALC-SECOMAM, Francie.

Termostatovaná vodní lázeň typ U7C, VEB MLW, Mnichov, SRN.

Termostatovaná vodní lázeň typ UH8, VEB MLW, Mnichov, SRN.

Ultrasonikátor S3000, Misonix, USA.

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

Zdroj pro elektroforézu PowerPac, Basic Power Supply, Bio-Rad, USA.

### **3.1.3. Roztoky a pufry**

30 % roztok akrylamidu pro SDS-PAGE elektroforézu:

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:

Methanol	225 ml
Voda	225 ml
Kyselina octová	50 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,5 g

Činidlo Bradfordové:

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,01 % (w/v)
Ethanol	4,7 % (v/v)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	8,7 % (v/v)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:

Methanol	250 ml
Voda	650 ml
Kyselina octová	100 ml

PBS: pH 7,4

NaCl	138 mM
KCl	3 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM

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

30 % roztok akrylamidu	1,24 ml
Destilovaná voda	1,8 ml
1 M Tris-HCl pufr (pH 8,8)	1,87 ml
10 % SDS	50 µl
25 % APS	12,5 µl
TEMED	12,5 µl

T pufr:

Tris-HCl pH 8	50 mM
---------------	-------

TB pufr:

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

pH se upraví na 6,7 pomocí 1 M KOH a poté se přidá MnCl<sub>2</sub> do výsledné koncentrace 55 mM. Roztok se sterilizuje filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,22 μm

TC pufr:

Tris-HCl pH 8	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM

TN pufr:     pH 7,4

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l

TCT pufr:

Tris-HCl pH	850 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM
Triton X-100	0,1 %

TNC pufr:     pH 7,4

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
CaCl <sub>2</sub>	10 mM

TNE pufr: pH 7,4

Tris-HCl	50 mmol/l
NaCl	150 mmol/l
EDTA	1 mmol/l

TUC pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
CaCl <sub>2</sub>	0,2 mM

TUE-A pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
EDTA	2 mM

TUE-B pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
EDTA	4 mM

TUN-A pufr: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
NaCl	120 mM

TUN-B: pH 8,0

Tris-HCl	50 mM
Močovina	8 M
NaCl	200 mM



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

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

### 3.1.4. Kultivační média

#### 3.1.4.1. Tekutá kultivační média pro bakteriální kultury

LB médium (Luria-Bertani médium):

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

Přidáním 5 M NaOH se upraví pH na hodnotu 7,2.

MDO médium pH 7,0:

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

5 M NaOH (úprava pH)  
Sterilace autoklávem (0,12 MPa, 120 °C, 20 minut)

SOB (Super Optimal Broth) médium:

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

Steriluje se autoklávem (0,12 MPa, 120 °C, 30 minut). Poté se přidá 10 ml sterilního roztoku 1 M MgCl<sub>2</sub> a 1 M MgSO<sub>4</sub>. Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

Médium s ampicilinem:

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml.

Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

Médium s tetracyklinem:

Připraví se médium (LB médium nebo MDO médium). Po sterilizaci a vychladnutí se k médiu přidá tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µM.

Takto připravená média se uchovávají při 4 °C.

#### 3.1.4.2. Tuhá kultivační média pro bakteriální kultury

LB půda (Luria-Bertani médium) pH 7,2:

Bacto-tryptone	10 g
kvasničný extrakt	5 g
NaCl	10 g
deionizovaná voda	do 1000 ml
5 M NaOH (úprava pH)	

Před sterilizací se do média přidá 18 g/l bakteriologického agaru. Po sterilizaci se médium vychladí na teplotu přibližně 50 °C, přidá se ampicilin do výsledné koncentrace 150 µg/ml, nebo tetracyklin do výsledné koncentrace 12,5 µM, a po zamíchání se takto připravené médium používá na přípravu agarových ploten, které se uchovávají při 4 °C.

### 3.1.4.3. Kultivační média pro tkáňové linie

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

Komerčně dostupné s vysokým obsahem glukosy (4,5 g/l), L-glutaminu, bez fenolové červeně bylo zakoupeno od firmy PAA Laboratories, Rakousko.

HBSS (Hank's balanced salt solution)

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
Hepes pH 7,4	10 mM
glukosa	1 % (w/v)

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) médium:

RPMI s NaHCO <sub>3</sub>	450 ml
L-glutamin (3 % roztok)	5 ml
Glukosa (25 % roztok)	9 ml
Pyruvát (1,1 % roztok)	2,5 ml
Antibiotika (100krát koncentrovaná)	5 ml
FCS (z angl. Fetal calf serum)	50 ml

### 3.1.5. Použité tkáňové linie

Pro mikroskopické studie byla používána myší makrofágová linie J774A.1 (ATCC - American Type Culture Collection, Catalog No. TIB-67, USA).

### 3.1.6. Bakteriální kmeny

Bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 Blue (Stratagene, USA) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac1q ZΔM15Tn10(Tetr)] byl používán pro manipulaci plazmidových DNA a produkci CyaA.

### 3.1.7. CyaA a jeho použité deriváty

CyaA – adenylát-cyklázový toxin.

CyaA-detox - toxoid geneticky detoxifikovaný inzercí GlySer mezi AK 188 a 189 – přerušení ATP vazebného místa CyaA, toxin ztrácí adenylátcyklázovou aktivitu (Ladant, et al., 1992; Osicka, et al., 2000).

CyaA(1530-1680) – úsek CyaA 150 AK, část RTX domény.

CyaA WYR (1530-1680) - úsek CyaA 150 AK se substitucí v pozici 1645-1647 WYR>ASG.

## 3.2. Metody a pracovní postupy

### 3.2.1. Produkce a purifikace CyaA a jeho derivátů

#### 3.2.1.1. Uchovávání bakteriálních kmenů

Kmeny *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3) byly krátkodobě uchovávány na agarových LB plotnách s příslušným antibiotikem při 4 °C. Dlouhodobě byly uchovávány zmražené v glycerolu (40% glycerol smíchaný s kulturou v tekutém LB médiu, narostlou do stacionární fáze, v poměru 1:1) při -80 °C.

#### 3.2.1.2. Příprava superkompetentních buněk *Escherichia coli*

Na tuhé LB médium s tetracyklinem byla nanesena suspenze buněk dlouhodobě uchovávaného kmene *E. coli* (3.2.1.1.) a dále kultivována (37 °C, 16–24 hodin). Poté byly 2–3 kolonie *E. coli* z tuhého LB média přeneseny do 50 ml LB média s tetracyklinem a kultivovány přes noc při teplotě 30 °C. Druhý den ráno bylo přeneseno 5 ml noční kultury do 500 ml SOB média a pokračovalo se v kultivaci při 30 °C za intenzivního třepání a měření optické denzity bakteriální kultury. Po dosažení požadované optické denzity ( $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ ) byla kultura prudce ochlazená v ledové lázni a poté centrifugována (6 000 g, 4 °C, 10 minut). Sediment bakteriálních buněk *E. coli* byl resuspendován ve 32 ml ledového TB pufru. Následovala inkubace buněčné suspenze v lázni voda-led (0 °C, 10 minut) a opětovná centrifugace buněk (6 000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru.

K buněčné suspenzi bylo přidáno DMSO do koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v ledové lázni (0 °C, 10 minut) byla buněčná suspenze rozplněna po 200 µl do mikrozkušavek a zamrazena v tekutém dusíku. Takto připravené superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě - 80 °C.

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

K 50 µl suspenze superkompetentních buněk (kapitola 3.2.1.2.) byl přidán 1 µl plazmidové DNA (pCACT3) ze zásobních roztoků, obsah byl šetrně, ale důkladně zamíchán. Plazmid pCACT3 s vloženým genem pro CyaA nebo jeho mutantu nesl jako selekční marker gen *blaM* zajišťující nositeli rezistenci k ampicilinu (Betsou, et al., 1993). Směs byla inkubována (4 °C, 10 minut) a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazena po dobu 2 minut v ledu. Po přidání 1 ml předeřátého tekutého LB média byla kultura inkubována 60 minut (37 °C). Během této doby se plazmid uvnitř transformovaných buněk replikuje a zároveň dochází k produkci určitého množství β-laktamázy. V závěru celého procesu bylo vyseto 50 – 200 µl suspenze na tuhé LB médium s ampicilinem, ke kterému transformované buňky nesly rezistenci. Buňky byly inkubovány (37 °C, 12 – 16 hodin).

#### 3.2.1.4. Produkce toxinu v 500ml kulturách

Buňky transformované plazmidem určeným k expresi požadovaného proteinu a inkubovány přes noc na tuhém LB médiu s ampicilinem. Druhý den byly do 50 ml tekutého MDO média obsahujícího ampicilin přeneseny 2–3 bakteriální kolonie, které nesly plazmid s genem pro požadovaný protein a bakterie *E. coli* byly kultivovány za stálého třepání 12–16 hodin při 37 °C. Následně bylo odebráno 5 ml pro zaočkování 500 ml čerstvého MDO média s ampicilinem. Bakteriální kultura byla inkubována za nepřetržitého třepání při teplotě 37 °C do optické denzity  $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$ . Poté byla produkce proteinu indukována přidávkem IPTG (o výsledné koncentraci 1 mM) vzhledem k tomu, že geny kódující CyaA, případně CyaC, jsou pod kontrolou inducibilního lac promotoru. Kultura se za stálého třepání nechala růst další 4 hodiny, aby mohlo dojít k produkci CyaA. Kultivace bakterií byla ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v lázni voda-led.

Pro analýzu vyprodukovaného množství proteinu v buňkách *E. coli* byl z narostlé

bakteriální kultury odebrán vzorek (1 ml), který byl dále centrifugován (12 000 g, pokojová teplota, 1 minuta). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 µl TUC pufru. Následně bylo odebráno 20 µl pro analýzu množství vyprodukovaného toxinu pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.).

#### 3.2.1.5. Příprava močovínového extraktu CyaA a jeho derivátů

Narostlá bakteriální kultura po kultivaci (kapitola 3.2.1.4.) byla centrifugována (4000 g, 4 °C, 20 minut). Pelet buněk byl resuspendován v TC pufru (10 ml) a sonikován (4 minut, 35 W, 0 °C, 30 sekundový pulz, 60 sekundová pauza na chlazení). Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky odstraněny centrifugací (3000 g, 4 °C, 5 minut). Supernatant byl přenesen do nové centrifugační zkumavky a centrifugován (18000 g, 4 °C, 30 minut). Protein přítomný v inkluzních tělískách bakterií se poté nacházel v peletu. Supernatant byl odstraněn a membrány buněk byly odstraněny opatrným odmýváním sedimentu v TUE-B pufru. Inkluze s proteinem byly poté resuspendovány v deionizované vodě a celý obsah zkumavky byl centrifugován (18000 g, 4 °C, 10 minut). Supernatant byl znovu odstraněn a k vytvořenému peletu bylo přidáno 4,8 g pevné močoviny a 6 ml 50 mM roztoku Tris-HCl (pH 8,0). Obsah zkumavky byl šetrně promíchán a nadále promícháván pomalou inverzí po dobu 45 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 M. Poté byl obsah zkumavky centrifugován (18000 g, 4 °C, 30 minut) a supernatant (močovínový extrakt) obsahující denaturovaný CyaA (nebo jeho mutantní formy) byl převeden do nových zkumavek a uchováván při teplotě -20 °C. Pro analýzu množství toxinu v močovínovém extraktu byla použita SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.).

#### 3.2.1.6. Purifikace proteinu ionexová chromatografií na DEAE-Sepharose

Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml DEAE-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Kolona byla ekvilibrována TUN-A pufrům do doby, než pH pufru, který vytékal z kolony, bylo stejné jako pH nanášeného pufru (asi 100 ml TUN-A pufru). V močovínovém extraktu připraveném k purifikaci (kapitola 3.2.1.5.) byla upravena koncentrace NaCl na výslednou hodnotu 50 mM. Takto upravený vzorek byl nanesen na předem připravenou kolonu s DEAE-Sepharosou, kde došlo k zachycení CyaA. Většina ostatních kontaminujících proteinů byla následně odstraněna promýváním kolony TUN-A

pufrem (cca 25-35 ml). Navázaný toxin byl z kolony eluován roztokem TUN-B. Během eluce bylo množství proteinu měřeno orientačním testem podle Bradfordové (10 µl eluovaného vzorku a 90 µl činidla Bradfordové). Přítomnost a čistota získaného CyaA z DEAE-Sepharosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.).

#### 3.2.1.7. Purifikace proteinu hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose

Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml Phenyl-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Poté byla ekvilibrována TN pufrem (cca 20 ml).

Vzorek obsahující toxin, který byl purifikován na DEAE-Sepharose (kapitola 3.2.1.6.), byl ředěn 4x pomocí TN pufru a byl nanesen na předem připravenou kolonu s Phenyl-Sepharosou. Phenyl-Sepharosa s navázaným toxinem byla poté promyta 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Navázaný toxin byl z Phenyl-Sepharosy eluován TUE-A pufrem v postupně odebíraných 1 ml frakcích. Množství proteinu bylo měřeno v každé frakci orientačním testem podle Bradfordové (10 µl frakce a 90 µl činidla Bradfordové).

Přítomnost a čistota CyaA v jednotlivých eluovaných frakcích z Phenyl-Sepharosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.). Konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kapitola 3.2.2.2.).

#### 3.2.1.8. Příprava extraktu C-konce CyaA

Narostlá bakteriální kultura po kultivaci (kapitola 3.2.1.4.) byla centrifugována (4000 g, 4 °C, 20 minut). Pelet buněk byl resuspendován v TNC pufru (10 ml) a sonikován (4 minut, 35 W, 0 °C, délka pulzu 30 s, 60 s pauza na chlazení). Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky a velké buněčné zbytky odstraněny centrifugací (20000 g, 4 °C, 20 minut).

Supernatant byl převeden do nových zkumavek a byl z něj odebrán vzorek na SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.)

#### 3.2.1.9. Purifikace C-konce CyaA afinitní chromatografií na Gluthation-Agarose

Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml Gluthation-Agarosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice

uchovávána. Poté byla ekvilibrována TNC pufrem (cca 100 ml). Supernatant z 3.2.1.8. byl přenesen na kolonu s Glutathion-Agarosou, kde došlo k zachycení C-konce CyaA pomocí GST-kotvy. Dále byla kolona několikrát promyta TNC pufrem. C-konec byl eluován roztokem redukovaného glutathionu (3 mg/ml). Během eluce bylo množství proteinu stanoveno metodou podle Bradfordové (10 µl eluovaného vzorku a 90 µl činidla Bradfordové).

Přítomnost a čistota získaného C-konce CyaA z Glutathion-Agarosy byla poté zjištěna pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.).

#### 3.2.1.10. Odstranění Glutathionu dialýzou

Vzorek C-konce CyaA byl uzavřen v dialyzačním střívku (cut-off 3000 Da) s TEV proteázou, která odštěpila GST-tag. Objem dialyzovaného vzorku ku dialyzačnímu pufru byl zvolen 1:2000. Dialýza probíhala za stálého míchání po dobu 12 -18 hodin při 4 °C. Vzorek byl centrifugován (28000 g, 10 min).

#### 3.2.1.11. Purifikace C-konce CyaA afinitní chromatografií na Ni-Sepharose

Chromatografická kolona byla naplněna 5 ml Ni-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění ethanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Poté byla ekvilibrována TN pufrem (cca 50 ml). Supernatant z kapitoly 3.2.1.10. byl nanesen na kolonu. V koloně byl zachytávána GST-tag s His-tagem a C-konec byl vymýván TNE pufrem do zkumavek. Množství peptidu v jednotlivých zkumavkách bylo stanoveno metodou podle Bradfordové (10 µl eluovaného vzorku a 90 µl činidla Bradfordové). Po třetím promytí TNE pufrem byla kolona promyta 5 ml TNE pufru s 30 mM imidazolem pro získání zbytku C-konce bez GST. Pro odstranění GST z kolony bylo použito 50 ml 200 mM imidazolu. Přítomnost a čistota získaného C-konce CyaA z Ni-Sepharosy byla zjištěna pomocí SDS-PAGE (kapitola 3.2.2.1.). Nejlepší eluční frakce (druhá až čtvrtá) byly smíchány a zahuštěny na centriconu Amicon (10000 Da cut-off). Konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové (kapitola 3.2.2.2.).



### 3.2.2. Stanovení vlastností a množství proteinu CyaA a jeho derivátů

#### 3.2.2.1. SDS-polyakrylamid elektroforéza

Ke 20  $\mu\text{l}$  proteinu bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  5krát koncentrovaného vzorkového pufru určeného pro elektroforézu v SDS-polyakrylamidovém gelu. Po zahřátí na 100 °C po dobu 5 minut byly takto připravené vzorky nanášeny na gel, sestávající se z horního 5 % zaostřovacího gelu a ze spodního 7,5 % rozdělovacího gelu. Po proběhnutí elektroforézy (8 V/cm<sup>2</sup> pro zaostřovací gel a 15 V/cm<sup>2</sup> pro rozdělovací gel) v Tris-glycinovém pufru (pH 8,3), byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělené proteiny byly vizualizovány barvicím roztokem pro SDS-PAGE s Coomassie Brilliant blue R-250 (mírné třepání, 20 °C). Poté byl rozdělovací gel odbarven v odbarvovacím roztoku pro SDS-PAGE (mírné třepání, 20 °C, 2 x 20 minut), promyt destilovanou vodou a vysušen v celofánové fólii. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností (PageRuler Unstained Protein Ladder).

#### 3.2.2.2. Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody podle Bradfordové (Bradford, 1976). Nejdříve byla v rozmezí 10–100  $\mu\text{g/ml}$  připravena série ředění BSA, který byl použit jako kalibrační standard. K ředění byl použit stejný pufr jako k přípravě měřeného vzorku. Poté bylo ke 100  $\mu\text{l}$  ředěných standardů, 100  $\mu\text{l}$  vzorku a 100  $\mu\text{l}$  samotného pufru (referenční standard) přidáno 900  $\mu\text{l}$  činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Absorbance série standardů a měřeného vzorku byla měřena proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm.

Nakonec byla sestrojena kalibrační křivka, z níž byla odvozena koncentrace proteinu ve vzorku.

#### 3.2.2.3 Příprava suspenze erytrocytů

2 ml beraní krve bylo pětkrát promyto TNC puftrem pomocí centrifugace (2000 x g, 4 °C, 1 minutu). Poté byly krvinky resuspendovány ve 20 ml TNC pufru. Bylo stanoveno množství krvinek a to tak, že 100  $\mu\text{l}$  suspenze krvinek bylo lyzováno 900  $\mu\text{l}$  TCT pufru a množství uvolněného hemoglobinu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 541 nm (z čehož bylo vypočítáno množství krvinek v

suspenzi). Suspenze krvinek, byla naředěna TNC pufrům tak, aby výsledná absorbance po přidavku TCT pufru byla 3,0, což odpovídá asi  $5 \times 10^8$  erytrocytů v 1 ml suspenze. Nakonec byl k takto připravené suspenzi červených krvinek přidán roztok  $\text{CaCl}_2$  tak, aby výsledná koncentrace vápenatých iontů byla 2 mM.

#### 3.2.2.4. Stanovení hemolytické aktivity proteinu

Do mikrozkušavky bylo odebráno 0,990 ml suspenze erytrocytů (kapitola 3.2.2.4.), k ní bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  CyaA o koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Směs byla promíchána a inkubována 5 hodin při teplotě 37 °C. Jako slepý pokus byl použit vzorek, který neobsahoval CyaA, ale obsahoval pouze samotné erytrocyty. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (2000 x g, 25 °C, 1 minuta). Supernatant obsahující uvolněný hemoglobin byl odebrán do spektrofotometrické kyvety. Absorbance při 541 nm byla stanovena proti slepému pokusu. Získané hodnoty absorbance byly přepočteny na koncentraci přidávaného toxinu a procentuelně vztaženy k maximální míře lyze krvinek, která byla určena lyzí 100  $\mu\text{l}$  suspenze krvinek v 900  $\mu\text{l}$  TCT pufru a měření množství uvolněného hemoglobinu spektrofotometricky měřením absorbance při vlnové délce 541 nm.

#### 3.2.3. Charakteristika fluorescenční sondy SBFI/AM

Fluorescenční sonda SBFI (Sodium binding benzofuran isophthalate) je jedna z prvních sond, které se používaly na zjištění změn vnitrobuněčné koncentrace sodných kationtů. Skládá se z chelatačního kruhu, do kterého se vážou sodné kationy, a dvou benzofuranisofthalátových skupin s fluorescenčními vlastnostmi navázaných na aza-skupiny chelatačního kruhu (Obr. 10) (Minta & Tsien, 1989; J R Lakowicz, 2006). SBFI je dostupná ve dvou formách. Jako tetraamonná sůl není schopná procházet buněčnou membránou. V acetoxymethylesterové (AM) formě je sonda SBFI schopná procházet membránou. AM forma SBFI je mimo buňky neutrální molekulou, která je schopná projít membránou prostou difuzí a má nízkou afinitu k iontům. Po vstupu do buňky všudypřítomné nespecifické esterázy rozštěpí esterové vazby a sonda získá záporný náboj a kyselý charakter. V tomto stavu z buňky neuniká a zároveň se zvýší afinita vazby sondy k sodným kationtům (Lakowicz, 2006).

Jak je patrné z Obr. 11 dochází při zvýšení koncentrace sodných kationtů k posunu

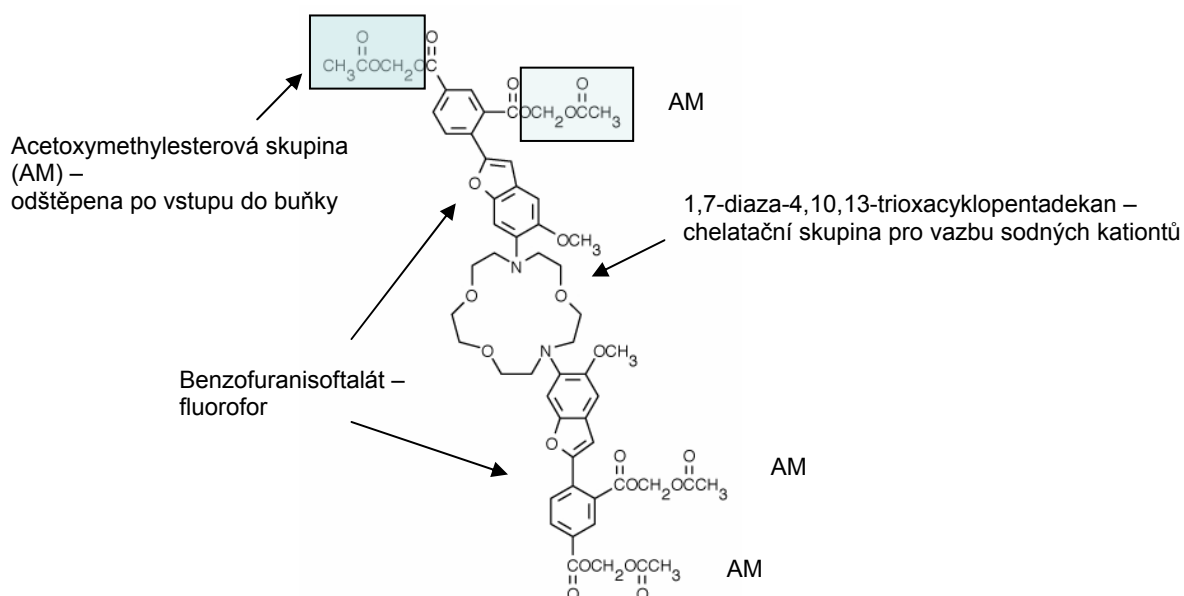
emisního maxima SBFI ke kratším vlnovým délkám a také ke zvýšení intenzity fluorescence. Toho se využívá k poměrovému měření, které je tak schopné zjistit aktuální změnu koncentrace sodných kationtů. Pro poměrové měření se volí vlnové délky, při kterých se změnou koncentrace sodných kationtů nejvíc mění intenzity fluorescence, v našem případě jsme zvolili 500/560 nm. Na Obr. 11 je vidět, že při změně koncentrace sodných kationtů dochází také ke změně tvaru excitačního spektra. Proto je možné zjišťovat koncentraci sodných kationtů i poměrovým měřením v excitačním spektru při vhodných vlnových délkách, v našem případě 345/385nm (Singer, et al., 1999). V případě zvyšování koncentrace sodných kationtů by se měly poměry intenzit při emisi 500/560 nm nebo excitaci 345/385 zvyšovat. Nevýhodou SBFI je excitace v UV oblasti, která má za následek velkou intenzitu autofluorescence buněk (Lakowicz, 2006).

Disociační konstanta ( $K_d$ ) ideální sondy pro sodné kationty by se měla pohybovat v oblasti 5 - 50 mM při pH 7 ve vodném prostředí. Sonda s takovou  $K_d$  by měla být schopna vázat sodné kationty s dostatečnou afinitou ve fyziologicky relevantních koncentracích (5 - 140 mM) dostatečně citlivě. Větší afinita by byla také nežádoucí, protože by sonda nebyla schopná reagovat na snižování koncentrace sodných kationtů. Ideální sonda pro sodné kationty by také měla mít dostatečně nízkou afinitu k ostatním fyziologicky relevantním iontům, aby při jejich fyziologických změnách koncentrace neovlivňovaly měření sodných kationtů. Taková sonda by měla vykazovat následující afinity pro ionty:  $K^+$  -  $K_d > 150$  mM (20-krát vyšší než pro sodné kationty),  $Mg^{2+}$  -  $K_d > 10$  mM,  $Ca^{2+}$  -  $K_d > 10$   $\mu$ M (Minta and Tsien, 1989). Biologicky relevantnější hodnoty  $K_d$  jsou získávány při měření v roztoku, který obsahuje směs sodných a draselných kationtů. Součet jejich koncentrace je udržován na hodnotě 135 mM a navíc je přítomno 1 mM  $Mg^{2+}$  a pH je udržováno na 7,05 - což odpovídá cytoplazmě buněk obratlovců. Sonda SBFI tyto podmínky splňuje (Tab. 1.) (Minta and Tsien, 1989).

ionty	Disociační konstanta (mM)				Na <sup>+</sup> v K <sup>+</sup> pH 7,05
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Mg <sup>+</sup>	Ca <sup>+</sup>	
SBFI	7,4	166	38	68	17-18

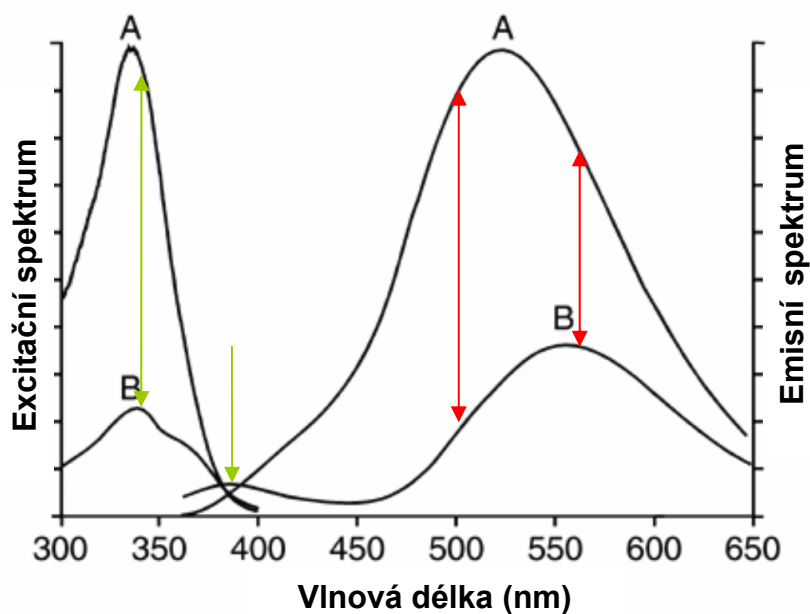
Tab. 1: Disociační konstanta pro sondu SBFI a fyziologicky relevantní ionty. SBFI bylo rozpuštěno v 0,1 M tetramethylammonium chloridu. Na<sup>+</sup> v K<sup>+</sup> označuje hodnotu disociační konstanty pro Na<sup>+</sup> s pozadím K<sup>+</sup>:  $[Na^+] \times [K^+] = 135$  mM při pH 7,05; převzato: (Minta and Tsien, 1989).

### Struktura SBFI/AM



Obr. 10: Struktura sondy SBFI/AM, převzato: <http://probes.invitrogen.com/media/structure/897.jpg> a upraveno.

### Spektrum SBFI/AM



Obr. 11: Emisní a excitací spektrum sondy SBFI/AM při koncentraci  $\text{Na}^+$  A: 145 mM; B: 0 mM; vlnové délky zvolené pro poměrové měření v emisí 500/560 nm (červené šipky) ; vlnové délky zvolené pro poměrové měření v excitaci 345/385 nm (zelené šipky) převzato: <http://probes.invitrogen.com/media/spectra/1262na.jpg> a upraveno.

### 3.2.4. Charakteristika fluorescenční sondy Sodium Green

Fluorescenční sonda Sodium Green (SG) byla vyvinuta pro stanovení koncentrace sodných kationtů stejně jako SBFI. Narozdíl od SBFI nevykazuje SG významný posun emisního maxima (Obr. 13). Při zvýšení koncentrace sodných kationtů, u ní ale dojde k prodloužení doby dohasínání z 1,13 ns při 0mM koncentraci sodných kationtů až na 2,39 ns při 144mM koncentraci sodných kationtů (Szmackinski and Lakowicz, 1997).

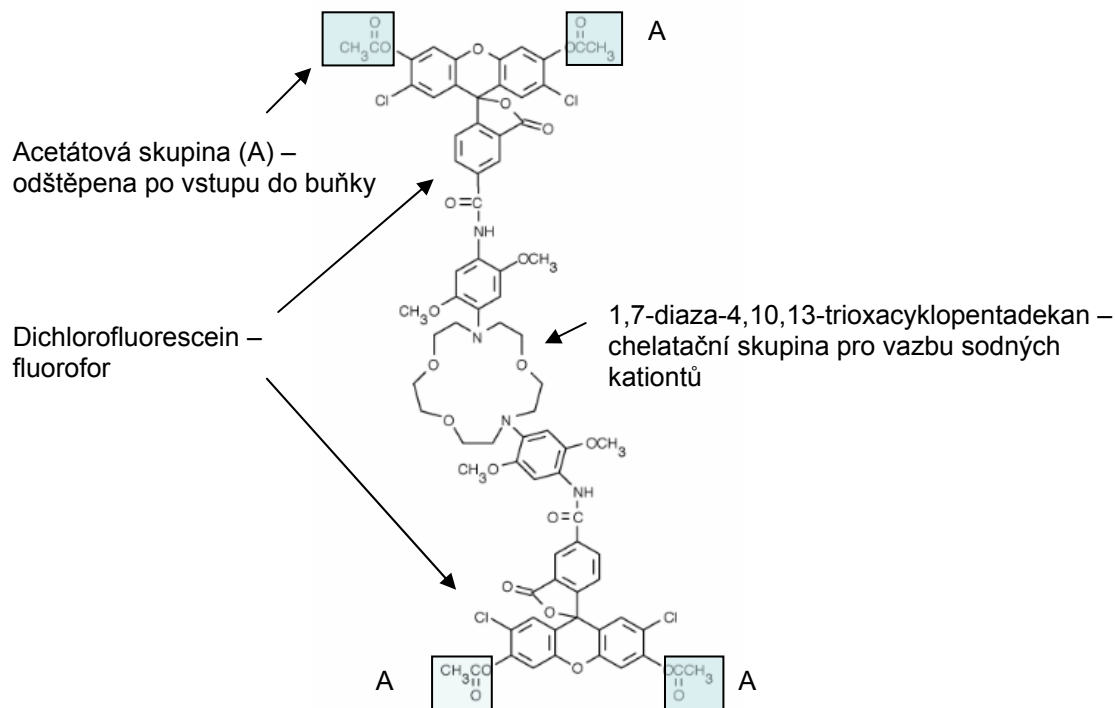
Struktura SG je podobná SBFI. Skládá se z chelatačního kruhu, do kterého se vážou sodné kationy (Minta and Tsien, 1989), a dvou dichlorofluoresceinových skupin s fluorescenčními vlastnostmi navázaných na aza-skupiny chelatačního kruhu (Obr. 12) (Lakowicz, 2006; Szmackinski and Lakowicz, 1997). SG je dostupná ve dvou formách. Ve formě tetraamonné soli neschopné procházet buněčnou membránou a v tetraacetátové (TA) formě schopné procházet membránou. TA forma SG je obdobná AM formě SBFI: je neutrální a prochází buněčnou membránou a po odštěpení acetátů v buňce z cytosolu neuniká a váže s vyšší afinitou sodné kationty.

Disociační konstanta SG pro sodné kationty je dostatečná pro selektivní měření sodných kationtů za fyziologických podmínek (Tab. 2) (Minta and Tsien, 1989).

ionty	Disociační konstanta (mM)	
	Na <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup> v K <sup>+</sup>
SG	6	21

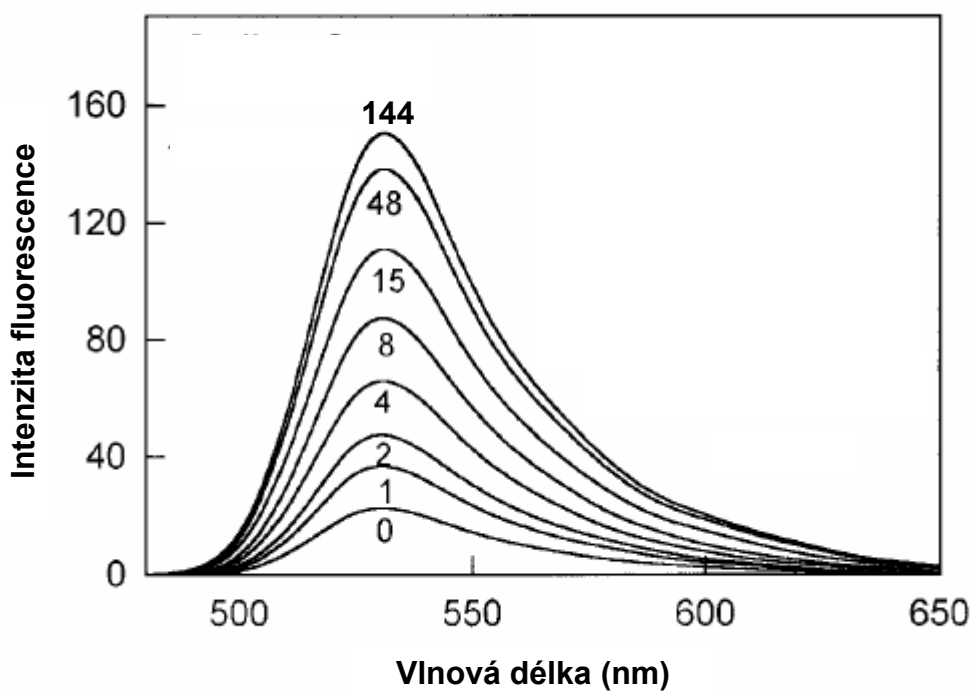
Tab. 2: Disociační konstanta pro sondu SG a sodné ionty. Na<sup>+</sup> v K<sup>+</sup> označuje hodnotu disociační konstanty pro Na<sup>+</sup> s pozadím K<sup>+</sup>:  $[Na^+] \times [K^+] = 135 \text{ mM}$  převzato: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp06900.pdf>

### Struktura Sodium Green/TA



Obr. 12: Struktura sondy SBF1/TA, převzato: <http://probes.invitrogen.com/media/structure/2458.jpg> a upraveno.

### Emisní spektrum Sodium Green při titraci Na<sup>+</sup>



Obr. 13: Emisní spektra sondy Sodium Green při excitaci 507 nm při zvyšující se koncentraci sodných kationtů (hodnoty koncentrace pod jednotlivými křivkami v mM), převzato: (Szmacinski and Lakowicz, 1997) a upraveno

### 3.2.5. Měření vstupu sodných kationů do buňky

#### 3.2.5.1. Příprava a barvení SBFI/AM buněk pro měření

Krycí skla na mikroskopii (22x22 mm) byla rozpůlena diamantovým nožem, aby se vešla do kyvety pro fluorescenční měření, omyta v ethanolu a sterilována v sušárně při 140 °C po dobu 3 hodin.  $3 \times 10^5$  J774A.1 buněk na takto připravených sklech v 6-ti jamkových destičkách (1 sklo/jamku) v RPMI médiu bylo inkubováno v CO<sub>2</sub> inkubátoru (5 % hladina CO<sub>2</sub>, 37 °C) přes noc. RPMI médium je fluorescenční měření nevhodné, protože obsahuje barevné indikátory pro zjišťování dostatku živin v médiu a k jeho pufování je nutný CO<sub>2</sub> (5%). Médium tedy bylo vyměněno za HBSS médium (bezfosfátové médium, pH 7,4). K buňkám byla přidána fluorescenční sonda SBFI/AM, která byla rozpuštěna v roztoku 12,5 % (w/w) Pluronic F-127, finální koncentrace tedy byla 5 μM SBFI/AM a 0,0125% (w/w) Pluronic F-127. Inkubace buněk se sondou probíhala potmě 45 minut (25 °C). SBFI/AM sonda vstupuje do buňky, je zde štěpena buněčnými esterázami a stává se membránově neprostupnou, takže z buňky neuniká.

#### 3.2.5.2. Měření emisního spektra buněk obarvených SBFI/AM

Emisní spektrum buněk obarvených SBFI/AM bylo měřeno při excitaci 340 nm na spektrofluorometru Flouromax-3 (záznam pomocí softwaru DataMax). Integrační čas byl 0,2 s a spektrum bylo měřeno v rozsahu emisního spektra SBFI (viz Obr. 11) 390-590 nm, nebo 390-650 nm. Při měření byl používán optický filtr 410 nm, který nepropouští kratší vlnové délky než 410 nm – tzv. „long pass“.

#### 3.2.5.3. Měření poměru emisních vlnových délek buněk obarvených SBFI/AM

Vstup sodných iontů do buněk byl měřen na spektrofluorometru FluoroMax-3 jako poměr emisních vlnových délek 560 a 500 nm (kapitola 3.2.5.) při excitaci 340 nm (software DataMax). Měření bylo prováděno ve 25 °C, v 1 cm kyvetě a pozorovaná plocha preparátu byla asi 10 mm<sup>2</sup>, takže signál byl přibližně z 10<sup>4</sup> buněk.

#### 3.2.5.4. Příprava a barvení Sodium Green/TA buněk pro měření

Krycí skla na mikroskopii (22x22 mm) byla rozpůlena diamantovým nožem, aby se vešla do kyvety pro fluorescenční měření, omyta v ethanolu a sterilizována v peci při 140 °C po dobu 3 hodin.  $3 \times 10^5$  J774A.1 buněk na takto připravených sklech v 6-ti jamkových destičkách (1 sklo/jamku) v RPMI médiu bylo inkubováno v CO<sub>2</sub> inkubátoru (5 % hladina CO<sub>2</sub>, 37 °C) přes noc. Médium bylo vyměněno za HBSS médium (bezfosfátové médium, pH), protože RPMI medium ovlivňuje fluorescenční signál přítomností barevných indikátorů. K buňkám byla přidána fluorescenční sonda SG/TA, která byla rozpuštěna v roztoku 13 % (w/w) Pluronic F-127, finální koncentrace tedy byla 2 μM SG/TA a 0,013% (w/w) Pluronic F-127. Inkubace buněk se sondou probíhala potmě 30-40 minut (25 °C). TA forma sondy vstupuje do buňky, je zde štěpena buněčnými esterázami a stává se membránově neprostupná, takže z buňky neuniká.

#### 3.2.5.5. Měření doby dohasínání sondy Sodium Green

Doba dohasínání SG byla měřena na spektrofluorometru FluoroMax-3 s použitím modulu FluoroHub pro TCSPC metodu (z angl. Time-correlated Single photon counting). Excitováno bylo pulzní diodou NanoLED-460 s opakovací frekvencí 1 MHz. Data byla ukládána do 2048 kanálů (111 ps na kanál). Měření trvalo 60 vteřin s minimálními časovými intervaly mezi měřeními. Na snímání dat byl použit program DataStation v2.5 a na návržení a dekonvoluci multiexponenciálních modelů (dvou a tříexponenciálních) naměřených signálů byl použit software DAS6 v6.4 (oba od Horiba Jobin Yvon).

Naším cílem bylo získat střední doby dohasínání  $\tau$ , k nimž by se po naměření titračních křivek přiřadily reálné hodnoty koncentrace sodných kationtů. Střední doba dohasínání byla zvolena kvůli vzdáleným hodnotám  $\tau$  dvou a tříexponenciálního modelu. Kalibrace měla být měřena v 50 mM HEPES, pH 7,2 s různou koncentrací octanu sodného a octanu draselného tak, aby výsledná koncentrace kationtů byla 145 mM. Zároveň měla být permeabilizována buněčná membrána buněk 3 μM valinomycinem a nigericinem po dobu 30ti minut, aby se sonda SBFI/AM dostala do buněk, kde se díky nespecifickým esterázám zvyšuje její afinita k Na<sup>+</sup> iontům a díky jejich vazbě na sondu se zvyšuje její intenzita fluorescence. Vzhledem k získaným výsledkům (kapitola 4.1.) jsme ji nakonec neměřili.



Pro výpočet průměrné doby dohasínání  $\tau$  z modelů našich multiexponenciálních signálů získaných softwarem DAS6 v6.4 byla použita rovnice:

$$\tau = \sum_i f_i * \tau_i ,$$

kde frakční příspěvek  $f_i$  je:

$$f_i = \frac{\alpha_i * \tau_i}{\sum_i \alpha_i * \tau_i}$$

a kde  $\tau_i$  je doba dohasínání dané frakce fluoroforu a  $\alpha_i$  poměrné zastoupení intenzit daných frakcí fluoroforu (Lakowicz, 2006; Szmecinski and Lakowicz, 1997). Frakční příspěvek  $f_i$  určuje jakou intenzitou přispívá frakce o dané době dohasínání k celkové intenzitě vzorku (Lakowicz, 2006).

### **3.2.6. Ověření vstupu sondy SBFI-AM do makrofágů J774.1 na fluorescenčním mikroskopu Cell<sup>R</sup>**

Při měření na fluorescenčním spektrometru měla získaná data vysokou intenzitu fluorescence pozadí. Měřením na mikroskopu jsme chtěli zjistit, zda sonda SBFI/AM vstupuje do buněk a dále potvrdit vstup sodných kationtů do buněk makrofágů J774A.1.

Preparát na mikroskopii byl připraven stejným způsobem, jako na měření spektrofluorometrem (kapitola 3.2.7.1.). Barvení preparátu bylo oproti kapitole 3.2.7.1. upraveno. Koncentrace sondy SBFI/AM v barvicím roztoku byla 5  $\mu$ M a doba inkubace byla 75-100 minut.

Buňky byly sledovány fluorescenčním mikroskopem (Olympus IX 81, Cell<sup>R</sup> Imaging Station (objektiv 20x/0.75NA UPlanSApo). Byla sledována změna intenzity při 505 nm v čase při střídavé excitaci vlnovými délkami 345 nm a 385 nm každé dvě sekundy.

K vzorkům byl po určité době přidán toxin CyaA v koncentraci 3  $\mu$ g/ml. Toxin CyaA byl kvůli lepšímu promíchání předředěn do 0,5 ml HBSS media. Jako negativní kontrola byl použit roztok močoviny, jejíž koncentrace odpovídala koncentraci obsažené v přidávaném roztoku toxinu.

### 3.2.7. Ověření vstupu sondy Sodium Green do buňky na konfokálním mikroskopu

#### Leica

Při měření na fluorescenčním spektrometru získané doby dohasínání po dekonvoluci neodpovídaly dobám dohasínání uváděných v literatuře (Szmecinski and Lakowicz, 1997). Měřením na mikroskopu jsme chtěli zjistit, zda sonda SG/TA vstupuje do buněk makrofágů J774A.1.

Preparát na mikroskopii byl připraven stejným způsobem, jako na měření fluorescenčním spektrometrem (kapitola 3.2.7.4.).

Buňky byly sledovány konfokálním mikroskopem Leica TCS SP2, (objektiv 63x/1.4 NA, HCX PL APO, olejová imerze).

Excitační vlnová délka byla 458 nm a 488 nm. Excitační vlnová délka 488 nm je vhodnější a blíží se více excitačnímu maximu SG. Excitační vlnová délka 458 nm byla ovšem bližší nastavení měření v časovém rozlišení, které bylo limitováno dostupnými diodami nanoLED.

### 3.2.8. Ověřování oligomerizace CyaA pomocí FRET měřeného v časovém rozlišení

#### 3.2.8.1. Fluorescenční rezonanční energetický přenos

Fluorescenční (Försterův) rezonanční energetický přenos (FRET) existuje mezi dvěma molekulami, a sice donorem - molekulou v excitovaném stavu a akceptorem - molekulou v základním energetickém stavu. Donor emituje v kratších vlnových délkách než akceptor a jeho emisní spektrum se překrývá s absorpčním spektrem akceptoru. Energetický přenos probíhá bez vyzáření fotonu a jedná se o interakci dipól-dipól na dlouhou vzdálenost. FRET se často využívá na měření vzdálenosti v rámci jedné makromolekuly nebo mezi dvěma molekulami, protože mimo jiné závisí na vzdálenosti mezi donorem a akceptorem. 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:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D},$$

kde  $\tau_{DA}$  je doba dohasínání donoru v přítomnosti akceptoru a  $\tau_D$  je doba dohasínání donoru bez přítomnosti akceptoru.

Vzdálenost ve které je  $E = 50\%$  se nazývá Försterova vzdálenost  $R_0$  (Lakowicz, 2006).

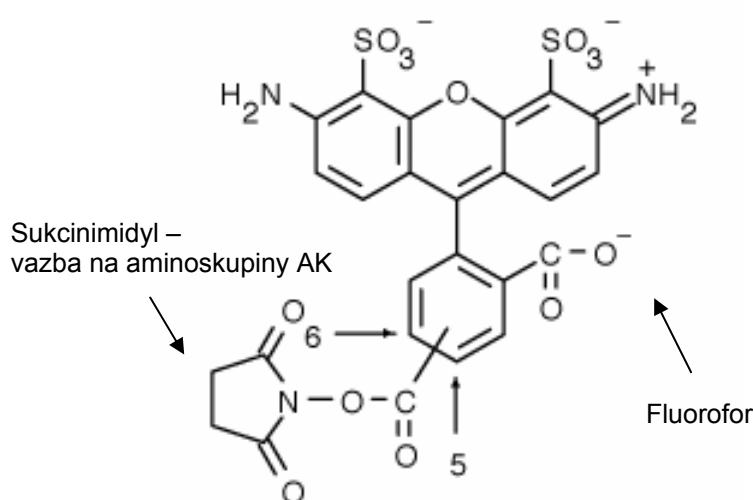
Chtěli jsme využít FRET jako důkaz pro oligomerizaci toxinu v roztoku, na lipozomech nebo na membráně. Pokud by toxin oligomerizoval, bylo by možné v našem měření FRET prokázat. Zvolili jsme sondy Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 594, kterými byl toxoid CyaA-detox kovalentně označen (kapitola 3.2.8.3.). CyaA-detox (kapitola 3.1.7.) má pouze hemolytickou aktivitu. Oligomerizace se předpokládá právě u prekurzoru, který tvoří hemolytický kanál v membráně napadené buňky, a také se předpokládá, že AC-translokující prekurzor je v kompetitivním vztahu k hemolytickému prekurzoru (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). Díky substituční mutaci je u CyaA-detox inhibována konverze ATP na cAMP uvnitř eukaryotických buněk, a CyaA-detox tedy nezabíjí cílové buňky, které pak vydrží déle.

### 3.2.8.2. Charakterizace sondy Alexa Fluor 488 a Alexa Fluor 594

Alexa Fluor je komerční sonda vyvinutá pro značení proteinů a DNA. V aminovazebné formě, v našem případě sukcinimidylester derivátu, se váže na koncové  $\alpha$ -aminoskupiny peptidů nebo na aminoskupiny bazických AK (lysin, arginin, histidin).

Alexa Fluor 488/SE (Obr. 14) má podobné emisní i excitační spektrum jako fluorescein a na rozdíl od něj je mnohem odolnější vůči vybělování. Fluorescence A488/SE je na pH nezávislá v rozmezí pH 4 - 10, zatímco u fluoresceinu je fluorescence pH závislá (Martin, 1975).

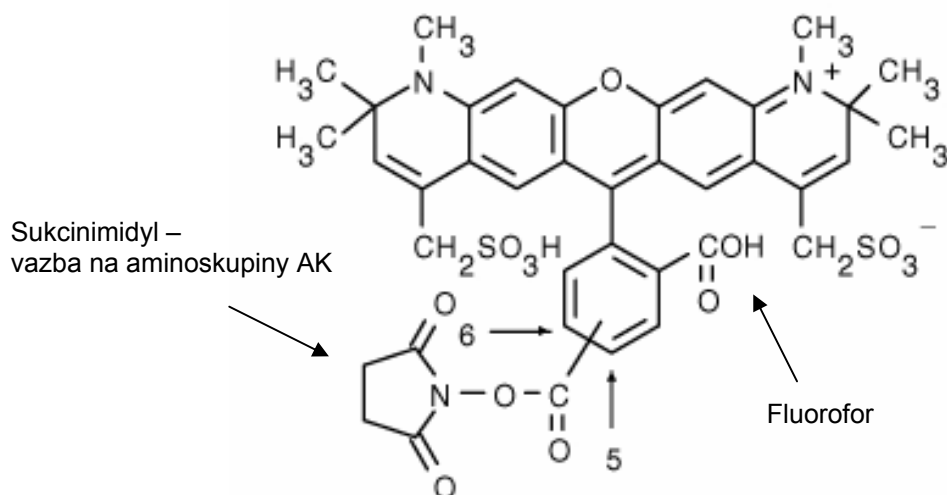
#### Struktura sondy Alexa Fluor 488/SE



Obr. 14: Struktura sondy A488/SE převzato: <http://probes.invitrogen.com/media/structure/3630.jpg> a upraveno.

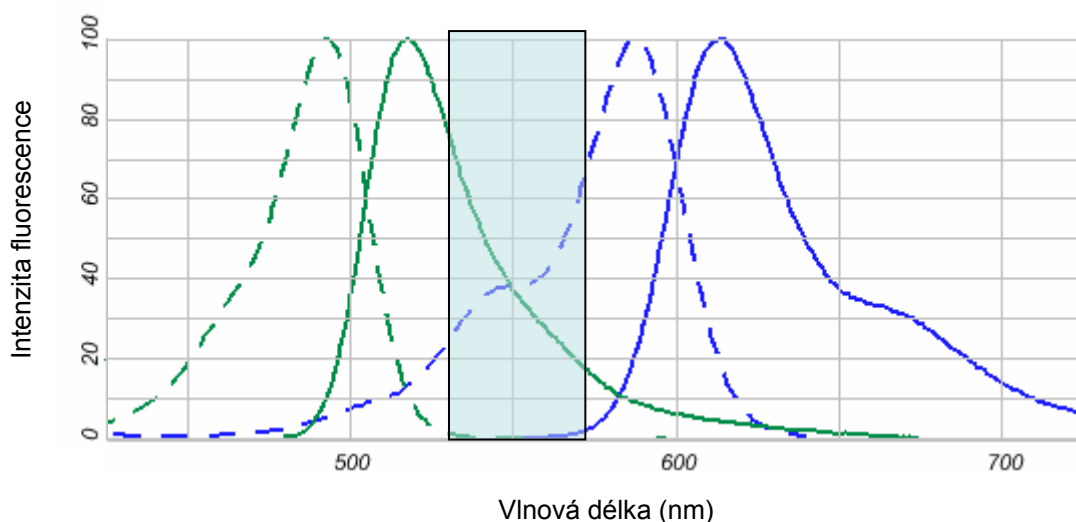
Alexa Fluor 594/SE (Obr. 15), emituje oblasti 580 – 710 nm s emisním maximem okolo 610 nm vykazuje vysokou odolnost vůči vybělování.

### Struktura sondy Alexa Fluor 594/SE



Obr. 15: Struktura sondy A488/SE převzato: <http://probes.invitrogen.com/media/structure/3634.jpg> a upraveno.

Díky překryvu emisního spektra A488 s excitačním spektrem A594 (Obr. 16) se dají tyto dvě sondy použít pro měření Fluorescenčního rezonančního energetického přenosu (FRET). Försterova vzdálenost pro A488 jako donor a A594 je asi 6 nm (Haugland, 2002; Wu and Brand, 1994).



Obr. 16: Excitační (přerušovaná čára) a emisní (plná čára) spektrum sondy A488 (zeleně) a A594 (modře). Světle modrý obdelník zvýrazňuje překryv emisního spektra A488 (donoru) a excitačního spektra A594 (akceptoru). Převzato: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html> a upraveno.

### 3.2.8.3. Barvení sondou Alexa Fluor

Barvení CyaA-detox probíhalo v posledním kroku purifikace CyaA na Phenyl-Sepharose (kapitola 3.2.1.7.). CyaA-detox byl barven 60 minut sondami Alexa Fluor 488/SE (A488) a Alexa Fluor 594/SE (A594) v 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,3 při teplotě 20 °C. Molární poměr protein:sonda byl přibližně 1:4. Nenačnaná sonda byla opláchnuta T pufrem, a označené toxoidy byly z Phenyl-Sepharosy eluovány TUE-A pufrem. Byly vytvořeny tři různě barvené varianty:

CyaA-detox-A488: barveno A488 (měření průměrné doby dohasínání donoru)

CyaA-detox-A594: barveno A594 (akceptor při FRET, přidával se k CyaA-detox-A488 a v případě oligomerizace CyaA-detox-A488 s CyaA-detox-A594 by měla být zkrácena doba dohasínání donoru CyaA-detox-A488)

CyaA-detox-A488/594: barveno A488 a A594 (pozitivní kontrola, měl by probíhat maximální FRET).

### 3.2.8.4. Měření oligomerizace pomocí FRET v časové rozlišení

Doba dohasínání A488 nebo A 488/594 byla měřena na spektrofluorometru FluoroMax-3 s použitím FluoroHub pro TCSPC metodu (z angl. Time-Correlated Single Photon Counting). Vzorek byl excitován pulzní diodou NanoLED-460 s opakovací frekvencí 1 MHz. Vlnová délka emisního monochromátoru byla 505 nm. Kvůli přesahu spektra diody do delších vlnových délek byl v excitační dráze použit filtr nepropouštějící delší vlnové délky než 490 nm – tzv. „short pass“. V emisní dráze byl „long pass“ filtr 490 nm. Do květy s pufrem nebo lipozomy nebo membránami makrofágů J774A.1 byl přidáván obarvený toxoid CyaA-detox-A488 (donor), nebo CyaA-detox-A488/594 (pozitivní kontrola) do výsledné koncentrace 3 µg/ml. Jako pozadí byl měřen samotný pufr/lipozomy/membrány makrofágů J774A.1. K donoru (CyaA-detox-A488) byl přidáván akceptor (CyaA-detox-A594) do výsledné koncentrace 3 µg/ml nebo 6 µg/ml. Po přidání kteréhokoli toxoidu se vždy okamžitě měřilo v několika opakováních.

Data byla ukládána do 2048 kanálů (111 ps na kanál). Měření trvalo 60 vteřin s minimálními časovými intervaly mezi měřeními. Na snímání dat byl použit program DataStation v2.5, na export dat a odečtení pozadí byl použit software Das6 v6.4 (oba od Horiba Jobin Yvon) a pro prokládání exponenciálních funkcí (tzv. „tail fitting“) byl použit software Fityk 0.8.6.

Výsledky měření byly multiexponenciální (Obr. 17 A). Naše vyhodnocení se však

soustředilo na relativní dobu dohasínání života A488, kterou jsme získali prokládáním histogramem dohasínání naměřeným signálem. Úsek začínal u 15 kanálu (1,76 ns) za maximem signálu, čímž se eliminovaly velmi krátké doby dohasínání a pokračoval 80 – 150 kanálů od počátků, podle celkové intenzity signálu, aby nezasahoval do šumu signálu (Obr. 17 C). Pozadí signálu bylo určeno za úsekem dohasínání bez zjevného příspěvku fluorescence (mezi kanály 1000 - 1500 kanálů) (Obr.: 17 B). Exponenciála byla definována takto:

$$y = a * \exp\left(\frac{-(x)}{\tau_r}\right) + s, \text{ kde}$$

$a$  byla maximální amplituda signálu,  $x$  byla okamžitá hodnota signálu,  $\tau_r$  relativní doba dohasínání A488 a  $s$  hodnota šumu určená proložením konstanty šumovými daty (úsek 1000 – 1500 kanálů) ( Obr. 17 B).

Relativní efektivita FRETu byla pro jednotlivá prostředí (TNE pufr, lipozomy, nebo membrány makrofágů J774A.1) určena mírou maximálního FRET, který byl získán měřením dvojité značeného toxoidu CyaA-detox-A488/594, který měl zároveň navázán A488 (donor) i A594 (akceptor).

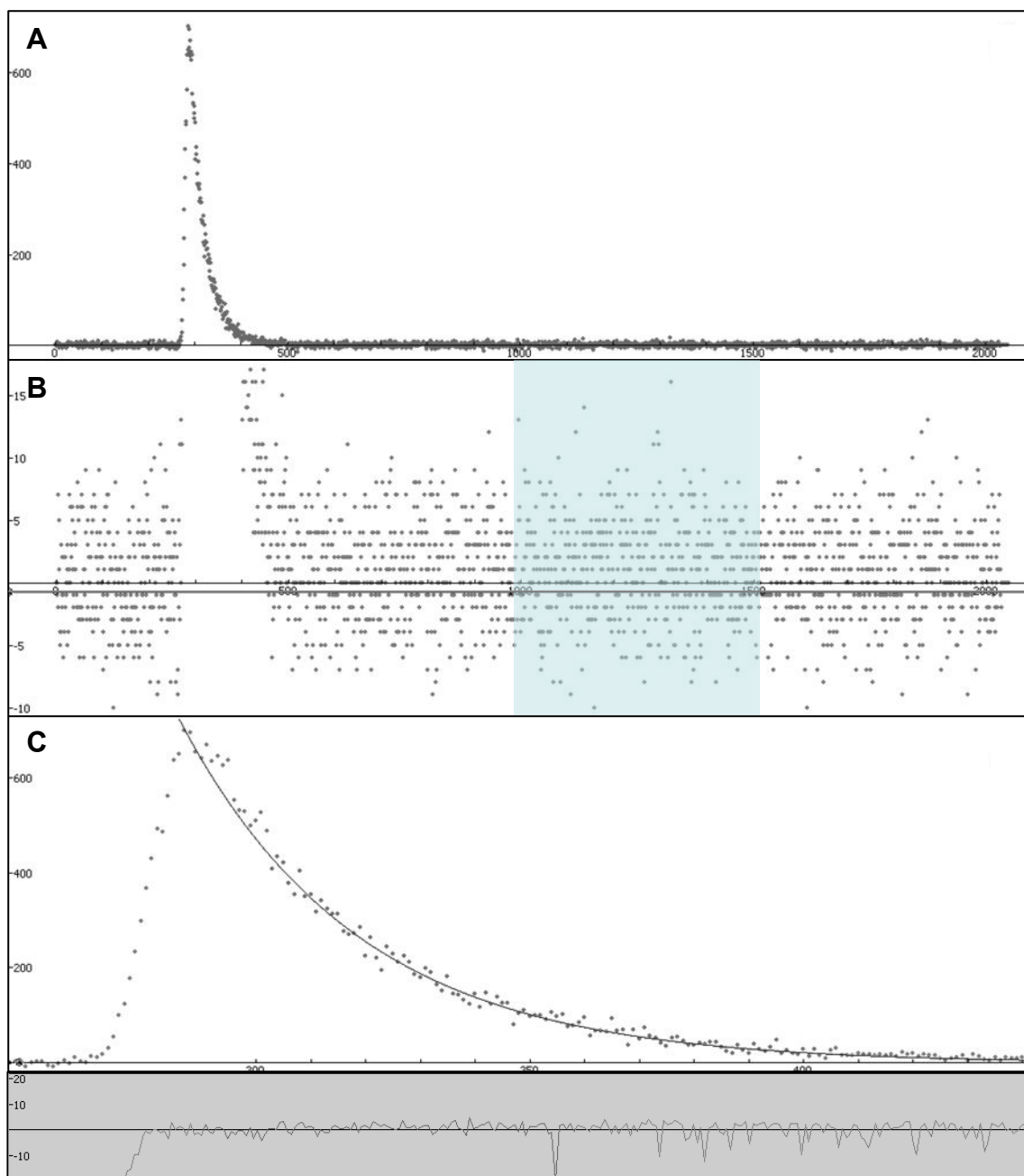
Relativní efektivita FRETu  $E_r$  byla definována jako:

$$E_r = \left( \frac{\tau_r(A488) - \tau_r(A488 + A594)}{\tau_r(A488) - \tau_r(A488 / A594)} \right) * 100\%, \text{ kde}$$

$\tau_r(A488)$  je relativní doba dohasínání samotného donoru (CyaA-detox-A488),

$\tau_r(A488/A594)$  je relativní doba dohasínání donoru v přítomnosti akceptoru navázaném na stejné molekule - v dostatečné blízkosti pro FRET (CyaA-detox-A488/A594) a

$\tau_r(A488+A594)$  je relativní doba dohasínání donoru (CyaA-detox-A488) s přidaným akceptorem na jiné molekule toxoidu (CyaA-detox-A594).



Obr. 17: Postup zpracování dat z měření FRET v časovém rozlišení v programu Fityk. A – naměřená data; B – vodorovná přímka proložená signálem pozadí (kanál 1000-1500 označen modrým obdelníkem); C – data proložená exponenciálou pro získání doby dohasínání A488 s rezidui.

### 3.2.8.5. Příprava lipozomů

Bylo naváženo 10 mg příslušného fosfolipidu (nebo jejich směsi), které byly dále kvantitativně přeneseny do čisté skleněné zábrusové roztřepávací zkumavky s 1 ml chloroformu. Chloroform byl odpařen proudem plynného dusíku (asi 15 minut). Tím vznikla na stěně zkumavky tenká vrstva lipidů. K té bylo přidáno 2 ml TNE pufru s 2mM

CaCl<sub>2</sub>, ve kterém se později měřily fluorescenční pokusy.

Vzorek byl intenzivně třepán při opakovaném zahřívání na 40 až 60°C dokud nedošlo ke smytí veškerého lipidu ze stěn zkumavky (30-40 minut). Tím se ve vzorku vytvořily velké mnohvrstevné lipozomy. Koncentrace lipozomů byla přibližně 2 mg/ml. Z této zásobní suspenze byly odebírány a ředěny vzorky pro další měření. Zásobní suspenze byla skladována při 4°C maximálně 3 dny.

#### 3.2.8.6. Hrubá izolace membrán makrofágů J774.1

Buňky makrofágů J774A.1, vyseté na Petriho miskách do RPMI media umístěných v CO<sub>2</sub> inkubátoru (5 % hladina CO<sub>2</sub>, 37 °C), byly opláchnuty PBS a seškrabáním přeneseny do centrifugační zkumavky a centrifugovány (1100 x g, 25 °C, 5 minut). Poté byl pelet s buňkami resuspendován v Tris-HCl (1M, pH 7,4) s přidanými inhibitory proteáz. Suspenze byla zmražena tekutým dusíkem a ihned rozmražena. Tento postup byl opakován dvakrát. Vzniklá směs membrán a cytozolu byla desetkrát protažena přes tenkou jehlu a centrifugována (2000 g, 25 °C, 5 minut). Poté byl supernatant znovu centrifugován (2000 x g, 25 °C, 5 minut), aby došlo k odstranění buněk, které nebyly lyzovány a velkých buněčných zbytků (DNA, proteiny). Supernatant byl poté znovu centrifugován (3300 x g, 25 °C, 5 minut). V peletu byly získané koncentrované membrány.



## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Tok sodíku přes membránu myších makrofágů J774.1 působením CyaA

#### 4.1.1. Měření vstupu sodných kationů do buněk makrofágů způsobených CyaA pomocí fluorescenční sondy SBFI/AM

Adenylát-cyklázový toxin mimo jiné způsobuje změnu napětí na membránách. Bylo potvrzeno, že adenylát-cyklázová doména způsobuje vstup vápenatých kationtů do hostitelských buněk s CD11b/CD18 integrinem (Fiser, et al., 2007), který je receptorem pro CyaA (Guermontprez, et al., 2001). Dále bylo zjištěno že hemolyzinová doména CyaA způsobuje únik draselných kationtů z buněk s CD11b/CD18 integrinem (Pospisilova, 2010). Mým úkolem bylo zjistit, zda a jakým mechanismem CyaA ovlivňuje tok sodných kationtů, přes membránu buněk se CD11b/CD18 integrinem. Sodné kationty jsou dalším klíčovým iontem při tvorbě membránového potenciálu, který je zásadním faktorem pro mnoho buněčných dějů. Sodné kationty mají koncentraci vně buněčné membrány eukaryotních buněk asi 12 krát vyšší než uvnitř buňky, proto jsme předpokládali, že bude po interakci CyaA s membránou docházet ke vstupu sodných kationtů do buněk. Sodné kationty mají stejně jako draselné kationty jeden kladný náboj na jeden atom, proto jsme předpokládali, že mechanismus jejich vstupu do cytozolu buněk bude podobný, jako mechanismus úniku draselných iontů, tedy přes hemolyzinový kanál.

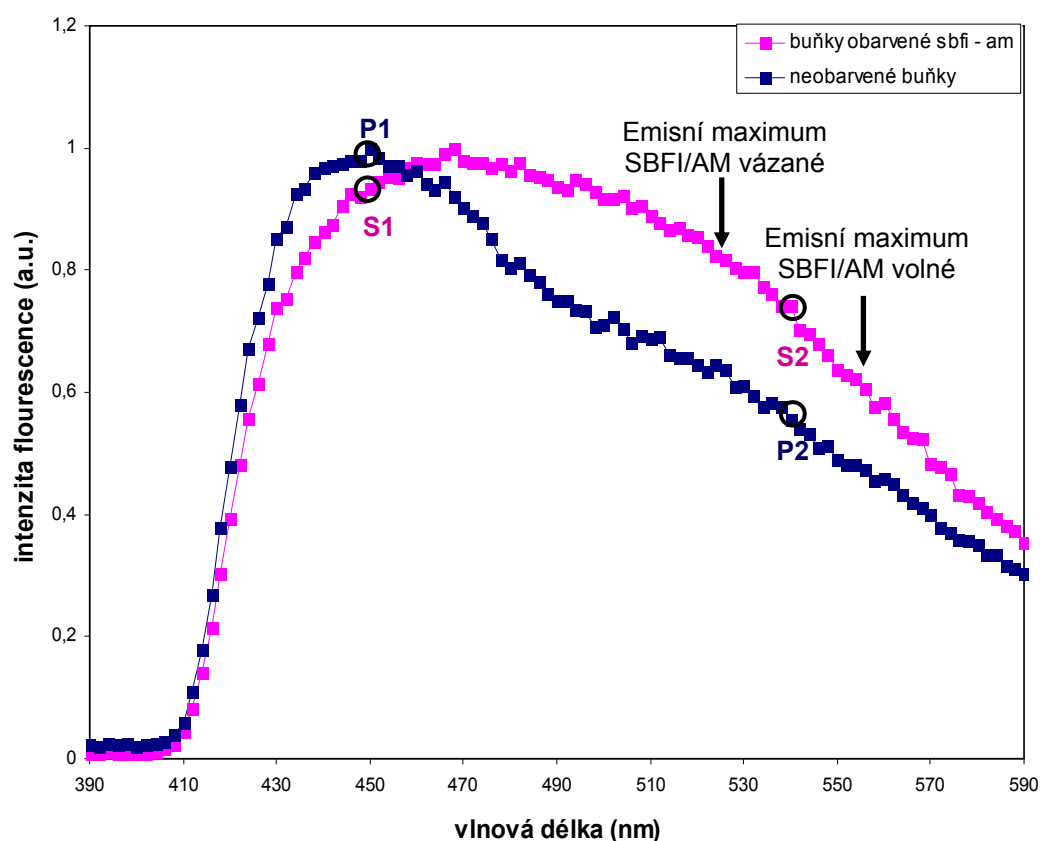
Pomocí poměrového fluorescenčního měření fluorescenční sondy SBFI, která váže sodné kationty (kapitola 3.2.7.3.) mělo být možno určit změnu intracelulární koncentraci sodných kationtů a také stanovit její změnu v důsledku působení CyaA na membránu. Před samotným měřením poměru emisních vlnových délek v čase, kterým je možno sledovat změnu koncentrace sodných kationtů, se vždy měří emisní i excitační spektrum pro kontrolu dostatečného obarvení buněk J774A.1 sondou SBFI/AM. Pro barvení makrofágů J774A.1 jsme použili postup 3.2.5.1, který byl optimální pro sondu PBFI/AM, která je SBFI/AM příbuzná. Sonda PBFI/AM byla vyvinuta pro měření koncentrace draselných kationtů a její změny a byla použita na buňkách J774A.1 pro měření úniku draselných kationtů z buněk po opůsobení CyaA (Pospisilova, 2010). V našem případě ale barvení myších makrofágů J774A.1 sondou SBFI/AM nebylo dost efektivní (Obr. 18) Intenzita fluorescence sondy nepřevyšovala intenzitu fluorescence pozadí nebo byla vyšší jen o

jednotky procent.

Odečtení pozadí bylo komplikované. Nebylo možné měřit buňky neobarvené a obarvit je a poté je změřit znovu. UV záření, kterým se SBFI excituje, totiž snižuje životnost buněk a ty umírají a pouští se ze skla, takže se pozadí během měření mění. Samotné barvení buněk snižuje jejich odolnost a může tak způsobit jejich snadnější usmrcení UV zářením. Jednou z možností, jak se vyrovnat s korekcí na fluorescenci neznačených buněk bylo současné poměrové měření makrofágů J774A.1 obarvených SBFI/AM pod vlivem CyaA a měření intenzity fluorescence tryptofanu. Fluorescence tryptofanu by mohla odrážet změnu počtu buněk na sklíčku během měření. Ovšem změny intenzity fluorescence tryptofanu nemusí přesně vypovídat o změně autofluorescence v oblasti emise SBFI (může zde být např. různá rychlost vybělování). Musí se uvažovat i o tom, že buňky obarvené a atakované toxinem, tedy buňky relevantní pro naše zkoumání, během měření spíše dříve zahynou a uvolní se ze sklíčka, než buňky které nejsou obarvené, nebo buňky, na které se toxin nenaváže. Během poměrového měření a odčítání takto získaného pozadí může tedy docházet k deformacím spektra, které mohou ovlivnit poměrové měření, zvláště tehdy, když už na počátku měření je intenzita fluorescence sondy tak nízká vzhledem k intenzitě fluorescence buněk.

Pokud bychom znali přesný tvar spektra sondy SBFI/AM mohly bychom se pokusit definovat tvar pozadí odfiltrování fluorescence SBFI/AM po vstupu do buňky. Přesný tvar spektra sondy SBFI/AM v buňkách ovšem není možné naměřit mimo ně, protože sonda SBFI ve své acetoxymethyl formě nemá vysokou intenzitu fluorescence a navíc má mnohem nižší afinitu k sodným iontům. Je třeba buněčných esteráz, které odštípnou acetoxymethylovou skupinu, a způsobí tak neprostupnost sondy membránou a zvýší afinitu sondy k sodným kationtům.

### normalizovaná emisní spektra



Obr. 18: Emisní spektrum neobarvených buněk a buněk obarvených SBFI/AM (4,5  $\mu$ M). Spektrum je normalizované na maximum a měřené s použitím filtru 410 nm (long pass). Popisky P1, P2, S1, S2 jsou proměnné ze vzorce pro podíl intenzit  $R_s$  viz kapitola 4.1.2.

Znamenalo to pro nás, že samotnou kinetiku nemá smysl měřit, dokud neoptimalizujeme barvení tak, aby fluorescence buněk obarvených SBFI/AM převyšovala fluorescenci neobarvených buněk natolik, abychom vliv tohoto pozadí na tvar spektra mohli korekcí minimalizovat.

#### 4.1.2. Pokusy o optimalizaci barvení makrofágů sondou SBFI/AM

Během dalších měření jsme chtěli optimalizovat barvení buněk J774A.1. Byla použita různá média a různé podmínky barvení (Tab. 3). Kontrola barvení se prováděla měřením emisních spekter (kapitola 3.2.7.2.). Cílem naší optimalizace bylo dosáhnout hodnoty 2 podílu intenzit  $R_s$ . Hodnota podílu intenzit  $R_s$ , která byla získána výpočtem:

$$R_s = \frac{S_2 - \frac{P_2}{P_1} * S_1}{\frac{P_2}{P_1} * S_1},$$

kde  $P$  je intenzita fluorescence neobarvených buněk (pozadí),  $S$  je intenzita fluorescence obarvených buněk SBFI/AM, index 1 je intenzita fluorescence při vlnové délce 450 nm (maxima fluorescence pozadí), kam intenzita fluorescence SBFI/AM výrazně nezasahuje, a je tedy typická pro pozadí a fluorescence SBFI/AM by na ní neměla mít vliv (Obr. 11), index 2 je předpokládané emisní maximum (vlnová délka 540 nm) SBFI/AM bez sodných kationtů a zároveň zde intenzita fluorescence neobarvených buněk klesá (Obr. 18). Nevybrali jsme emisní maximum SBFI/AM se sodnými kationty, protože má oproti SBFI/AM bez sodných kationtů zvýšenou intenzitu fluorescence a pozadí by na ní mělo mít menší vliv. Čím vyšší je  $R_s$ , tím více převládá intenzita fluorescence sondy nad intenzitou fluorescence pozadí buněk J774A.1.

V jednotlivých pokusech o optimalizaci se měnily pouze proměnné uvedené v Tab. 3. Pokus č 1 se shoduje s nastavením měření úniku draselných kationtů z buněk J774A.1 (Pospisilova, 2010) až na koncentraci SBFI/AM, která je o polovinu nižší než původně použitá koncentrace PBFI/AM. Při optimalizaci barvení jsme hledali vhodný kompromis mezi zlepšením barvení a nesnížením životaschopnosti buněk. Čím vyšší se použije koncentrace sondy SBFI/AM, tím dříve se při měření buňky odlepují ze skla. Je to dáno přítomností DMSO (dimethyl sulfoxid), ve kterém se sonda rozpouští. Totéž platí pro dobu barvení – čím je delší, tím jsou méně životaschopné buňky pro následné měření. Medium HBSS je vhodné pro fluorescenční měření, není ovšem jako minerální medium ideální pro výživu buněk, narozdíl od media DMEM, které obsahuje i fetální bovinní sérum. Na druhé straně DMEM kvůli svému komplexnímu složení není ideální pro fluorescenční měření, protože může zvyšovat intenzitu pozadí, zvláště když se excituje v kratších vlnových délkách. V našem případě ve 340 nm. Nutnost  $CO_2$  atmosféry při pěstování buněk v DMEM médiu je dána přítomností bikarbonátového pufrčního systému. Teplota 37 °C je pro makrofágy J774A.1 příznivější. Teplotu 25 °C jsme použili jen pro barvení podle Evy Pospíšilové.

Nejvhodnější podmínky barvení se zdály v pokusu č. 6, nicméně při opakování tohoto pokusu (pokus č. 7) nebylo dosaženo přesvědčivých výsledků. Pravděpodobně to bylo způsobeno nedostatečným opláchnutím barvených sklíček v pokusu č. 6.

pokus	koncentrace sondy ( $\mu\text{M}$ )	doba barvení (min)	medium	teplota ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\text{CO}_2$	$R_s$	Směrodatná odchylka $R_s$
1	4.5	45	HBSS	25	ne	0.38	0.016
2	10	45	HBSS	37	ne	0.13	0.084
3	10	45	DMEM	37	ano	0.39	0.042
4	280	80	HBSS	37	ne	0.23	0.044
5	22.4	960	HBSS	37	ne	0.90	0.085
6	44	180	HBSS	37	ne	2.72	0.139
7	44	180	HBSS	37	ne	0.89	0.006
8	7.5	75	HBSS	37	ne	0.20	0.018

Tab. 3: Přehled způsobů barvení použitých pro optimalizaci barvení makrofágů J744A.1 sondou SBFI/AM.

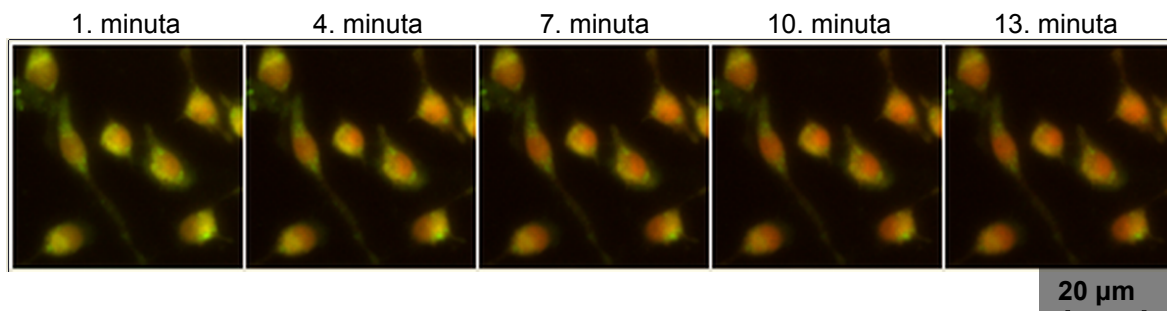
Vzhledem k tomu, že se optimalizace barvení nedařila, rozhodli jsme se pomocí fluorescenční mikroskopie ověřit, zda vůbec dochází ke vstupu sondy SBFI/AM do buněk.

#### 4.1.3. Ověření měření pomocí sondy SBFI/AM na mikroskopu Cell<sup>R</sup>

Pomocí fluorescenční mikroskopie bylo ověřováno, zda sonda opravdu vstupuje do buněk a jak velký je podíl intenzity pozadí na celkové intenzitě buněk. Preparáty na měření byly připraveny podle kapitoly 3.2.8.

Na Obr. 19, který byl upraven programem ImageJ, jsou složeny dva snímky z fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81 v určitých časových intervalech po přidání toxinu k buňkám makrofágů J774A.1 obarvených sondou SBFI/AM. Intenzita fluorescence v 505 nm byla u jednoho snímku pořízena při excitaci 385 nm (červená barva) a u druhého snímku při excitaci 345 nm (zelená barva) v rozmezí 2 s. Tyto excitační vlnové délky byly zvoleny pro poměrové měření změny koncentrace sodných kationtů v excitaci sondou SBFI/AM. Z Obr. 19 je patrné, že sonda SBFI/AM do jednotlivých buněk J774A.1 vstupovala a po přidání toxinu CyaA reagovala na vzestup koncentrace sodných kationtů podle očekávání, tedy zvyšováním poměru intenzit při excitacích 385/345 nm, což je znázorněno „červenáním“ složených snímků v čase. Hodnoty intenzit pozadí dosahovaly přibližně 70 % celkové intenzity fluorescence obarvených vzorků a na těchto obrázcích jsou odečteny.

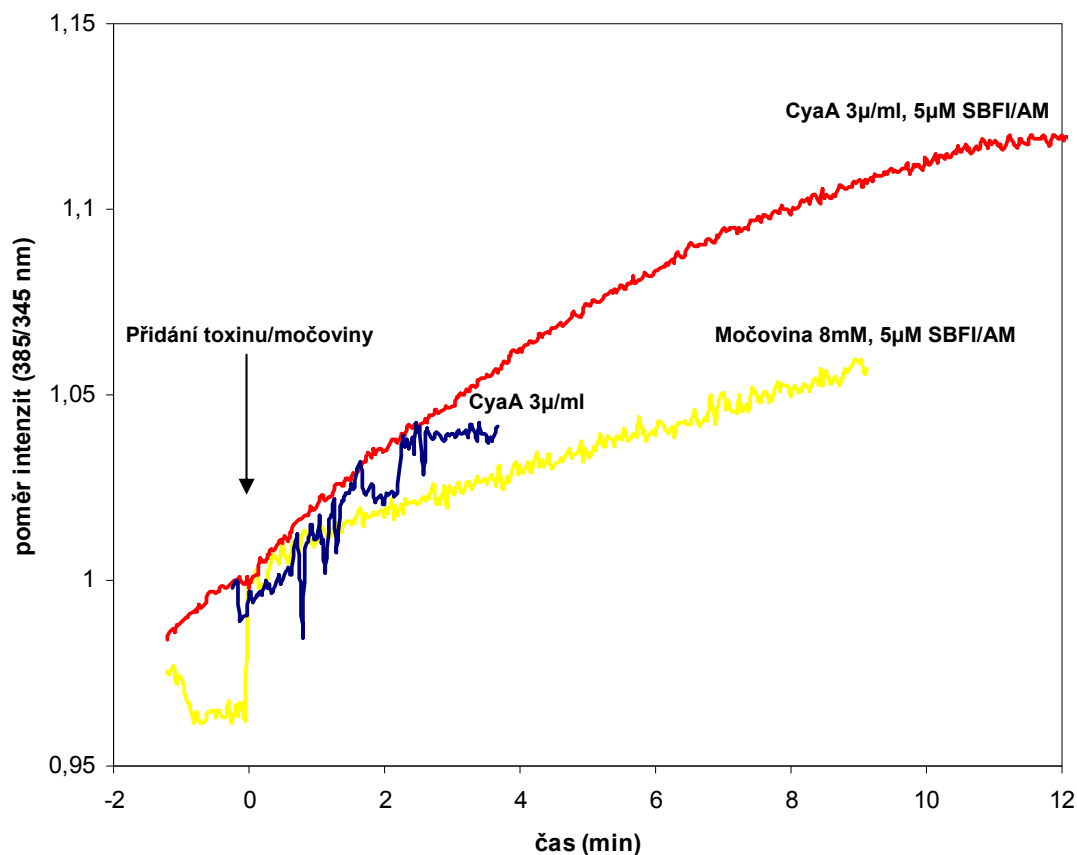
### Kinetika vstupu sodných kationtů do J774A.1 po přidání toxinu CyaA



Obr. 19: Makrofágy J774A.1 obarvené sondou SBFI/AM (5 µM), jednotlivé obrazy jsou složeny ze dvou snímků snímáných po sobě v časovém intervalu 2s a mají různou vlnovou délku excitace 385 a 345 nm. Upravováno programem ImageJ: zelenou barvou je označena intenzita snímku při excitaci 385 nm, a červenou barvou je označený obraz snímáný při excitaci 345 nm. Snímky byly pořízeny fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 81, Cell<sup>R</sup> Imaging Station, objektiv s imerzním olejem 20x/0.75 NA UPlanSApo.

Graf na Obr. 20 vychází z průměrných hodnot souboru všech buněk J774A.1 v zorném poli. Tento graf znázorňuje poměrová měření v emisi 505 nm při střídavé excitaci 385/345 nm. Je vidět, že není významný rozdíl mezi výsledky těchto poměrových měření buněk obarvených SBFI/AM (červená křivka) a opůsobených CyaA a buňkami obarvenými SBFI/AM a opůsobenými pouze močovinou, která odpovídala přidavku močoviny přidaného s toxinem u „červeného“ vzorku. Obě křivky jsou dokonce srovnatelné se vzorkem buněk J774A.1 (modrá křivka), který nebyl obarven sondou SBFI/AM, byl pouze opůsoben CyaA. Neobarvené buňky s přidavkem CyaA byly měřeny jen jednou, ostatní křivky z grafu jsou průměrem nejméně dvou měření. Neobarvené buňky s CyaA se po opůsobení CyaA začaly po 4 minutě pouštět skla, proto modrá křivka v grafu (Obr. 20) po 4 minutě končí. To se ovšem stávalo i u obarvených buněk s toxinem, které pak nebyly vybrány pro analýzu výsledků. Lineární regrese všech těchto křivek získané v programu Fityk (Tab. 4) vypovídají o tom, že k žádnému významnému zvyšování podílu intenzit a střídavé excitaci 385/345 nm nedochází a jednotlivé vzorky se mezi sebou příliš neliší. Na celém souboru buněk tedy nebyl prokazatelný vstup sodných kationtů poměrovým měřením.

### Buňky J774A.1 obarvené/neobarvené SBFI/AM s/bez přidavku toxinu CyaA



Obr. 20: Kinetika vstupu sodných kationtů do makrofágů J774A.1 obarvených sondou SBFI/AM po přidání CyaA (3 µg/ml) (červená křivka) nebo močoviny o koncentraci odpovídající koncentraci močoviny v přidavku s toxinem (žlutá křivka), a neobarvených buněk (modrá křivka) po přidání CyaA (3 µg/ml) měřeno fluorescenčním mikroskopem Olympus IX 81, Cell<sup>R</sup> Imaging Station, objektiv s imerzním olejem 20x/0.75 NA UPlanSApo.

vzorek	lineární regrese
obarvené buňky J774A.1 + CyaA	$y = 0,0157x + 1$
neobarvené buňky J774A.1 + CyaA	$y = 0,0167x + 1$
obarvené buňky J774A.1 + močovina	$y = 0,0078x + 1$

Tab. 4: Lineární regrese ke křivkám z grafu na Obr. 20; prokládáno úsekem 0-3 minuty; kvůli normalizaci dat na 1 v čase 0 začínají všechny regresní přímky v  $y = 1$ .

Po těchto výsledcích jsme se rozhodli pro ukončení zjišťování vstupu sodných kationtů do buněk J774A.1 obarvených sondou SBFI/AM pomocí poměrového měření. Naší další volbou pro zjišťování toku sodných kationtů na membráně makrofágů J774A.1 bylo použití sondy Sodium Green (SG).

#### 4.1.4. Měření vstupu sodných kationů do buněk makrofágů po působení CyaA – časově rozlišená fluorescence Sodium Green

Změna vnitrobuněčné koncentrace sodných kationů se dá měřit i fluorescenční sondou Sodium Green (SG) (kapitoly 3.2.6.) pomocí měření doby dohasínání této sondy (kapitola 3.2.7.5.). Sonda SG je excitována mimo UV oblast, takže jsme předpokládali, že pozadí buněk, které je při excitaci v UV oblasti tvořeno hlavně tryptofany, NAD, a dalšími molekulami, které obsahují benzenová jádra, nebo konjugované dvojně vazby, bude v našem měření zanedbatelné. Navíc jsme nepředpokládali, že by toto pozadí mělo podobné doby dohasínání jako sonda Sodium Green. Jako pozitivní kontrolu jsme zvolili měření doby dohasínání SG v obarvených buňkách, které byly opůsobeny ionomycinem. Ionomycin je ionofor, produkováný bakterií *Streptomyces globatus* a umožňuje vstup sodných kationů do cytozolu buněk (Kaplan, et al., 1987).

	Intenzity v maximu histogramu (fotonů/kanál)	$\tau$ (ns)	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$f_1$	$f_2$
<b>Sodium Green v roztoku</b>	5001	3,18	0,91	3,61	0,43	0,57	0,16	0,84
<b>neobarvené buňky</b>	394	3,80 ± 0,11	0,54	4,00	0,31	0,69	0,06	0,94
<b>obarvené buňky</b>	929	3,55 ± 0,19	0,70	3,78	0,31	0,69	0,08	0,92
<b>obarvené buňky s ionomycinem</b>	1100,	3,80 ± 0,14	0,60	3,94	0,22	0,78	0,04	0,96

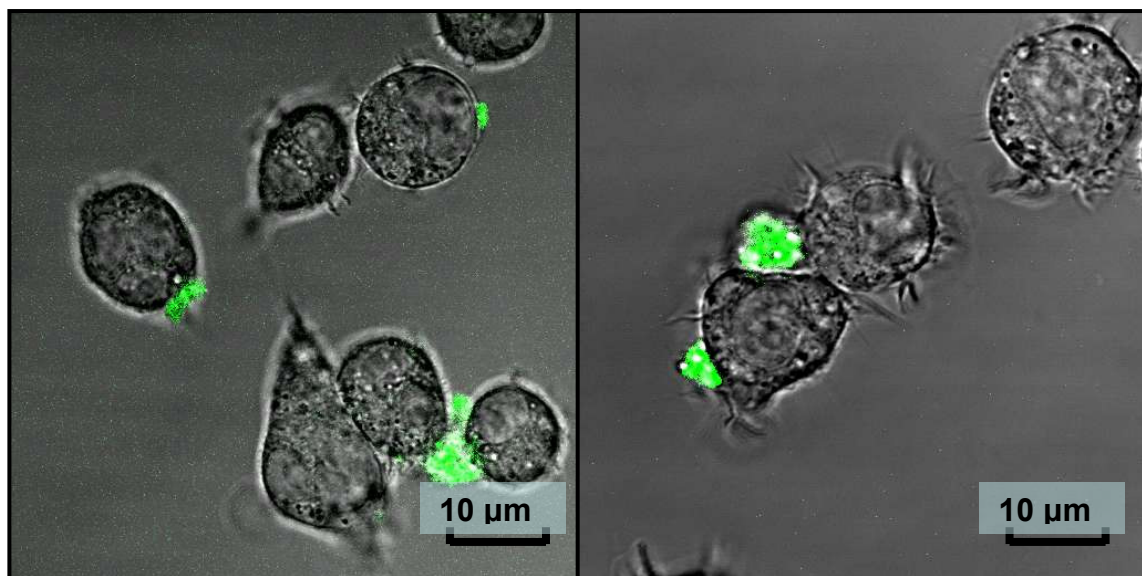
Tab. 5: Analýza dekonvoluce dohasínání Sodium Green za různých podmínek,  $\tau$  – průměrná doba života SG za daných podmínek;  $\tau_1$  doba dohasínání SG exponenciální komponenty za daných podmínek;  $\alpha_1$  – před-exponenciální faktor;  $f_1$  – frakční příspěvek.

Průměrná doba dohasínání (Tab. 5) byla výrazně delší než data z literatury která jsou asi 1,13 ns bez sodných kationů a 2,39 ns v přítomnosti sodných kationů 140 mM (Lakowicz, 2006; Szmackinski and Lakowicz, 1997). Sonda v našem případě pravděpodobně agregovala na povrchu buněk a nevstupovala do nich. Prodloužení doby života SG mohlo být způsobeno mikroprostředím, ve kterém se nacházela. Doba dohasínání neobarvených buněk byla velmi podobná době dohasínání obarvených buněk a byla delší než doba dohasínání SG v roztoku. Nicméně sonda SG měla v roztoku také delší dobu dohasínání, než by měla mít. Je to pravděpodobně dáno mikroprostředím, ve kterém se nachází a navíc, je ve své TA formě, která doby dohasínání nemá stanovené. Vstup sondy SG/TA do buněk jsme se rozhodli ověřit pomocí fluorescenční mikroskopie.



#### 4.1.5. Ověření vstupu sondy sodium green do buněk na fluorescenčním mikroskopu

Agregace sondy byla zkoumána a potvrzena na konfokálním mikroskopu (Obr. 21) (kapitola 3.2.9.). Obrázky potvrzují, že sonda SG/TA nevstupovala do makrofágů J774A.1 a hromadila se na jejich povrchu.



Obr. 21: Reprezentativní snímky makrofágů J774A.1 s agregáty sondy Sodium Green (zeleně) na povrchu. Snímky byly získány konfokálním mikroskopem TSC SP2, objektiv s imerzním olejem HCX PL APO CS 63.0x1.40 NA; upravováno programem ImageJ.

Po těchto výsledcích jsme opustili několikaměsíční zkoumání toku sodných kationtů na membráně makrofágů J774A.1 po opůsobení CyaA pomocí fluorescenčních metod.

## 4.2. Ověření oligomerizace CyaA v roztoku, na lipozomech a izolovaných makrofágových membránách

Práce, které se zabývají stechiometrií působení CyaA (Iwaki, et al., 1995; Lee, et al., 2005; Szabo, et al., 1994; Vojtova-Vodolanova, et al., 2009) naznačují, že CyaA jako monomer zvyšuje intoxikaci buňky (jako intoxikace se označuje translokace AC- domény a zvyšování koncentrace cAMP v buňce). CyaA jako oligomer (dvě a více molekul CyaA) naproti tomu působí jako hemolyzin (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009) a tvoří selektivní pór pro monovalentní kationty (Pospisilova, 2010). *In vivo* bylo prokázáno, že dochází k tvorbě oligomerů na membráně erytrocytů (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). Zdá se, že v roztoku existuje translokační prekurzor CyaA pro přenos AC – domény do buňky a pórtvorný prekurzor CyaA pro tvorbu hemolyzinového kanálu. Tyto dva prekurzory jsou spolu v rovnováze. Není ovšem úplně jasné, zda spolu pórtvorné prekurzory CyaA tvoří oligomery v roztoku, které pak vstupují do membrány, nebo jestli jako monomery vstoupí do membrány, kde teprve oligomerizují. Oligomerizace ještě nebyla přímo prokázána na buňkách s CD11b/CD18 integrinem, který je receptorem pro CyaA (Guermonprez, et al., 2001). Naším cílem bylo aplikovat metodu FRET (3.2.8.), kterou je možné prokázat oligomerizaci CyaA nejprve na jednodušších systémech (roztok, lipozomy) a následně se pomocí FRET pokusit zkoumat oligomerizaci na membránách makrofágů J774A.1, které obsahují receptor pro CyaA integrin CD11b/CD18 (Ross and Vetvicka, 1993). Pokud bychom u některého měření oligomerizaci prokázali, chtěli jsme určit, zda k ní dochází už v roztoku, či na membráně až po zabudování CyaA.

### 4.2.1. Měření oligomerizace CyaA v pufru TNE pomocí časově rozlišené fluorescence

Měřili jsme oligomerizaci CyaA toxoidů v TNE pufru. TNE pufr obsahuje chelatační činidlo EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina) a byl zvolen proto, abychom mohli zkoumat, zda je oligomerizace závislá na přítomnosti vápenatých kationtů. Chtěli jsme zjistit zda bude toxin oligomerizovat v roztoku, pomocí metody FRET v časovém rozlišení. Měření FRET a vyhodnocování získaných dat bylo prováděno podle kapitoly 3.2.8.4. a doba dohasínání je průměr minimálně ze dvou měření. V Tab. 6 jsou vždy tučně zvýrazněny 100 % a 0 % *relativní* efektivity ( $E_r$ ) (kapitola 3.2.8.4.) FRET pro danou sérii pokusů. V našem pokusu byl CyaA-detox-488 donorem a CyaA-detox-594 akceptorem fotonů. Pokud by tyto dva toxoidy oligomerizovaly, byly by dostatečně blízko pro FRET,

který by se našem měření projevil zkrácením doby dohasínání donoru. Pro vypočtení 0 %  $E_r$  byla zvolena hodnota *relativní* doby dohasínání donoru (kapitola 3.2.8.4.) získaná měřením CyaA-detox-A488 (s  $\text{Ca}^{2+}$  i bez  $\text{Ca}^{2+}$ ). Tento toxoid je geneticky detoxifikovaný inzercí GlySer mezi AK 188 a 189. Přerušení ATP vazebného místa CyaA, toxin ztrácí adenylátcyklázovou aktivitu (Ladant, et al., 1992; Osicka, et al., 2000). Použitím tohoto toxoidu pro vypočtení 0 %  $E_r$  jsme eliminovali možné pochybnosti o porovnávání doby dohasínání z různých mikroprostředí, které bychom měli pokud bychom pro vypočtení 0 %  $E_r$  použili sondu Alexa Fluor 488 bez vazby na toxoid v TNE pufru, i když má průměrnou dobu dohasínání nejdelší a zdála by se být vhodným kandidátem pro vypočtení 0 %  $E_r$ . Pro vypočtení 100 %  $E_r$  byla zvolena hodnota relativní doby dohasínání donoru získaná měřením CyaA-detox-A488/594 v pufru TNE s vápenatými kationty (4 mM), které jsou nezbytné pro správnou konformaci toxoidu CyaA (Rose, et al., 1995), která je předpokladem pro maximální možný FRET. Při měření s vápenatými kationty byla jejich koncentrace 4 mM, abychom dosáhli poměru koncentrací EDTA: $\text{Ca}^{2+}$  - 1:2, tedy finální 2 mM koncentrace volných vápenatých kationtů. Koncentrace toxoidů s donorem (CyaA-detox-A488) a s donorem a akceptorem (CyaA-detox-A488/594) při měření byla vždy 3  $\mu\text{g/ml}$ . Konečná koncentrace přidávaného toxoidu s akceptorem (CyaA-detox-A594) byla 3 nebo 6  $\mu\text{g/ml}$ .

Při měření jsme postupovali následujícím způsobem. Nejprve se do kyvety přidal toxoid s donorem, kde měření doby dohasínání donoru trvalo přibližně 6 minut, potom se přidal toxoid s akceptorem v ekvivalentní koncentraci s donorem, jehož proměření trvalo přibližně 10 minut a nakonec se ještě jednou přidal toxoid s akceptorem do konečné koncentrace 6  $\mu\text{g/ml}$ , která zvyšuje pravděpodobnost FRET. Takto naměřená data jsou shrnuta v Tab. 6.

	Poměr množství akceptoru:donoru	Ca <sup>2+</sup>	$\tau_r$ (ns)	$E_r$ (%)
CyaA-detox-A488	1:0	-	4,06	<b>0,00</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	+	3,39	<b>100,00</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	-	3,52	80,86
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	-	4,07	-0,86
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	-	4,06	0,13
A488	1:0	-	4,11	-7,51
CyaA-detox-A488	1:0	+	4,09	<b>0,00</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	+	4,07	2,10
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	+	4,02	9,71
A488	1:0	+	4,02	-5,49

Tab. 6: Toxoidy (3.2.8.3.) a relativní efektivita FRET  $E_r$  v pufru TNE s vápenatými kationty "+" (4 mM) a bez vápenatých kationtů "-";  $\tau_r$  (ns) – doba dohasínání akceptoru A488 ; tučně hodnoty zvolené jako 0 % a 100 %  $E_r$ ; poměr množství donoru a akceptoru byl určen z přidávané koncentrace toxoidu; prokazatelný FRET by se vyznačoval hodnotami nad 15 %  $E_r$ .

Při měření CyaA-detox-A488/594 bez vápenatých kationtů se snížila  $E_r$  oproti měření CyaA-detox-A488/594 s vápenatými kationty, což potvrzuje domněnku, že toxin po přidání vápenatých kationtů změní konformaci (Tab. 6). Relativní efektivita FRET při měření donoru s akceptorem se bez vápníku pohybovala v záporných hodnotách a v přítomnosti vápníku nepřekročila 10 %, a to ani v případě, že byla přidávána dvojnásobná koncentrace toxoidu s akceptorem. Za prokazatelný FRET a tedy i oligomerizaci bychom považovali vzorek, který by měl efektivitu FRET vyšší než 15 %, protože doby dohasínání z opakování jednotlivých měření ve všech prostředích (pufr, lipozomy, membrány) měly směrodatnou odchylku až 0,1 ns (odpovídá přibližně  $E_r$  = 15 %), tedy záporné a nízké kladné hodnoty  $E_r$  mohly být způsobeny pouze odchylkami v měření a nemusely znamenat FRET. Lze tedy uzavřít, že oligomerizace v roztoku za těchto podmínek nebyla prokázána.

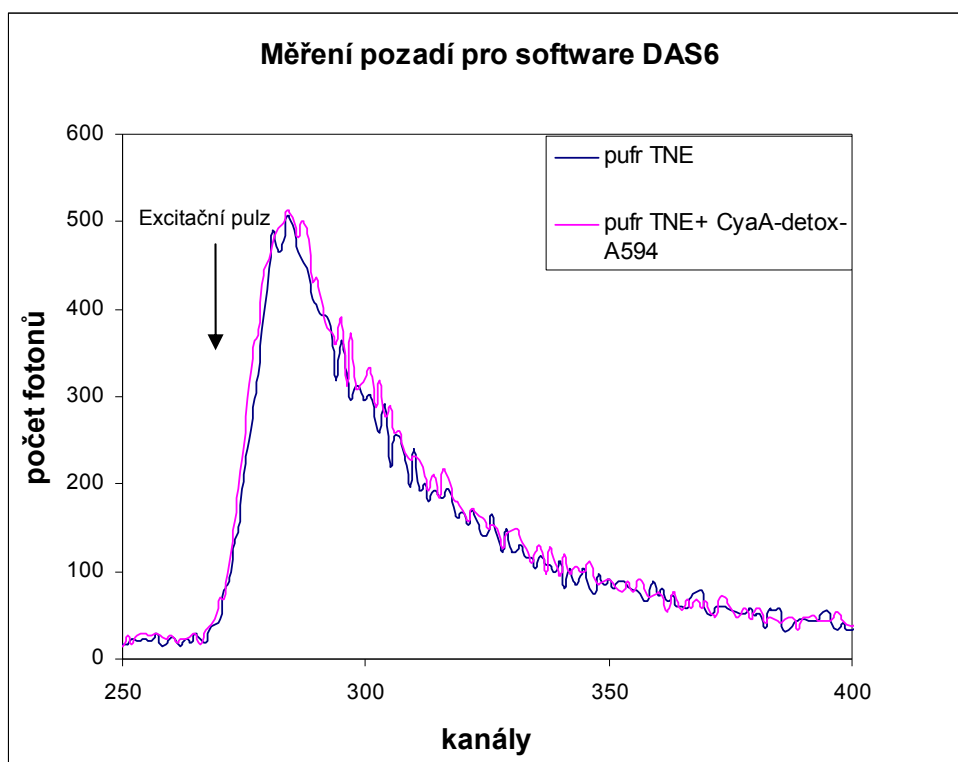
#### 4.2.1.1. Eliminace vlivu močoviny na oligomerizaci CyaA

CyaA-detox byl uchovávan v 8 M močovíně, ve které si velmi dlouho uchovává svoji aktivitu a ze které je možno jej renaturovat do funkčního proteinu (Westrop, et al., 1996). CyaA je močovinou denaturován a ztrácí tak dočasně svoji biologickou aktivitu. Přídavek toxoidu byl vzhledem k objemu kyvety velký, tedy i výsledná koncentrace močoviny byla vysoká a mohla nepříznivě ovlivňovat renaturaci a tedy i oligomerizaci CyaA. Rozhodli jsme se tedy vzorky toxoidu ve všech pokusech FRET (roztok/lipozomy/membrány), u kterých toto hrozilo, předředit TNE pufr, aby nebyla koncentrace močoviny v kyvetě

vyšší než 0,2 M. Při této koncentraci by močovina neměla mít na aktivitu a oligomerizaci CyaA velký vliv (Fiser, 2003).

#### 4.2.1.2. Měření pozadí fluorescence donoru CyaA-detox-A488 při sledování FRET

Pozadí jsme měřili u každého pokusu zvlášť a později jsme ho odečítali od naměřených dob dohasínání donoru pomocí programu DAS6 (kapitola 3.2.8.4.). Jako pozadí jsme zvolili TNE pufr, do kterého byl později přidán donor a ještě později akceptor při měření FRET. TNE pufr byl nejpřesnějším pozadím pro měření samotného donoru. Nejpřesnější pozadí pro měření FRET, kdy je v kyvetě donor i akceptor a měří se doba dohasínání donoru by byl TNE pufr s přídavkem akceptoru (CyaA-detox-A594) o stejné koncentraci v jaké je obsažen při měření FRET. Z grafu na Obr. 22 vyplývá, že přídavkem akceptoru se pozadí nemění a není tedy nutné přidávat CyaA-detox-A594 do jeho měření. Akceptor jsme tedy nepřidávali do měření pozadí pro FRET ani při měření na lipozomech a membránách.



Obr. 22: Měření pozadí odečítaného v softwaru DAS6. Nastavení a průběh měření byl stejný jako 3.2.8.4. Porovnání pufr TNE (modrá křivka) a pufr TNE+CyaA-detox-A594 (růžová křivka; 0,3 µg/ml); 1 kanál = 111 ps.

#### 4.2.2. Měření oligomerizace CyaA na lipozomech ze sojových lipidů

Měřili jsme oligomerizaci CyaA toxoidů v na lipozomech tvořených sojovým fosfatidylcholinem (SPC IIa). Bylo zjištěno, že kanálotvorná aktivita CyaA, u které se oligomerizace předpokládá, je v sojových lipozomech vyšší než v syntetických (DMPC) (Benz, et al., 1994b), a to pravděpodobně díky vyšší afinitě vazby CyaA na lipidy sojových lipozomů než na lipidy syntetických lipozomů (Masin, 1999). Proto jsme nejdříve zvolili měření na tomto typu lipozomů.

Ve vzorku lipidů o koncentraci 0,2 mg/ml je molární koncentrace lipidů asi 0,29 mM. Při předpokládané minimální velikosti lipozomů 100 nm a ploše molekuly fosfolipidu  $0,6 \text{ nm}^2$  je celková koncentrace lipozomů asi  $1,6 \cdot 10^{-12} \text{ ml}^{-1}$ . Při koncentraci CyaA 3  $\mu\text{g/ml}$  (16,8 nM), připadají na jeden lipozom asi 2 molekuly CyaA. Je to jen hrubý odhad a pravděpodobně je počet molekul na jeden lipozom vyšší, protože se jednalo o blíže nespecifikovanou směs lipozomů různých velikostí a množství vrstev. Pro měření oligomerizace je vhodné, aby na jeden lipozom připadlo několik molekul CyaA, aby měly možnost oligomerizovat. Počet molekul CyaA ovšem nesmí být moc vysoký, abychom nemuseli uvažovat riziko agregace CyaA molekul na membráně. Nemohli jsme použít vyšší koncentraci lipozomů, protože pozadí pak mělo vysokou intenzitu, hodnotou srovnatelnou s intenzitou měřeného donoru, a podobné doby dohasínání, jako měřený vzorek. Po odečtení takového pozadí od měřeného signálu zbyla získaným datům velmi nízká intenzita fluorescence, která byla velmi rozkolísaná a ke statistickému zhodnocení nepoužitelná. Ze stejného důvodu jsme nemohli použít nižší koncentraci CyaA-detox, protože by se opět zvýšil vliv odečtu pozadí na naše měření.

Vyhodnocování efektivity FRET probíhalo stejně jako v kapitole 4.2.1. Relativní efektivita  $E_r = 0 \%$  byla vždy získána z měření CyaA-detox-A488 (donor) v daném prostředí (s  $\text{Ca}^{2+}$ , bez  $\text{Ca}^{2+}$ , při koncentraci lipozomů 0,1 mg/ml, nebo 0,2 mg/ml). 100 % relativní efektivita FRET byla vždy získána z měření CyaA-detox-A488/594 (akceptor-donor na jedné molekule) v daném prostředí (vždy s  $\text{Ca}^{2+}$ , při koncentraci lipozomů 0,1 mg/ml, nebo 0,2 mg/ml) (Tab. 7).

Při měření jsme postupovali následujícím způsobem. Nejprve se do kyvety přidal toxoid s donorem, jehož proměření trvalo přibližně 6 minut, potom se přidal toxoid s akceptorem v ekvivalentní koncentraci s donorem, jehož proměření trvalo přibližně 10 minut a nakonec se ještě jednou přidal toxoid s akceptorem do konečné koncentrace 6  $\mu\text{g/ml}$ , která zvyšuje pravděpodobnost FRET. Takto naměřená data jsou shrnuta v Tab. 7.

Sojové lipozomy pravděpodobně v našem případě ovlivňovaly dobu dohasínání sondy

A488 navázané na toxoidu CyaA-detox, a to tak, že jí zkracovaly, což mělo za následek malý rozsah dob dohasínání pro určování maximální  $E_r$  a celkové zkrácení výsledků. Měření donoru s akceptorem nejenže neprokázalo FRET a tedy ani oligomerizaci, ale proti všem očekáváním se doba dohasínání donoru po přidání akceptoru prodlužovala.

	Poměr množství donoru:akceptoru	konc. lipozomů (mg/ml)	Ca <sup>2+</sup>	$\tau_r$ (ns)	$E_r$ (%)
CyaA-detox-A488	1:0	0,2	-	3,79	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,2	+	3,57	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,2	-	4,03	-110,6
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,2	-	3,94	-68,6
CyaA-detox-A488	1:0	0,2	+	3,83	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,2	+	3,57	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,2	+	3,90	-29,8
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,2	+	3,92	-36,7
CyaA-detox-A488	1:0	0,1	-	3,89	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,1	+	3,42	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,1	-	3,95	-11,2
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,1	-	3,86	6,6
CyaA-detox-A488	1:0	0,1	+	3,77	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,1	+	3,42	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,1	+	3,87	-29,8
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,1	+	3,87	-29,1

Tab. 7: Toxoidy (3.2.8.3.) a relativní efektivita FRET  $E_r$  v pufru TNE s vápenatými kationty + (4 mM) a bez vápenatých kationtů -;  $\tau_r$  (ns) – doba dohasínání akceptoru A488 ; tučně hodnoty zvolené jako 0 % a 100 %  $E_r$ ; poměr množství donoru a akceptoru byl určen z přidávané koncentrace toxoidu; lipozomy z SPC II byly ředěny 10-krát, nebo 20-krát; prokazatelný FRET by se vyznačoval hodnotami nad 15 %  $E_r$ .

#### 4.2.3. Měření oligomerizace CyaA na syntetických lipozomech DMPC

Vzhledem k nespecifickému působení lipozomů ze SPC IIa lipidů na dobu dohasínání donoru (CyaA-detox-A488) při měření FRET jsme se rozhodli použít jiný typ lipidů pro přípravu lipozomů, a sice syntetické lipidy DMPC (dimyristoylfosfatidylcholin) s 99 % čistotou. DMPC mají lepší optické vlastnosti, které dovolují měřit ve vyšší koncentraci lipozomů. CyaA se do nich ale váže s nižší afinitou než do SPC lipozomů (Masin, 1999). 0 % a 100 %  $E_r$  byly určeny jako v předchozích kapitolách (4.2.2.; 4.2.1.). Kvůli nedostatku CyaA-detox-A488/594 jsme 100 %  $E_r$  určovali pouze se syntetickými lipozomy o koncentraci 0,5 mg/ml s vápenatými kationty. Narozdíl od předchozích měření FRET jsme do kyvety u všech pokusů přidávali vápenaté kationty (4 mM), které jsou důležité pro

CyaA kvůli zaujetí správné konformace.

Z Tab. 8 je patrné, že doby dohasínání v různých koncentracích lipozomů se lišily minimálně. U lipozomů z DMPC lipidů narozdíl od lipozomů ze sojových lipidů už nebyl problém s rozsahem dob dohasínání při určování maximální  $E_R$ . FRET, tedy ani oligomerizace, nebyl prokázán u žádného vzorku po přidání akceptoru k donoru ani při dvojnásobné koncentraci akceptoru.

	Poměr množství donoru:akceptoru	konc. lipozomů (mg/ml)	Ca <sup>2+</sup>	$\tau_r$ (ns)	$E_r$ (%)
CyaA-detox-A488	1:0	1	+	4,00	<b>0,00</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,5	+	3,59	<b>100,00</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	1	+	4,01	-2,75
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	1	+	4,00	0,61
CyaA-detox-A488	1:0	0,5	+	4,00	<b>0,00</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,5	+	3,59	<b>100,00</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,5	+	4,05	-12,77
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,5	+	4,04	-10,72
CyaA-detox-A488	1:0	0,2	+	4,06	<b>0,00</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	0,5	+	3,59	<b>100,00</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	0,2	+	4,06	0,20
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	0,2	+	4,08	-3,45

Tab. 8: Toxoidy (3.2.8.3.) a relativní efektivita FRET  $E_r$  v pufru TNE s vápenatými kationty + (4 mM);  $\tau_r$  (ns) – doba dohasínání akceptoru A488 ; tučně hodnoty zvolené jako 0 % a 100 %  $E_r$ ; poměr množství donoru a akceptoru byl určen z přidávané koncentrace toxoidu; syntetické lipozomy DMPC byly ředěny 2-krát, 4-krát nebo 10-krát; prokazatelný FRET by se vyznačoval hodnotami nad 15 %  $E_r$ .

#### 4.2.4. Měření oligomerizace CyaA na membránách makrofágů J774A.1

Posledním systémem, který jsme zvolili pro zjišťování oligomerizace byly membrány makrofágů J774A.1 obsahující integrin CD11b/CD18, který je receptorem pro CyaA (Guermonprez, et al., 2001). Proto jsme očekávali větší pravděpodobnost vazby CyaA-detox do tohoto systému. Tyto membrány byly izolovány podle kapitoly 3.2.8.6. Efektivity 0 % a 100 %  $E_r$  byly určeny jako v předchozích kapitolách (4.2.2.; 4.2.1.).

Výsledky se od předchozích kapitol moc nelišily. FRET po přidání akceptoru nebyl zjištěn (Tab. 9). Přítomnost vápenatých kationtů také výrazně neovlivňovala dobu dohasínání CyaA-detox-A488 ani po přidání CyaA-detox-A594. Takže jsme neprokázali oligomerizaci CyaA ani v tomto systému.



	<b>Poměr množství donoru:akceptoru</b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b><math>\tau_r</math> (ns)</b>	<b><math>E_r</math> (%)</b>
CyaA-detox-A488	1:0	+	3,99	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	+	3,28	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	+	4,04	-6,9
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	+	4,04	-7,7
CyaA-detox-A488	1:0	-	4,06	<b>0,0</b>
CyaA-detox-A488/594	1:1	+	3,28	<b>100,0</b>
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:1	-	4,06	-0,2
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	1:2	-	4,03	2,9

Tab. 9: Toxoidy (3.2.8.3.) a relativní efektivita FRET  $E_r$  v pufru TNE s vápenatými kationty + (4 mM) a bez vápenatých kationtů -;  $\tau_r$  (ns) – doba dohasínání akceptoru A488; tučně hodnoty zvolené jako 0 % a 100 %  $E_r$ ; poměr množství donoru a akceptoru byl určen z přidávané koncentrace toxoidu; zásobní pelet (3.2.8.6.) membrán byl ředěn 10-krát; prokazatelný FRET by se vyznačoval hodnotami nad 15 %  $E_r$ .

#### 4.2.4.1. Ověření vazby toxinu do membrána makrofágů J774A.1

Posledním pokusem při zjišťování oligomerizace bylo ověření vazby toxoidů do membrán izolovaných z makrofágů J774A.1. Pokud by se toxoidy do membrán nevázaly, nemohli bychom na základě našich výsledků uzavřít, že k oligomerizaci na těchto membránách dochází.

Po měření v kapitole 4.2.4. jsme přelili jednotlivé vzorky do mikrozkušavek, naředili a centrifugovali (pokojová teplota, 12100 x g, 5 min). Supernatant jsme přelili do nových mikrozkušavek a pelet jsme naředili v TNE pufru. Všem těmto vzorkům jsme změřili emisní spektrum (excitace 462 nm, 420-520 nm emise, LP 490 nm v emisi, SP 490 nm v excitaci). Po korekci intenzit na všechna ředění jsme spočítali poměr pelet/supernatant emisních maxim A488 (520 nm) jednotlivých vzorků. Intenzity fluorescence by v určitém rozmezí měli v našem případě odrážet koncentraci sondy, pokud zanedbáme vliv mikroprostředí blízkosti membrán na sondy. Výpočtem jsme tedy získali číslo, které říká kolikrát víc je vázané sondy na toxoidu v membráně, než v roztoku (Tab. 10). Toxoidu bylo v membráně minimálně 1,8 x více než v roztoku. CyaA-detox-A488/594 se do membrány vázal přibližně dvakrát více než CyaA-detox-A488 s přídatkem CyaA-detox-A594. Toxoidy se tedy do membrány vázaly a my tedy můžeme vyloučit, že dochází k oligomerizaci toxoidu po jejich integraci do izolovaných membrán J774A.1.

	<b>koncentrace toxoidu s A488 v původním vzorku (mg/ml)</b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>poměr intenzit v maximu emise A488 pelet/supernatant</b>
CyaA-detox-A488/A594	3	-	4,4
CyaA-detox-A488/A594	3	+	5,6
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	3	-	2,8
CyaA-detox-A488+CyaA-detox-A594	3	+	1,8

Tab. 10: Určení poměru vazby toxoidu do membrány makrofágů J774A.1 v přítomnosti Ca<sup>2+</sup> (+) a bez Ca<sup>2+</sup> (-).

### **4.3. Prokazování interakce tryptofanů z RTX hemolyzinové oblasti, která by mohla mít zásadní vliv na získávání nativní konformace CyaA**

V RTX hemolyzinové oblasti CyaA, která obsahuje nonapeptidové repetitivní sekvence (mezi aminokyselinami 1006 – 1638) (Khelef, et al., 1992), do nichž se vážou vápenaté kationty a stabilizují tak celou strukturu CyaA (Hewlett, et al., 1991), se nacházejí dva tryptofany v pozicích 1631 a 1652, které by mohly napomáhat zabalení CyaA do funkční konformace. Aby RTX repetitivní sekvence mohly vázat vápenaté kationty potřebují, zaujmout sekundární strukturu, která bude fungovat jako iniciační jádro vzniku beta-roll struktury (Sotomayor Perez, et al., 2010), která je tvořena v repetitivních sekvencích a je zodpovědná za vazbu vápenatých kationtů (Rhodes, et al., 2001). Tryptofany 1631 a 1652 by takové iniciační jádro mohly tvořit (Ladislav Bumba) tak, že by jejich aromtická jádra byla v tzv. stacking interakci. Rozhodli jsme se to tedy ověřit pomocí homoFRET měřeného na základě změny anizotropie fluorescence, kterou by měl tento přenos energie ovlivňovat. FRET byl původně předpokládán a sledován u chemicky různých molekul, kdy jedna funguje jako donor a druhá jako akceptor. U homoFRET dochází k přenosu energie mezi dvěma stejnými molekulami, např. 2 tryptofany, a jsou dost blízko (do 1 nm) na to, aby mohlo k takovému přenosu dojít. HomoFRET měl ukázat zda jsou tyto tryptofany dost blízko, pro takovou interakci.

Tato měření ještě nejsou dokončená. Máme k dispozici CyaA (1530-1680) a mutantní úsek CyaA WYR se substitucí v pozicích 1645-1647 WYR>ASG jako negativní kontrolu, která obsahuje jen jeden tryptofan. V dalších kapitolách pouze nastíním principy metod, které používáme.

#### **4.3.1. Měření homoFRET pomocí změny anizotropie s použitím Red-edge efektu**

Weber v roce 1960 prokázal, že homoFRET mezi dvěma molekulami tryptofanů přispívá k depolarizaci emise. Také ukázal, že tento přenos energie mnohem méně ovlivňuje polarizaci, pokud jsou tryptofany excitovány při 310 nm (Weber, 1960). Tento jev byl nazván „red-edge“ efekt (také Weberův „red-edge“ efekt). Později se ukázalo, že je tento jev charakteristický pro všechny molekuly s aromtickým kruhem, u kterých dochází k homoFRET (Weber and Shinitzky, 1970). „Red-edge“ efekt popírá nezávislost emisního spektra na vlnové délce excitace v absorpční oblasti, dané látky (Vavilovův zákon). Ve skutečnosti toto pravidlo může fungovat jen v homogenním prostředí, kde na všechny

molekuly působí homogenní prostředí (Demchenko, 2002). Bylo zjištěno, že homoFRET mezi dvěma konkrétními molekulami tryptofanu se dá sledovat měřením anizotropie tryptofanové emise při excitaci dvěma vlnovými délkami. Jedna excitační vlnová délka (295 nm) odpovídá selektivní excitaci tryptofanů, při kratších vlnových délkách je excitován i tyrosin a fenylalanin, a sledovaná depolarizace je ovlivněna dvěma procesy. Jedním z nich je pohyb tryptofanů způsobený rotací celé molekuly, na které jsou tryptofany navázány, a rotačním pohybem jednotlivých tryptofanových zbytků. Druhým procesem je právě homoFRET tryptofanů. Druhá excitační vlnová délka odpovídá „red-edge“ excitaci a její vlnová délka je 310 nm. Při takové excitaci je významně redukován příspěvek tryptofanového homoFRET ke změně anizotropie, na kterou má tedy vliv pouze rotace tryptofanů. Toho se dá využít k měření homoFRET tryptofanů a to tak, že se sleduje poměr anizotropie tryptofanu při excitacích 310/295 nm (Moens, et al., 2004). Čím vyšší je tento poměr, tím větší je příspěvek homoFRET k depolarizaci.

#### **4.3.2. Měření homoFRET pomocí vybělování vzorku a měření anizotropie**

Příspěvek homoFRET ke změně anizotropie systému se dá také eliminovat pomocí snižování koncentrace fluoroforu, který je sledován. Toho může být dosaženo právě vybělováním (Squire, et al., 2004; Varma and Mayor, 1998). V našem měření dosahujeme vybělení vzorku intenzivní excitací 295 nm, která trvá minimálně 60 minut, na spektrofluorometru v kyvetě 1,5x1,5 mm. Během vybělování měříme anizotropii. Mezi sebou porovnáváme vzorky mutantního úseku CyaA (1530-1680), který obsahuje jen jeden tryptofan, a úseku CyaA (1530.1680), který obsahuje oba tryptofany.

## 5. DISKUZE

### 5.1. Vstup sodných kationtů do makrofágů J774A.1

Adenylát-cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, který je klíčovým virulencním faktorem této bakterie, má mnoho funkcí. Tvoří kation-selektivní póry (Benz, et al., 1994b), které mohou způsobit koloidně osmotickou lyzi buněk (Bellalou, et al., 1990). Dále může translokovat svoji adenylát-cyklázovou doménu do cytosolu hostitelských buněk a po aktivaci buněčným kalmodulinem (Wolff, et al., 1980) katalyzovat přeměnu ATP na cAMP, které jako druhý posel výrazně ovlivňuje signalizaci cílových buněk a může spustit apoptózu. Translokace AC domény a kanálo-tvorná aktivita jsou na sobě nezávislé děje, a je možné je od sebe do jisté míry oddělit (Basler, et al., 2006; Osicková, et al., 1999).

Adenylát-cyklázový toxin způsobuje na membráně buněk s CD11b/CD18 integrinem, který je receptorem pro CyaA (Guermontez, et al., 2001), tok iontů. Translokace adenylát-cyklázové domény do cytosolu buněk je zodpovědná za vstup vápenatých kationtů do makrofágů J774A.1, buněk s CD11b/CD18 integrinem. Původně se mělo za to, že je za to zodpovědná jeho kanálotvorná aktivita nebo je to výsledek otevření iontových kanálů na cytoplazmatické membráně hostitelských buněk, nebo na membráně endoplazmatického retikula, ale bylo ukázáno, že ke vstupu vápenatých kationtů dochází při translokaci AC domény přes hostitelskou membránu (Fiser, et al., 2007). Hemolyzinová doména, která vykazuje kanálotvornou aktivitu, je zodpovědná za únik draselných kationtů z buněk (Pospisilova, 2010).

Různá koncentrace sodných kationtů v savčích systémech v extracelulární (145 mM) a intracelulární (12 mM) prostoru tvoří koncentrační gradient, který přispívá k membránovému potenciálu buněk, jehož udržování je nezbytné pro mnoho buněčných dějů. Benz (1994b) zkoumal na černých lipidových membránách mimo jiné vodivost (G), charakterizující prostup iontu kanálem vytvořeným CyaA. Mezi teflonovými komůrkami byla vytvořena jednovrstevná lipidová membrána s membránovým potenciálem 50 mV (přibližuje se fyziologické hodnotě, která je také důležitá pro integraci CyaA do buněk (Menestrina, et al., 1987)), do které se spontánně integrovaly 1-2 molekuly CyaA. Pro NaCl byla získána hodnota vodivosti 18 pS při 1 M koncentraci. Pro KCl byla hodnota vodivosti za stejných podmínek 27 pS. S jakou selektivitou prochází sodné kationty nebylo zjišťováno, ale bylo potvrzeno, že kanálem můžou procházet.

Mým cílem bylo zjistit zda a jakým způsobem sodné kationty vstupují do buněk s J774A.1 s CD11b/CD18 integrinem opůsobené CyaA a doplnit tak chybějící dílek v obrazu ovlivňování iontové rovnováhy makrofágů J774A.1 adenylát-cyklázovým toxinem. Jako moji předchůdci (Fiser, 2003; Pospisilova, 2010) jsem se rozhodla použít pro tento účel fluorescenční spektrofotometrii, a sice měření poměru emisních vlnových délek buněk obarvených fluorescenční SBFI/AM. Fluorescenční sondou SBFI/AM se mi nepodařilo měřit vstup sodných kationtů do buněk makrofágů J774A.1 po přidání toxinu CyaA. Hlavním problémem byla velká intenzita autofluorescence buněk vůči fluorescenci sondy SBFI/AM. Sonda SBFI/AM je excitována vlnovými délkami, které jsou blízké UV oblasti (Lakowicz, 2006). To je i důvodem vysoké autofluorescence buněk, protože při takové excitaci je zvyšována intenzita emise fluoroforů obsažených v buňce, např. aminokyseliny s aromatickým postranním řetězcem, NAD, NADP, či flavinové koenzymy (Monici, 2005). Rozhodla jsem se tedy použít způsob měření jinou fluorescenční sondou, a sice Sodium Green. Tato sonda by měla vykazovat zkrácení doby dohasínání, při vazbě sodných kationtů (Minta and Tsien, 1989). Touto sondou jsem ale nebyla schopna nabarvit makrofágy J774A.1, protože sonda na jejich povrchu agregovala. Kvůli metodickým problémům jsem tedy nebyla schopná potvrdit ani vyvrátit vstup sodných kationtů do buněk J774A.1 aktivitou CyaA, natož mechanismus jejich vstupu.

Existuje ještě několik dalších fluorescenčních sond, které by se daly použít pro měření koncentrace sodných kationtů uvnitř buněk. Například CoroNa Green, která ovšem z obarvených buněk při měření uniká a má nižší selektivitu pro sodné kationty než SBFI/AM (Meier, et al., 2006) nebo nedávno vyvinutá sonda ANG, která je intenzitně závislá na zvyšování koncentrace sodných kationtů a je používána při měřeních *in vivo* (Lamy and Chatton, 2011), která by mohla být naším dalším nástrojem pro zkoumání změn vnitrobuněčné koncentrace sodných kationtů.

Dále by se nabízela metoda patch-clamp. Naše laboratoř ale nedisponuje tímto zařízením.

## **5.2. Oligomerizace CyaA toxinu v roztoku a v membránách**

Přesná specifikace působení adenylát-cyklázového toxinu na membránu cílových buněk je velmi aktuálním tématem. Adenylát-cyklázový toxin je totiž vhodným nástrojem k dopravě antigenů do buněk imunitního systému s cílem navodit imunitu k infekcím a pro vývoj nových postupů v imunoterapii nádorů. Doprava antigenů do buněk imunitního systému je již zkoumána u myši (Dadaglio, et al., 2003; Dadaglio, et al., 2000; Fayolle, et

al., 2004; Fayolle, et al., 2010; Fayolle, et al., 1999; Fayolle, et al., 2001; Karimova, et al., 1998; Loucka, et al., 2002; Mascarell, et al., 2006).

Adenylát-cyklázový toxin patří do rodiny RTX toxinů hemolyzinů. Toxin HlyA, nejprozkoumanější zástupce RTX hemolyzinů, působí jako oligomer při hemolýze (Ludwig, et al., 1993) i při kanálotvorné aktivitě v černých lipidových membránách (Benz, et al., 1989). Na černých lipidových membránách působí jako oligomery i HlyA *Proteus vulgaris*, HlyA *Morganella morganii* (Benz, et al., 1994a) či ApxI A *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Maier, et al., 1996). Adenylát-cyklázový toxin má dvě na sobě nezávisle fungující podjednotky (Basler, et al., 2006): Adenylát-cyklázovou doménu a RTX hemolyzinovou doménu. Nedávno byl vytvořen model působení CyaA na membránu hostitelských buněk, který předpokládá současnou existenci dvou různých konformerů/prekursorů v membráně hostitelské buňky. Jeden konformer translokuje adenylát-cyklázovou doménu do cytozolu hostitelské buňky, vpouští při tom vápenaté kationty do cytozolu (Fiser, et al., 2007) a funguje jako monomer (Gray, et al., 1998). Druhý konformer vytvoří hemolyzinový kanál, který vypouští draselné kationty z hostitelské buňky a způsobuje koloidně osmotickou lyzi erytrocytů (Osicková, et al., 1999; Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). Oligomerizace kanálotvorného prekursoru byla prokázána na několika membránových systémech bez integrinu, ale na membránách s integrinem CD11b/CD18, který funguje jako receptor pro CyaA (Guermonprez, et al., 2001), ještě ne. Také není jasné, zda kanálotvorný prekursor oligomerizuje před vstupem do hostitelské membrány, nebo až po něm. Mým cílem tedy bylo potvrdit oligomerizaci na různých typech membrán, včetně membrán izolovaných z makrofágů J774A.1, které na svém povrchu exprimují CD11b/CD18 integrin, a pokusit se určit, zda k oligomerizaci CyaA dochází před, nebo po vstupu do membrány. Oligomerizace byla sledována pomocí fluorescenčního rezonančního přenosu energie měřením doby dohasínání donoru v časovém rozlišení. K FRETu dochází, pokud jsou molekuly s vhodnými spektrálními charakteristikami dostatečně blízko sebe, tedy i v případě oligomerů.

### 5.2.1. Oligomerizace CyaA-detox v roztoku

Naše měření neprokázala oligomerizaci v TNE pufru. Pokus v roztoku jsme dělali především proto, abychom měli představu o dobách dohasínání samotného donoru a donoru s akceptorem navázaných na jedné molekule CyaA-detox (pozitivní kontrola) a vlivu vápenatých kationtů na tyto hodnoty. Pozitivní kontrola vykazovala zkrácení doby

dohasínání o 15 % vzhledem k době dohasínání samotného donoru. Zkrácení doby dohasínání donoru s akceptorem navázaným na stejné molekule CyaA-detox bez vápenatých kationtů bylo pouze 13 % vzhledem k době dohasínání samotného donoru. To naznačuje že molekula CyaA-detox má kompaktnější konformaci s vápenatými kationty a je to v souladu s publikacemi zabývajícími se konformací CyaA (Chenal, et al., 2009). Zkrácení doby života by mělo být pro zodpovězení otázky zda k oligomerizaci dochází nebo ne.

### **5.2.2. Oligomerizace CyaA-detox na lipozomech**

Lipozomy jako modelové membrána pro vazbu RTX hemolyzinů nejsou ideální, protože neodrážejí zcela přesně interakci toxinu s membránou buněk. Například  $\alpha$ -hemolyzin *E. coli* nepotřebuje pro vazbu do membrány lipozomu vápenaté kationty ani posttranslační modifikaci (acylaci), které jsou jinak nezbytné pro hemolytickou aktivitu tohoto toxinu (Boehm, et al., 1990; Stanley, et al., 1994). Působení adenylát-cyklázového toxinu na nich zkoumal Mašín a porovnával ho s působením CyaA na erythrocyty. Z jeho výsledků vyplývá, že lipozomy nejsou relevantním *in vitro* systémem pro zkoumání CyaA, protože CyaA vyžaduje jiné podmínky pro vazbu na lipozomy než pro vazbu na erythrocyty (Masin, et al., 2004). Působení adenylát-cyklázového toxinu na lipozomy zkoumal i Radovan Fišer ve své diplomové práci a při vysvětlování kinetiky uvolňování obsahu lipozomů působením CyaA použil Hillovu rovnici pro zkoumání oligomerizace CyaA. Jeho výsledky naznačují, že by se mělo jednat o monomery (Fiser, 2003; Fiser and Konopasek, 2009). Oligomerizaci na lipozomech jsem zkoumala hlavně proto, abych potvrdila, že na lipozomech k oligomerizaci nedochází. Oligomerizaci na lipozomech z DMPC lipidů jsem nakonec skutečně neprokázala.

### **5.2.3. Oligomerizace CyaA-detox na izolovaných membránách obsahujících integrin CD11b/CD18**

V roce 2009 byl proveden první přímý důkaz, že CyaA tvoří na buněčné membráně erythrocytů oligomery (Vojtova-Vodolanova, et al., 2009). Membrány erythrocytů ale neobsahují CD11b/CD18 integrin, na který se CyaA váže s mnohem větší afinitou než na membrány bez integrinu (Guermonprez, et al., 2001). Posledním systémem, na kterém



jsem zkoumala oligomerizaci CyaA tedy byly membrány izolované z makrofágů J774A.1, které na svém povrchu integrin CD11b/CD18 exprimují. Na izolovaných membránách jsem měřením FRET v časovém rozlišení neprokázala oligomerizaci CyaA-detox. Bylo ověřeno, že se toxin do izolovaných membrán vázal. Nemohu ale vyloučit, že se tam vázal jiným způsobem, než na živé buňky, protože integrin mohl být izolací membrán poškozen. Integrace CyaA do membrán může být navíc ovlivněna membránovým potenciálem buňky (Knapp, et al., 2008), který na izolovaných membránách nebyl vytvořen.

Do budoucna bychom mohli uvažovat o měření oligomerizace CyaA na membránách živých makrofágů metodou použitou v této práci. Bylo by ale vhodné použít jiný pár fluorescenčních sond. Pomocí techniky fluorescenční korelační spektroskopie, kterou jsme měli možnost použít u profesora Martina Hofa na ústavu fyzikální chemie, jsme zjistili, že se Alexa Fluor 488 navázaná na CyaA-detox rychle vyběluje a CyaA-detox-A488 se na membráně makrofágů J774A.1 pohybuje pomalu na to, aby byl vznik oligomerů na membráně měřitelný před vybělením sondy. Také by bylo vhodné barvit molekuly CyaA sondami s větším přesahem emisního spektra donoru s excitačním spektrem akceptoru pro FRET. Tím by se zvýšilo rozlišení a přesnost metody, kterou jsme používali.

Pro měření oligomerizace bychom mohli využít měření homoFRET pomocí sledování anizotropie podobně, jako je popsáno ve výsledcích v kapitole 4.3. Jen by se místo homoFRET tryptofanů měřila CyaA obarvený vhodnou sondou. Tento postup už byl úspěšně použit (Ganguly, et al., 2011).

## 6. SOUHRN

Ve své práci jsem zkoumala působení na buňky, oligomerizaci a konformaci adenylát-cyklázového toxinu (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*. Ke splnění svých cílů jsem používala především fluorescenční metody.

Mým první cílem bylo zjistit zda CyaA způsobuje vstup sodných kationtů do makrofágů J774A.1 pomocí fluorescenčních sond SBFI/AM a SG/TA. Tento cíl se mi nepodařilo splnit, protože:

- emise sondy SBFI/AM nebyla dostatečně vysoká v porovnání s emisí buněk, které tak tvořily, příliš velké pozadí.
- sonda SG/TA nevstupovala do makrofágů J774A.1.

Mým dalším cílem bylo zkoumat oligomerizaci CyaA na různých membránových systémech metodou FRET měřenou v časovém rozlišení. Zjistila jsem že:

- k oligomerizaci CyaA nedochází v použitém TNE pufru.
- k oligomerizaci CyaA nedochází na lipozomech.
- k oligomerizaci CyaA nedochází na membránách izolovaných z makrofágů J774A.1, které na svém povrchu exprimují CD11b/CD18 integrin.

Mým posledním cílem bylo zkoumat interakci dvou tryptofanů, které leží na C-konci CyaA a jejich „stacking“ interakce by mohla být na počátku balení CyaA do nativní konformace. Tyto pokusy nejsou dokončené, budu v nich pokračovat v rámci doktorského studia.

## 7. SEZNAM LITERATURY

- Aronoff, D.M., Canetti, C. and Peters-Golden, M., (2004). 'Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP'. *J Immunol*, 173 (1):559-565.
- Aronoff, D.M., Canetti, C., Serezani, C.H., Luo, M. and Peters-Golden, M., (2005). 'Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1'. *J Immunol*, 174 (2):595-599.
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L. and Goodwin, M.S., (1991). 'Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation'. *J Bacteriol*, 173 (2):720-726.
- Basler, M., Masin, J., Osicka, R. and Sebo, P., (2006). 'Pore-forming and enzymatic activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes'. *Infect Immun*, 74 (4):2207-2214.
- Bejerano, M., Nisan, M., Ludwig, A., Goebel, W. and Hanski, E., (1999). 'Characterization of the C-terminal domain essential for toxic activity of adenylate cyclase toxin'. *Mol Microbiol*, 31:381-392.
- Bellalou, J., Sakamoto, H., Ladant, D., Geoffroy, C. and Ullmann, A., (1990). 'Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase'. *Infect Immun*, 58 (10):3242-3247.
- Benz, R., Hardie, K.R. and Hughes, C., (1994a). 'Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of Proteus vulgaris and Morganella morganii'. *Eur J Biochem*, 220 (2):339-347.
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A. and Sebo, P., (1994b). 'Adenylate cyclase toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli'. *J Biol Chem*, 269 (44):27231-27239.
- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W. and Goebel, W., (1989). 'Pore Formation by the Escherichia coli Haemolysin: Evidence for an Association-Dissociation Equilibrium of the Pore-Forming Aggregates'. *Infect Immun*, 57:887-895.
- 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'. *Infect Immun*, 61 (9):3583-3589.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.M. and Holland, I.B., (1986). 'Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores'. *Infect Immun*, 52 (1):63-69.

- Boehm, D.F., Welch, R.A. and Snyder, I.S., (1990). 'Calcium is required for binding of Escherichia coli hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes'. *Infect Immun*, 58 (6):1951-1958.
- Boyd, A.P., Ross, P.J., Conroy, H., Mahon, N., Lavelle, E.C. and Mills, K.H., (2005). 'Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin modulates innate and adaptive immune responses: distinct roles for acylation and enzymatic activity in immunomodulation and cell death'. *J Immunol*, 175 (2):730-738.
- Bradford, M.M., (1976). 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding'. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Bumba, L., Masin, J., Fiser, R. and Sebo, P., (2010). 'Bordetella adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps'. *PLoS Pathog*, 6 (5):e1000901.
- Burrige, K. and Chrzanowska-Wodnicka, M., (1996). 'Focal adhesions, contractility, and signaling'. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12:463-518.
- Carbonetti, N.H., (2010). 'Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of Bordetella pertussis and cell biology tools'. *Future Microbiol*, 5 (3):455-469.
- Cavalieri, S.J., Bohach, G.A. and Snyder, I.S., (1984). 'Escherichia coli alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity'. *Microbiol Rev*, 48 (4):326-343.
- 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 Microbiol Rev*, 8 (2):137-161.
- Cortajarena, A.L., Goni, F.M. and Ostolaza, H., (2001). 'Glycophorin as a receptor for Escherichia coli alpha-hemolysin in erythrocytes'. *J Biol Chem*, 276 (16):12513-12519.
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L. and Manclark, C.R., (1979). 'Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of Bordetella pertussis'. *Infect Immun*, 25 (3):896-901.
- Dadaglio, G., Morel, S., Bauche, C., Moukrim, Z., Lemonnier, F.A., Van Den Eynde, B.J., Ladant, D. and Leclerc, C., (2003). 'Recombinant adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA\*0201-restricted melanoma epitopes'. *Int Immunol*, 15 (12):1423-1430.
- Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P. and Leclerc, C., (2000). 'Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of Bordetella pertussis'. *Infect Immun*, 68 (7):3867-3872.
- Demchenko, A.P., (2002). 'The red-edge effects: 30 years of exploration'. *Luminescence*, 17 (1):19-42.

- Dent, G., Giembycz, M.A., Rabe, K.F., Wolf, B., Barnes, P.J. and Magnussen, H., (1994). 'Theophylline suppresses human alveolar macrophage respiratory burst through phosphodiesterase inhibition'. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10 (5):565-572.
- Dinarelo, C.A., (1998). 'Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme'. *Ann N Y Acad Sci*, 856:1-11.
- Dunne, A., Ross, P.J., Pospisilova, E., Masin, J., Meaney, A., Sutton, C.E., Iwakura, Y., Tschopp, J., Sebo, P. and Mills, K.H., (2010). 'Inflammasome activation by adenylate cyclase toxin directs Th17 responses and protection against *Bordetella pertussis*'. *J Immunol*, 185 (3):1711-1719.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. and Leclerc, C., (2003). 'Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain'. *J Biol Chem*, 278 (40):38514-38521.
- Fabiánová, K., Kříž, B. and Beneš, Č., (2009). 'Vývoj onemocnění pertusí v ČR v letech 1982-2009'. In: Státní zdravotní ústav, Č. (ed): Zprávy Epidemiologie a Mikrobiologie, 368-370.
- Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D. and Leclerc, C., (2004). '*Bordetella pertussis* adenylate cyclase delivers chemically coupled CD8+ T-cell epitopes to dendritic cells and elicits CTL in vivo'. *Vaccine*, 23 (5):604-614.
- Fayolle, C., Davi, M., Dong, H., Ritzel, D., Le Page, A., Knipping, F., Majlessi, L., Ladant, D. and Leclerc, C., (2010). 'Induction of anti-Tat neutralizing antibodies by the CyaA vector targeting dendritic cells: influence of the insertion site and of the delivery of multicopies of the dominant Tat B-cell epitope'. *Vaccine*, 28 (42):6930-6941.
- Fayolle, C., Ladant, D., Karimova, G., Ullmann, A. and Leclerc, C., (1999). 'Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope'. *J Immunol*, 162 (7):4157-4162.
- Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M.J., Saron, M.F., Sebo, P. and Leclerc, C., (2001). 'Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity'. *J Virol*, 75 (16):7330-7338.
- Fink, S.L. and Cookson, B.T., (2005). 'Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells'. *Infect Immun*, 73 (4):1907-1916.
- Finn, T.M. and Stevens, L.A., (1995). 'Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant'. *Mol Microbiol*, 16 (4):625-634.
- Fiser, R., (2003). 'Adenylátcyklázový toxin bakterie *Brodetella pertussis* a jeho interakce s biologickou membránou'. *Přírodovědecká fakulta Katedra genetiky a mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova, 131.

- Fiser, R. and Konopasek, I., (2009). 'Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* and CyaA from *Bordetella pertussis*'. *Biochim Biophys Acta*, 1788 (6):1249-1254.
- 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<sup>+</sup> monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities'. *J Biol Chem*, 282 (5):2808-2820.
- Fiser, R., Masin, J., Bumba, L., Pospisilova, E., Fayolle, C., Basler, M., Sadilkova, L., Adkins, I., Kamanova, J., Cerny, J., Konopasek, I., Osicka, R., Leclerc, C. and Sebo, P., (zasláno k publikaci). 'Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores'.
- Frey, J., Meier, R., Gygi, D. and Nicolet, J., (1991). 'Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*'. *Infect Immun*, 59 (9):3026-3032.
- Ganguly, S., Clayton, A.H. and Chattopadhyay, A., (2011). 'Organization of higher-order oligomers of the serotonin(A) receptor explored utilizing homo-FRET in live cells'. *Biophys J*, 100 (2):361-368.
- Gill, D.M., (1978). *Bacterial Toxins and Cell Membranes*. New York: Academic Press.
- Glaser, P., Danchin, A., Ladant, D., Barzu, O. and Ullmann, A., (1988). '*Bordetella pertussis* adenylate cyclase: the gene and the protein'. *Tokai J Exp Clin Med*, 13 239-252.
- Goldman, W.E., Klapper, D.G. and Baseman, J.B., (1982). 'Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells'. *Infect Immun*, 36 (2):782-794.
- Gordon, V.M., Young Jr., 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'. *J Biol Chem*, 264:14792-14796.
- Gray, M., Szabo, G., Otero, A.S., Gray, L. and Hewlett, E., (1998). 'Distinct mechanisms for K<sup>+</sup> efflux, intoxication, and hemolysis by *Bordetella pertussis* AC toxin'. *J Biol Chem*, 273 (29):18260-18267.
- Gueirard, P., Druilhe, A., Pretolani, M. and Guiso, N., (1998). 'Role of adenylate cyclase-hemolysin in alveolar macrophage apoptosis during *Bordetella pertussis* infection in vivo'. *Infect Immun*, 66 (4):1718-1725.
- Guermonprez, P., Fayolle, C., Rojas, M.J., Rescigno, M., Ladant, D. and Leclerc, C., (2002). 'In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>alpha-CD11b(high) dendritic cells'. *Eur J Immunol*, 32 (11):3071-3081.
- Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D. and Leclerc, C., (2001). 'The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the alpha(M)beta(2) Integrin (CD11b/CD18)'. *J Exp Med*, 193 (9):1035-1044.

Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.S., Gibbs, C.S., Mrksich, M. and Tang, W.J., (2005). 'Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenyl cyclase toxin with calmodulin'. *Embo J*, 24 (18):3190-3201.

Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hewlett, E.L., (1994). 'Internal Lysine Palmitoylation in Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*'. *Science*, 266:433-435.

Hanski, E., (1989). 'Invasive adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis'. *Trends Biochem Sci*, 14 (11):459-463.

Hardie, K.R., Issartel, J.P., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V., (1991). 'In vitro activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide'. *Mol Microbiol*, 5 (7):1669-1679.

Haugland, R.P., (2002). 'Handbook of fluorescent probes and research products'. 1.3 Alexa Fluor Dyes: Simply the Best. Göttingen, Germany: Molecular Probes, Inc.

Hewlett, E.L., (1997). 'Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention'. *Pediatr Infect Dis J*, 16 (4 Suppl):S78-84.

Hewlett, E.L., Donato, G.M. and Gray, M.C., (2006). 'Macrophage cytotoxicity produced by adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis: more than just making cyclic AMP!'. *Mol Microbiol*, 59 (2):447-459.

Hewlett, E.L., Gray, L., Allietta, M., Ehrmann, I.E., Gordon, V.M. and Gray, M.C., (1991). 'Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity'. *J. Biol. Chem.*, 266:17503-17508.

Higgins, C.F., (1992). 'ABC transporters: from microorganisms to man'. *Annu Rev Cell Biol*, 8:67-113.

Hyland, C., Vuillard, L., Hughes, C. and Koronakis, V., (2001). 'Membrane interaction of Escherichia coli hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles'. *J Bacteriol*, 183 (18):5364-5370.

Chenal, A., Guijarro, J.I., Raynal, B., Delepierre, M. and Ladant, D., (2009). 'RTX calcium binding motifs are intrinsically disordered in the absence of calcium: implication for protein secretion'. *J Biol Chem*, 284 (3):1781-1789.

Inohara, Chamailard, McDonald, C. and Nunez, G., (2005). 'NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease'. *Annu Rev Biochem*, 74:355-383.

Issartel, J.P., Koronakis, V. and Hughes, C., (1991). 'Activation of Escherichia coli prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation'. *Nature*, 351 (6329):759-761.

Iwaki, M., Ullmann, A. and Sebo, P., (1995). 'Identification by in vitro complementation of regions required for cell-invasive activity of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin'. *Mol Microbiol*, 17 (6):1015-1024.

- Kaplan, J.H., Kennedy, B.G. and Somlyo, A.P., (1987). 'Calcium-stimulated sodium efflux from rabbit vascular smooth muscle'. *J Physiol*, 388:245-260.
- Karimova, G., Fayolle, C., Gmira, S., Ullmann, A., Leclerc, C. and Ladant, C., (1998). 'Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: Implication for the in vivo delivery of CD8<sup>+</sup> T cell epitopes into antigen-presenting cells'. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:12532-12537.
- Katada, T., Tamura, M. and Ui, M., (1983). 'The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein'. *Arch Biochem Biophys*, 224 (1):290-298.
- Khelef, N., Sakamoto, H. and Guiso, N., (1992). 'Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection'. *Microb Pathog*, 12 (3):227-235.
- Knapp, O., Maier, E., Masin, J., Sebo, P. and Benz, R., (2008). 'Pore formation by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin in lipid bilayer membranes: role of voltage and pH'. *Biochim Biophys Acta*, 1778 (1):260-269.
- Ladant, D., Glaser, P. and Ullmann, A., (1992). 'Insertional mutagenesis of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase'. *J Biol Chem*, 267 (4):2244-2250.
- Ladant, D. and Ullmann, A., (1999). '*Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents'. *Trends Microbiol*, 7 (4):172-176.
- Lakowicz, J.R., (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer Science + Business Media, LLC.
- Lally, E.T., Hill, R.B., Kieba, I.R. and Korostoff, J., (1999). 'The interaction between RTX toxins and target cells'. *Trends Microbiol*, 7 (9):356-361.
- Lamy, C.M. and Chatton, J.Y., (2011). 'Optical probing of sodium dynamics in neurons and astrocytes'. *Neuroimage*, 58 (2):572-578.
- Lee, S.J., Gray, M.C., Zu, K. and Hewlett, E.L., (2005). 'Oligomeric behavior of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin in solution'. *Arch Biochem Biophys*, 438 (1):80-87.
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., Prochazkova, K., Adkins, I., Hejnova-Holubova, J., Sadilkova, L., Morova, J. and Sebo, P., (2010). 'RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism'. *FEMS Microbiol Rev*, 34 (6):1076-1112.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L. and Darnell, J., (2005). *Molecular Cell Biology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C. and Sebo, P., (2002). 'Delivery of a Male CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase'. *Infect Immun*, 70 (2):1002-1005.



- Ludwig, A., Benz, R. and Goebel, W., (1993). 'Oligomerization of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is involved in pore formation'. *Mol Gen Genet*, 241:89-96.
- Ludwig, A., Jarchau, T., Benz, R. and Goebel, W., (1988). 'The repeat domain of *Escherichia coli* haemolysin (HlyA) is responsible for its Ca<sup>2+</sup>-dependent binding to erythrocytes'. *Mol Gen Genet*, 214 (3):553-561.
- Luker, K.E., Collier, J.L., Kolodziej, E.W., Marshall, G.R. and Goldman, W.E., (1993). 'Bordetella pertussis tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (6):2365-2369.
- Maier, E., Reinhard, N., Benz, R. and Frey, J., (1996). 'Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*'. *Infect Immun*, 64 (11):4415-4423.
- Martin, M.M., Lindqvist L., (1975). 'The pH Dependence Of Fluorescein Fluorescence'. *Journal of Luminescence*, 381-390.
- Mascarell, L., Bauche, C., Fayolle, C., Diop, O.M., Dupuy, M., Nougarede, N., Perraut, R., Ladant, D. and Leclerc, C., (2006). 'Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates'. *Vaccine*, 24 (17):3490-3499.
- Masin, J., (1999). 'Studium adenylát-cyklázového toxinu bakterie *Bordetella pertussis* fluorescenčními metodami'. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Katedra genetiky a mikrobiologie*. Praha: Karlova univerzita, 86.
- Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C. and Sebo, P., (2005). 'Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells'. *Biochemistry*, 44 (38):12759-12766.
- Masin, J., Konopasek, I., Svobodova, J. and Sebo, P., (2004). 'Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte and liposome membranes'. *Biochim Biophys Acta*, 1660 (1-2):144-154.
- Meier, S.D., Kovalchuk, Y. and Rose, C.R., (2006). 'Properties of the new fluorescent Na<sup>+</sup> indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na<sup>+</sup> imaging'. *J Neurosci Methods*, 155 (2):251-259.
- Menestrina, G., (1988). '*Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism'. *FEBS Lett*, 232 (1):217-220.
- Menestrina, G., Mackman, N., Holland, I.B. and Bhakdi, S., (1987). '*Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes'. *Biochim Biophys Acta*, 905 (1):109-117.
- Minta, A. and Tsien, R.Y., (1989). 'Fluorescent indicators for cytosolic sodium'. *J Biol Chem*, 264 (32):19449-19457.

- Moens, P.D., Helms, M.K. and Jameson, D.M., (2004). 'Detection of tryptophan to tryptophan energy transfer in proteins'. *Protein J*, 23 (1):79-83.
- Monici, M., (2005). 'Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications'. *Biotechnol Annu Rev*, 11:227-256.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J. and Sebo, P., (2008). 'RTX cytotoxins recognize beta2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (14):5355-5360.
- Novotny, P., Chubb, A.P., Cownley, K., Montaraz, J.A. and Beesley, J.E., (1985). 'Bordetella adenylate cyclase: a genus specific protective antigen and virulence factor'. *Dev Biol Stand*, 61:27-41.
- Osicka, R., Osicková, 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'. *Infect Immun*, 68 (1):247-256.
- Osicková, 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'. *J Biol Chem*, 274 (53):37644-37650.
- Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F. and Tschopp, J., (2007). 'Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration'. *Cell Death Differ*, 14 (9):1583-1589.
- Pospisilova, E., (2010). '*Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: mechanism of potassium efflux from macrophages - Adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*: mechanismus úniku draselných iontů z makrofágů'. *Přírodovědecká fakulta Katedra genetiky a mikrobiologie*. Praha: Univerzita Karlova 95.
- Rhodes, C.R., Gray, M.C., Watson, J.M., Muratore, T.L., Kim, S.B., Hewlett, E.L. and Grisham, C.M., (2001). 'Structural consequences of divalent metal binding by the adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis'. *Arch Biochem Biophys*, 395 (2):169-176.
- Rogel, A., Meller, R. and Hanski, E., (1991). 'Adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis'. *J Biol Chem*, 266:3154-3161.
- Ropele, M. and Menestrina, G., (1989). 'Electrical properties and molecular architecture of the channel formed by Escherichia coli hemolysin in planar lipid membranes'. *Biochim Biophys Acta*, 985 (1):9-18.
- Rose, T., Sebo, P., Bellalou, J. and Ladant, D., (1995). 'Interaction of calcium with Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin. Characterization of multiple calcium-binding sites and calcium- induced conformational changes'. *J Biol Chem*, 270 (44):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'. *Clin Exp Immunol*, 92 (2):181-184.
- Rowe, J., Finlay-Jones, J.J., Nicholas, T.E., Bowden, J., Morton, S. and Hart, P.H., (1997). 'Inability of histamine to regulate TNF-alpha production by human alveolar macrophages'. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17 (2):218-226.
- Sato, Y., Cowell, J.L., Sato, H., Burstyn, D.G. and Manclark, C.R., (1983). 'Separation and purification of the hemagglutinins from Bordetella pertussis'. *Infect Immun*, 41 (1):313-320.
- 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'. *Mol Microbiol*, 9 (5):999-1009.
- Singer, A., Wonnemann, M. and Muller, W.E., (1999). 'Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>'. *J Pharmacol Exp Ther*, 290 (3):1363-1368.
- Soloaga, A., Ramirez, J.M. and Goni, F.M., (1998). 'Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of Escherichia coli alpha-hemolysin, a protein stable in 6 M urea'. *Biochemistry*, 37 (18):6387-6393.
- Sotomayor Perez, A.C., Karst, J.C., Davi, M., Guijarro, J.I., Ladant, D. and Chenal, A., (2010). 'Characterization of the regions involved in the calcium-induced folding of the intrinsically disordered RTX motifs from the bordetella pertussis adenylate cyclase toxin'. *J Mol Biol*, 397 (2):534-549.
- Squire, A., Verveer, P.J., Rocks, O. and Bastiaens, P.I., (2004). 'Red-edge anisotropy microscopy enables dynamic imaging of homo-FRET between green fluorescent proteins in cells'. *J Struct Biol*, 147 (1):62-69.
- Stanley, P., Koronakis, V. and Hughes, C., (1991). 'Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of Escherichia coli haemolysin'. *Mol Microbiol*, 5 (10):2391-2403.
- Stanley, P., Packman, L.C., Koronakis, V. and Hughes, C., (1994). 'Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin'. *Science*, 266 (5193):1992-1996.
- Sutterwala, F.S., Ogura, Y. and Flavell, R.A., (2007). 'The inflammasome in pathogen recognition and inflammation'. *J Leukoc Biol*, 82 (2):259-264.
- Szabo, G., Gray, M.C. and Hewlett, E.L., (1994). 'Adenylate Cyclase Toxin from Bordetella pertussis Produces Ion Conductance across Artificial Lipid Bilayers in a Calcium and Polarity-dependent Manner'. *J Biol Chem*, 269 (36):22496-22499.
- Szmacinski, H. and Lakowicz, J.R., (1997). 'Sodium Green as a potential probe for intracellular sodium imaging based on fluorescence lifetime'. *Anal Biochem*, 250 (2):131-138.

- Tamura, M., Nogimori, K., Murai, S., Yajima, M., Ito, K., Katada, T., Ui, M. and Ishii, S., (1982). 'Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model'. *Biochemistry*, 21 (22):5516-5522.
- Valeva, A., Walev, I., Kemmer, H., Weis, S., Siegel, I., Boukhallouk, F., Wassenaar, T.M., Chavakis, T. and Bhakdi, S., (2005). 'Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent'. *J Biol Chem*, 280 (44):36657-36663.
- Varma, R. and Mayor, S., (1998). 'GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface'. *Nature*, 394 (6695):798-801.
- Vojtova-Vodolanova, J., Basler, M., Osicka, R., Knapp, O., Maier, E., Cerny, J., Benada, O., Benz, R. and Sebo, P., (2009). 'Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin'. *Faseb J*, 23 (9):2831-2843.
- Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P., (2006). 'Bordetella adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense'. *Curr Opin Microbiol*, 9 (1):69-75.
- Weber, G., (1960). 'Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan and related compounds'. *Biochem J*, 75:335-345.
- Weber, G. and Shinitzky, M., (1970). 'Failure of Energy Transfer between Identical Aromatic Molecules on Excitation at the Long Wave Edge of the Absorption Spectrum'. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 65 (4):823-830.
- Weiss, A.A. and Goodwin, M.S., (1989). 'Lethal infection by Bordetella pertussis mutants in the infant mouse model'. *Infect Immun*, 57 (12):3757-3764.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A. and Falkow, S., (1984). 'Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of Bordetella pertussis'. *J Infect Dis*, 150 (2):219-222.
- Welch, R.A., (1991). 'Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria'. *Mol Microbiol*, 5 (3):521-528.
- Welch, R.A., (2001). 'RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology'. *Curr Top Microbiol Immunol*, 257:85-111.
- Westrop, G.D., Hormozi, E.K., Da Costa, N.A., Parton, R. and Coote, J.G., (1996). 'Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: proCyaA and CyaC proteins synthesised separately in Escherichia coli produce active toxin in vitro'. *Gene*, 180 (1-2):91-99.
- Wolff, J., Cook, G.H., Goldhammer, A.R. and Berkowitz, S.A., (1980). 'Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase'. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:3841-3844.
- Wu, P. and Brand, L., (1994). 'Resonance energy transfer: methods and applications'. *Anal Biochem*, 218 (1):1-13.
- Yan, B., Calderwood, D.A., Yaspan, B. and Ginsberg, M.H., (2001). 'Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain'. *J Biol Chem*, 276 (30):28164-28170.