

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

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Eliška Doktorová

**Vliv vápenatých iontů a cholesterolu na kanálotvornou aktivitu
Adenylát-cyklázového toxinu**

**Effect of calcium ions and cholesterol on channel forming activity
of Adenylate-cyclase toxin**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Radovan Fišer, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, dne 6. 5. 2013

.....

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D., za pomoc při vypracování mé diplomové práce. Především za jeho trpělivost.

Velký dík patří mým rodičům za podporu během celého mého studia. Také děkuji mému příteli Zdeňkovi Jankovskému za pochopení a trpělivost při sepsání diplomové práce.

Abstrakt

Adenylát-cyklázový toxin (CyaA) je jedním z hlavních virulenčních faktorů bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje onemocnění černý kašel. CyaA působí na hostitelskou buňku dvěma možnými, na sobě nezávislými, způsoby. Jedním je tvorba malých kationt-selektivních kanálů, která může vést až ke koloidně osmotické lyzi cílových buněk. Druhým je rozvrat buněčné signalizace po translokaci adenylát-cyklázové (AC) domény do cytozolu hostitelské buňky, což vede k přeměně ATP na cyklické AMP.

V nedávné době bylo dokázáno, že cholesterol má vliv na průběh endocytózy CyaA. CyaA translokuje svou AC doménu až po přesunu celé molekuly CyaA do místa bohatého na cholesterol, tzv. lipidového raftu (Bumba et al. 2010). V této práci jsem se zabývala vlivem cholesterolu na kanálotvornou aktivitu a iontovou selektivitu CyaA kanálů. Pro měření byla užívána umělá membrána obohacená o cholesterol.

Kanály CyaA jsou závislé na elektrickém napětí. Pro zabudování molekuly CyaA do membrány je potřeba kladného elektrického napětí na straně toxinu. Snažila jsem se zjistit, zda má hodnota vloženého elektrického napětí na membránu vliv na dobu otevření kanálu a dobu, za kterou se molekula CyaA zabuduje do membrány.

Pro toxickou aktivitu CyaA jsou zásadní vápenaté ionty. Jsou potřeba pro hemolytickou aktivitu i pro přenos AC domény. Druhým cílem této práce bylo zjistit, zda vápenaté ionty prochází kanálem CyaA.

Dalším cílem této práce bylo zjistit velikost CyaA kanálů. Doposud je velikost odhadována na 0,6-0,8 nm. Pro pokusy v této práci jsem používala neelektrolyty, látky bez celkového náboje. Na základě změn ve vodivosti CyaA kanálů lze usuzovat, jak velké molekuly jimi prochází.

Všechny pokusy probíhaly na aparatuře, určené k měření na černých lipidových membránách.

Klíčová slova: Adenylát-cyklázový toxin, *Bordetella pertussis*, CyaA, černé lipidové membrány, lipidový raft, neelektrolyt, vápenaté ionty, elektrické napětí

Abstract

Adenylate cyclase toxin (CyaA) is one of the major virulence factors of bacterium *Bordetella pertussis*, which is a causative agent of whooping cough. CyaA belongs to the family of RTX toxin-hemolysins. The toxin targets primarily cells expressing integrin receptor CD11b/CD18 but it can also penetrate cells lacking this receptor. CyaA acts on host cells by two independent activities. One is formation of small cation-selective channels, which can lead to colloid osmotic lysis of target cells. The second is disruption of cell signaling through the translocation of the adenylate cyclase (AC) domain to host cell cytosol, which leads to the conversion of ATP into cyclic AMP.

It was recently shown that cholesterol affects endocytosis of CyaA. CyaA translocates its AC domain after relocation of CyaA molecule to the cholesterol-rich lipid raft (Bumba et al. 2010). In this work I examined the effect of cholesterol on channel-forming activity and selectivity of ion channels created by CyaA. For measurements I used artificial membranes enriched with cholesterol.

CyaA channels are voltage-dependent. The positive membrane potential on the side of toxin is required for incorporation of CyaA molecule into cell membrane. I tried to find out whether the value of voltage has effect on channels opening time.

Calcium ions are essential for toxic activity of CyaA. CyaA requires calcium ions for formation of hemolytic channels and for folding of RTX domain, delivery of its AC domain into cells. The second objective of this study was to determine whether calcium ions pass through the CyaA channel.

The last aim of this work was to determine the size of CyaA channels. The estimated inner diameter ranges from 0.6 to 0.8 nm, so far. I used nonelectrolytes, uncharged substances, for the experiments in this work. Based on changes in the conductivity of CyaA channels it can be considered how large molecules can pass through pore.

All experiments were carried out on apparatus for measurements on black lipid membranes.

Keywords: Adenylate-cyclase toxin, *Bordetella pertussis*, CyaA, black lipid membranes, lipid raft, nonelectrolyte, calcium ions, voltage

Obsah

Obsah.....	8
Seznam použitých zkratk.....	10
1 Úvod.....	12
2 Přehled literatury.....	14
2.1 RTX hemolyziny.....	14
2.2 <i>Bordetella pertussis</i>	15
2.3 Adenylát-cyklázový toxin.....	17
2.4 Struktura CyaA.....	18
2.4.1 Adenylát-cyklázová (AC) doména CyaA (1-400 AK).....	19
2.4.2 RTX hemolyzinová doména (400-1706 AK).....	19
2.5 Interakce CyaA s hostitelskou membránou.....	21
2.6 Vliv vápenatých iontů na kanálotvornou aktivitu CyaA.....	23
2.7 Závislost aktivity CyaA na napětí.....	25
2.8 Velikost kanálů tvořených CyaA.....	25
2.9 Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA, lipidové rafty.....	26
2.10 Černé lipidové membrány.....	27
3 Materiál a metody.....	29
3.1 Seznam použitých chemikálií.....	29
3.2 Přístrojové vybavení.....	30
3.3 Roztoky a pufry.....	31
3.4 Kultivační média.....	34
3.5 Směsi pro přípravu umělých membrán.....	34
3.6 Metody a pracovní postupy.....	36
3.6.1 Produkce a purifikace CyaA.....	37
3.6.2 Příprava superkompetentních buněk <i>Escherichia coli</i>	37
3.6.3 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk.....	37

3.6.4	Produkce toxinu v 500 ml kulturách	38
3.6.5	Příprava močovinnového extraktu CyaA a jeho derivátů	38
3.6.6	Purifikace proteinu iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose.....	39
3.6.7	Purifikace proteinu hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose.....	39
3.6.8	SDS-polyakrylamidová elektroforéza	39
3.6.9	Stanovení koncentrace proteinů	40
3.6.10	Měření na černých lipidových membránách	40
4	Výsledky.....	50
4.1	Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA	50
4.1.1	Výskyt velkých kanálů tvořených CyaA v membránách s cholesterolem	50
4.1.2	Iontová selektivita kanálů CyaA v cholesterolových membránách	53
4.2	Vliv elektrického napětí na aktivitu CyaA	54
4.2.1	Závislost rychlosti zabudování CyaA na elektrickém napětí.....	54
4.2.2	Závislost doby otevření kanálu CyaA na napětí	55
4.3	Velikost kanálů CyaA	56
4.4	Vliv vápenatých iontů na iontovou selektivitu kanálů CyaA.....	58
4.4.1	Vliv vápenatých iontů na iontovou selektivitu CyaA kanálů	58
4.4.2	Propustnost kanálů CyaA pro vápenaté ionty.....	60
5	Diskuze	62
5.1	Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA	62
5.2	Iontová selektivita kanálů CyaA v cholesterolové membráně	63
5.3	Vliv elektrického napětí na aktivitu CyaA	63
5.4	Velikost kanálů CyaA	64
5.5	Propustnost kanálů CyaA pro vápenaté ionty	65
6	Souhrn	66
7	Seznam literatury	67

Seznam použitých zkratek

AC	adenylát-cykláza
ATP	adenosin-5'-trifosfát
BLM	černé lipidové membrány (z anglického <u>B</u> lack <u>L</u> ipid <u>M</u> embranes)
BSA	hovězí sérový albumin
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát
CyaA	adenylát-cyklázový toxin bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
Da	dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DEAE	diethylaminoethyl
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-etansulfonová kyselina
HlyA	α -hemolysin bakterie <i>Escherichia coli</i>
IPTG	isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid
LB médium	kultivační médium Luria-Bertani pro bakteriální kultury
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z anglického <u>P</u> oly <u>A</u> cryl <u>A</u> mide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
PEG	polyetylenglykol
RTX	označení skupiny cytotoxinů (<u>R</u> epeats in <u>T</u> o <u>X</u> in)
SDS	dodecylsulfát sodný
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
Tris-HCl	tris(hydroxymetyl)aminometan-hydrochlorid

v/v	poměr objemů dvou látek v roztoku
w/v	koncentrace látky v rozpouštědle kg/l
w/w	poměr hmotností látek v roztoku
wt	divoký typ (z anglického <u>w</u> ild <u>t</u> ype)

1 Úvod

Adenylát-cyklázový toxin (CyaA, ACT) je jedním z hlavních virulenčních faktorů bakterie *Bordetella pertussis*, která je původcem onemocnění černý kašel. Černý kašel je vážné respirační onemocnění, které postihuje zejména kojence a malé děti. Přestože *Bordetella pertussis* produkuje řadu toxických látek, má adenylát-cyklázový toxin pro její virulenci zásadní význam. Kmeny *Bordetella pertussis* bez tohoto toxinu jsou avirulentní. Adenylát-cyklázový toxin patří do rodiny RTX hemolyzinů (z angl. Repeats in ToXin) a stejně jako ostatní RTX hemolyziny se váže do buněčné membrány hostitelských buněk, kde tvoří malé kation-selektivní póry. CyaA obsahuje katalytickou adenylátcyklázovou doménu (AC), která je translokována do buňky. Zde je aktivována cytozolickým calmodulinem a konvertuje nekontrolovatelně ATP na cAMP. To vede k narušení buněčné signalizace až k apoptóze.

CyaA se primárně váže na buňky nesoucí na své membráně receptor CD11b/CD18 (CR3, Mac-1, $\alpha_M\beta_2$) mezi které patří NK buňky, monocyty, neutrofilů, T-lymfocyty, makrofágy. Nicméně může napadat i buňky, které tento receptor nemají (Gordon et al. 1989).

CyaA je možno geneticky modifikovat. Byly vyvinuty nosiče antigenů založené na translokaci AC domény s inzercí různě dlouhých polypeptidových fragmentů. Většina CyaA toxoidů s inzerty 8-206 aminokyselin byla schopna se vázat na buňky ovčích erytrocytů a AC doménu translokovat. To ukazuje na flexibilitu CyaA toxoidů jako nástroje pro přenos heterologních proteinů do buněk. Detoxifikovaný adenylát-cyklázový toxin by mohl sloužit jako vektor antigenů vedoucí k indukci obranné odpovědi vůči intracelulárním patogenům, jako jsou viry, nebo jako imunoterapie při tumorech (Simsova, Peter Sebo, and Claude Leclerc 2004).

Já jsem se ve své diplomové práci věnovala především měření vlastností CyaA, které lze pozorovat na umělých lipidových membránách - průchod iontů kanály CyaA, který je možné měřit jako elektrický proud. Prvním cílem mé diplomové práce bylo zjistit, zda mají černé lipidové membrány s přidavkem cholesterolu vliv na kanálovou aktivitu CyaA v těchto membránách a případně zda cholesterol ovlivňuje iontovou selektivitu kanálů CyaA. Bylo totiž zjištěno, že cholesterol hraje roli při translokaci

katalytické AC domény toxinu přes membránu. K translokaci dochází po přesunu CyaA do lipidového raftu, místa bohatého na cholesterol (Bumba et al. 2010).

CyaA kanály jsou ovládané napětím, které má vliv i na translokaci AC domény. Aby byla AC doména přenesena, je potřeba kladného membránového potenciálu na straně toxinu. V této práci jsem sledovala, zda má hodnota vloženého elektrického napětí vliv na dobu, po jakou je CyaA kanál otevřený. Také jsem sledovala, zda existuje závislost rychlosti zabudování molekuly CyaA do membrány na elektrickém napětí.

Dalším cílem práce bylo zjistit velikost kanálů, které tvoří adenylát-cyklázový toxin. Velikost CyaA kanálů je odhadována na 0,6-0,8 nm (Benz et al. 1994; Ehrmann et al. 1991). Ve své práci jsem pro stanovení průměru CyaA kanálů používala neelektrolyty, látky bez celkového náboje.

Posledním cílem této práce bylo zjistit, zda vápenaté ionty procházejí póry, které tvoří CyaA v černých lipidových membránách a zda ovlivňují jejich iontovou selektivitu. Vápenaté ionty jsou nezbytné pro toxickou aktivitu CyaA.

2 Přehled literatury

2.1 RTX hemolyziny

RTX toxiny jsou exoproteiny gram-negativních bakterií. Jejich společnou vlastností je způsob transportu přes bakteriální membránu a nonapeptidové repetice v RTX hemolyzinové doméně, které jsou bohaté na glycin a aspartát, podle kterých celá rodina dostala své pojmenování. Používaný sekreční systém typu I je společný široké skupině gram negativních bakterií. Sekrece probíhá oligomerním kanálem, který prochází celým bakteriálním obalem, to znamená cytoplazmatickou membránou, periplazmatickým prostorem i vnější membránou. Na C-konci molekuly toxinu je sekreční signál. Sekrece RTX polypeptidu probíhá v jednom kroku, z cytozolu do extracelulárního prostředí, bez mezikroku v periplazmatickém prostoru. Nonapeptidová repetice má sekvenci (L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X, X označuje libovolnou aminokyselinu. Aminokyseliny v závorkách značí, že v této pozici se mohou nalézat různé aminokyselinové zbytky. Tyto repetice jsou lokalizovány na C-terminálním konci proteinu a jsou místem, kam se váží ionty vápníku (Boehm, Welch, and Snyder 1990). Potřeba vápenatých iontů pro aktivitu RTX toxinů byla prvně popsána u α -hemolyzinu *E. coli* (Jr and Kurtz 1971) a adenylát-cyklázového toxinu *B. pertussis* (Hanski and Farfel 1985). Vazba vápenatých iontů nastává až po sekreci z buňky ven, v cytoplazmě bakterií je velmi nízká koncentrace vápníku (méně než 100 nM) (Gangola and Rosen 1987).

Rodina RTX toxinů zahrnuje cytolytické toxiny, metaloproteiny a lipázy. Podle specifity hostitelské buňky je možné RTX toxiny rozdělit na dvě skupiny, hemolyziny a leukotoxiny. Hemolyziny napadají široké spektrum hostitelských buněk. Vazba leukotoxinů je oproti hemolyzinům vázaná na specifický typ buňky nebo specifického hostitele (Lally et al. 1999).

Ačkoli existují určité odlišnosti, tak jsou ve většině případů geny RTX toxinů seskupeny v operonu sestávajícího ze čtyř genů, *rtxC*, *A*, *B*, *D*. RTX toxiny pro svou aktivaci a hlavně pro interakci s hostitelskou membránou vyžadují posttranslační modifikaci. (Boehm et al. 1990; Nicaud et al. 1985). Touto modifikací je acylace genového produktu *rtxA* genu za pomoci produktu *rtxC* genu a ACP (acyl carrier protein) (Ludwig et al. 1996; Moayeri and Welch 1997). Ačkoli není doposud přesně známo

proč, tak všechny pórtvorné RTX toxiny potřebují být acylované, aby mohly uplatnit všechny své toxické aktivity. Posttranslačně nemodifikované formy HlyA a CyaA sice tvoří póry v planárních lipidových dvojvrstvách, ale s mnohem menší ochotou (Ludwig et al. 1996; Masin et al. 2005).

Transport RTX toxinů z cytoplazmy probíhá za účasti transportních proteinů kódovaných *rtx B* a *rtxD* geny (Lally et al. 1999). Sekreční signál leží v C-terminální části proteinu *rtxA* v úseku přibližně posledních 60 aminokyselin. Pro samotný transport je také důležitá sekundární struktura signální sekvence, která má podobu amfipatického helixu (Hui et al. 2000).

Hlavním, a nejlépe prostudovaným, představitelem RTX toxinů je HlyA bakterie *Escherichia coli*. Dalšími zástupci RTX hemolyzinů jsou ApxI A bakterie *Actionobacillus pleuropneumoniae* a CyaA bakterie *Bordetella pertussis* (Lally et al. 1999). Hemolytickou aktivitou se rozumí schopnost tvorby selektivního, vodivého kanálu v membráně. Zatímco HlyA je znám zejména svou hemolytickou aktivitou, tak CyaA interaguje s cílovou membránou složitěji. Po navázání na cílovou membránu translokují svou N-terminální AC doménu do cytoplazmy, kde rychle konvertuje ATP na cAMP. Je však schopen i tvorby kation-selektivních pórů v membráně hostitelské buňky.

2.2 *Bordetella pertussis*

Bordetella pertussis je gramnegativní, aerobní, nesporulující kokobacil. Je striktně lidský patogen. Kolonizuje respirační trakt lidí a je příčinou černého kašle (dávivého kašle nebo též pertuse). Onemocnění se šíří aerosolem nebo přímým kontaktem. Černý kašel je nebezpečný zejména pro kojence. Nakažený pacient trpí úmorným kašlem, během kterého se nemůže nadechnout. Dochází k celkovému vyčerpání organismu. V zemích, kde není očkování zavedeno, je černý kašel stále běžným onemocněním (Mattoo and Cherry 2005). V České republice po zavedení účinné chloramfenikolové terapie v padesátých letech a po zavedení povinného očkování v roce 1958 počty hlášených případů onemocnění začaly rychle klesat (Fabiánová et al. 2011).

Bordetella pertussis disponuje řadou mechanismů, které jí umožňují proniknout do hostitelského organismu. Produkuje množství faktorů virulence, mezi které patří pertusový toxin, adenylát-cyklázový toxin, filamentózní hemagglutinin,

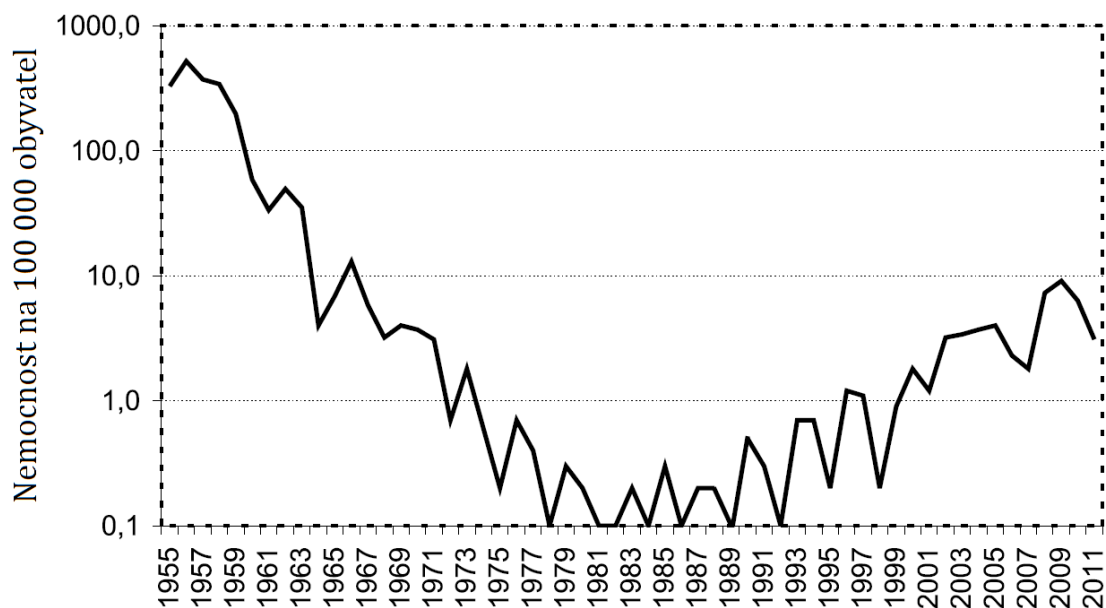
dermonekrotický toxin, pertaktin, tracheální cytotoxin, fimbrie (Weingart and Weiss 2000).

Virulenční faktory *Bordetella pertussis* lze rozdělit do dvou skupin na adheziny a toxiny. Adheziny umožňují bakterii po proniknutí do dýchacích cest přichycení k řasinkovému epitelu. Sem patří filamentózní hemaglutinin, pertaktin, fimbrie (Mobberley-schuman and A. A. Weiss 2005). Toxiny se účastní dalších fází infekce, když se bakterie pomnoží, a mají za úkol oslabit obranyschopnosti hostitele. Mezi toxiny patří adenylát-cyklázový toxin, pertusový toxin, dermonekrotický toxin.

Onemocnění trvá většinou 4 až 8 týdnů a jeho průběh můžeme rozdělit do tří fází. V první fázi dochází ke kolonizaci horních cest dýchacích, bakterie přilnou na povrch řasinkového epitelu sliznice nosohltanu, hltanu, průdušnice a průdušek, a začíná se objevovat dráždivý kašel provázený zvýšenou teplotou. V tomto stádiu onemocnění je možno černý kašel léčit antibiotiky. V druhé fázi se bakterie pomnoží a začínají produkovat toxiny. Dochází k destrukci sliznice dýchacích cest. Objevuje se charakteristický dráždivý kašel, který může končit zvracením (odtud název dávný kašel). Dráždění sliznice dýchacích cest způsobuje pertusový toxin, který vyvolává kašel, pro toto onemocnění typický V tomto stádiu se již v plicích nevyskytují živé bakterie. V poslední fázi onemocnění mizí příznaky a dochází k rekonvalescenci.

Imunita po proběhnutém onemocnění ani po očkování není celoživotní, trvá přibližně 4-20 let. V roce 1959 bylo v České republice zavedeno celoplošné očkování celobuněčnou vakcínou v kombinaci s očkováním proti záškrtu a tetanu. Kvůli častým nežádoucím účinkům vakcíny (bolestivost, zarudnutí v místě vpichu, horečka, křeče a další) bylo od celobuněčné vakcíny upuštěno. Od roku 2007 se očkuje hexavakcínou (proti černému kašli, záškrtu, tetanu, virové hepatitidě typu B, dětské obrně a infekcím způsobeným *Haemophilus influenzae* typu B), která je acelulární. Imunita po očkování acelulární vakcínou je však kratší než po očkování celobuněčnou.

V posledních dvou desetiletích se výskyt pertuse zvyšuje, jak je patrné z grafu na Obr. 1, což může být dáno několika faktory. Jednak zvýšením hlášení černého kašle, zavedením acelulární očkovací látky a také existence rezervoáru mezi dospělými a adolescenty, kteří nepodstupují přeočkování proti pertusi (Havlík 2008).



Obr. 1 Vývoj nemocnosti pertuse v ČR, 1955 – 2011, nemocnost na 100 tisíc obyvatel (Fabiánová et al., 2011)

2.3 Adenylát-cyklázový toxin

Adenylát-cyklázový toxin, jak již bylo zmíněno dříve, patří mezi RTX toxiny. Je jedním z nejvýznamnějších faktorů virulence patogenních bordetel. Lidé nakažení *Bordetella pertussis* jsou snadno náchylní k sekundárním infekcím (Confer and Eaton 1982). Toxin CyaA hraje důležitou roli v prvních fázích onemocnění, při kolonizaci respiračního traktu. Mutanty defektní v CyaA jsou avirulentní (Goodwin and Weiss 1990).

CyaA je kódován genem *cyaA*, který leží v *cya* lokusu. Pro sekreci CyaA je nutná exprese ještě dalších tří genů – *cyaB*, *D*, *E*. Tyto geny jsou zodpovědné za transport toxinu. Mechanismus sekrece je podobný jako u α -hemolysinu *Escherichia coli* (Philippe Glaser, A. Danchin, et al. 1988).

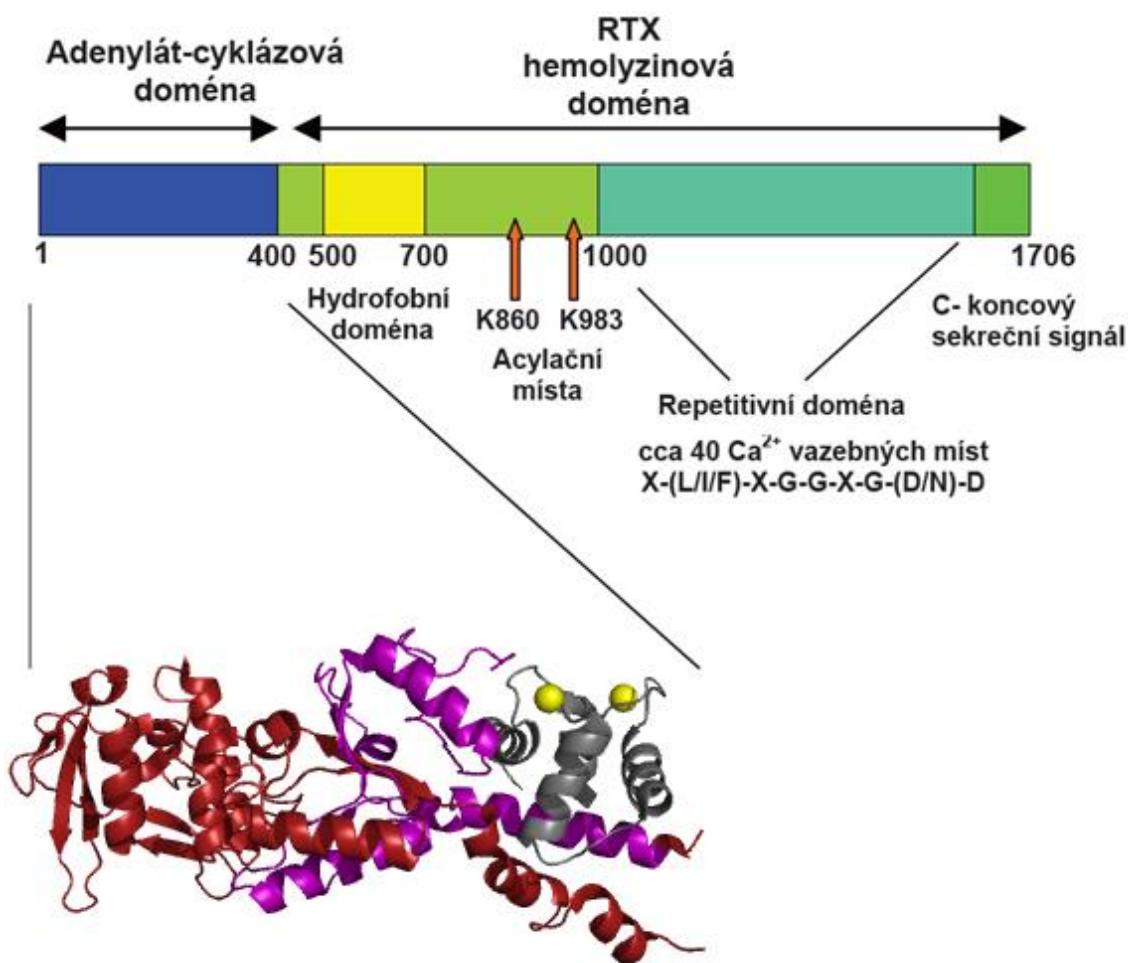
Schopnost CyaA vázat se na cílové buňky s receptorem CD11b je podmíněna posttranslační modifikací (El-Azami-El-Idrissi et al. 2003), kterou je palmitoylace. Palmitoylaci zajišťuje acyltransferáza CyaC. CyaC připojuje kyselinu palmitovou k aminoskupinám lyzinových zbytků v pozicích Lys983 (Hackett et al. 1994) a Lys860 (Masin et al. 2005).

2.4 Struktura CyaA

CyaA je polypeptid sestávající z 1706 aminokyselin o molekulové hmotnosti 177 kDa. Molekula CyaA se skládá ze dvou hlavních domén:

1. Adenylát-cyklázová doména,
2. RTX hemolyzinová doména.

Obě lze dále rozdělit na několik částí: hydrofobní doména, acylační místa, repetitivní doména, C-koncový sekreční signál.



Obr. 2 Schématické znázornění RTX toxinu CyaA bakterie *Bordetella pertussis*. CyaA se skládá z adenylát-cyklázové domény a RTX hemolyzinové domény. Po translokaci do buňky váže AC doména buněčný kalmodulin (CaM). V dolní části obrázku je zobrazena krystalová struktura CaM s navázanou AC doménou. Červenou a růžovou barvou je vyobrazena krystalová struktura AC domény (T25 a T18 oblasti). Šedou barvou je znázorněn C-koncový úsek kalmodulinu (C-CaM). Žlutě jsou vyobrazeny vápenaté ionty. Struktura (1YRT) stažena ze serveru www.rcsb.org a upravena v programu PyMol.

2.4.1 Adenylát-cyklázová (AC) doména CyaA (1-400 AK)

Prvních 400 aminokyselin N-terminálního konce CyaA zahrnuje invazivní adenylát-cyklázovou doménu. Je to část, která je po translokaci a odštěpení aktivována vnitrobuněčným kalmodulinem (CaM), čímž dochází ke štěpení buněčného ATP na cAMP a pyrofosfát (Wolff et al. 1980). Translokace AC domény je zajišťována zbytkem molekuly CyaA zatím ne zcela objasněným mechanismem (Philippe Glaser, Hiroshi Sakamoto, et al. 1988).

AC doména se skládá ze dvou částí T25 a T18. Část T25 (1-224 AK) obsahuje katalytické místo, kde dochází k přeměně ATP na cAMP. Část T18 (225-399 AK) obsahuje vazebné místo pro kalmodulin (P Glaser et al. 1989). Po proteolytickém štěpení si obě části zachovávají své funkce (Munier et al. 1991). Trojrozměrná struktura AC domény s C-koncovým úsekem kalmodulinu byla objasněna v roce 2005 (Guo et al. 2005) a je zobrazena na Obr. 2. Zatím není zcela jasné, jakým způsobem se AC doména dostává přes buněčnou membránu hostitele. Doposud je známo, že pro translokaci AC domény je nutný negativní membránový potenciál (Otero et al. 1995), přítomnost vápenatých iontů ve fyziologické koncentraci a aby byla AC doména rozvolněna.

2.4.2 RTX hemolyzinová doména (400-1706 AK)

Hemolyzinová doména obsahuje sekvence, které řadí CyaA k RTX proteinům. Nachází se zde pět ohraničených, od sebe oddělených, úseků. Každý úsek obsahuje nonapeptidové repetitivní sekvence bohaté na glycin a aspartát (L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X) (Philippe Glaser, Hiroshi Sakamoto, et al. 1988).

Hlavní oblast, která se účastní vazby na cílovou buňku nesoucí receptor CD11b, je umístěna v RTX oblasti bohaté na glycinové a aspartátové repeticce. Katalytická doména není nutná pro vazbu na tento receptor (El-Azami-El-Idrissi et al. 2003).

- **Hydrofobní doména (500-700 AK)**

Tato oblast molekuly CyaA obsahuje zvýšený výskyt hydrofobních aminokyselin a je důležitá pro schopnost vazby CyaA na biologické membrány, které nenesou specifický receptor. Osicková *et al.* (Osicková et al. 1999) ve své práci z roku 1991 ukazují, že v této části molekuly pravděpodobně vznikají α -alfa helixy, které obsahují glutamátové

zbytky. Tyto glutamátové zbytky hrají důležitou roli při translokaci AC domény a zároveň ovlivňují tvorbu pórů v membránách a jejich kation-selektivitu.

Striktní kation-selektivita CyaA kanálů naznačuje, že se uvnitř či v blízkém okolí kanálu nachází negativně nabitě aminokyselinové zbytky. Cílenou mutagenézí bylo připraveno několik bodových mutantů v oblasti 502-522, tedy oblasti předpokládaného transmembránového α -helixu. Záměna glutamátového zbytku za prolin znemožnila translokaci AC domény bez toho, aby byla narušena hemolytická aktivita CyaA. Záměna za lyzin výrazně snížila schopnost translokace AC domény, naopak hemolytická aktivita byla zvýšena díky vyššímu počtu tvořených kanálů. Substitucí lyzinem byl změněn náboj, který tento úsek nese. Tato skutečnost se odrazila ve snížené kation-selektivě kanálu. Z uvedeného vyplývá, že se oblast 502-522 s největší pravděpodobností podílí na tvorbě kation-selektivních kanálů v cílových membránách (Osicková et al. 1999).

- **Acylační doména (800-1000 AK)**

Schopnost CyaA vázat se na cílové buňky závisí na jeho aktivaci pomocí posttranslační modifikace. Touto modifikací je palmitoylace ϵ -amino skupiny lyzinových zbytků K860 a K983 bakteriální acyltransferázou CyaC (Barry et al. 1991). Stejně jako u ostatních RTX toxinů je tato modifikace nezbytná pro to, aby se CyaA mohl vázat na buněčné membrány.

- **Repetitivní RTX doména (1000-1650 AK)**

RTX doména je oblast, která řadí CyaA k RTX proteinům. Nachází se zde přibližně 45 nonapeptidových, na aspartát a glycin bohatých, repetitivních (L/I/F)-X-G-G-X-G-(N/D)-D-X kde X představuje jakoukoli aminokyselinu. Tyto repetice jsou místem vazby vápenatých iontů. Přibližně 3-5 míst je vysokoafinitních a jsou důležité pro schopnost vazby CyaA na membrány. Zbývající místa pro vazbu vápníku jsou nízkoafinitní, s největší pravděpodobností jsou důležité pro to, aby CyaA mohl translokovat svou katalytickou AC doménu do cílových buněk (Rose et al. 1995). Vápenaté ionty způsobují konformační změnu CyaA což je nezbytné pro interakci CyaA s receptorem CD11b/CD18 (Guermonprez et al. 2001). Změna konformace je důležitá nejen pro vazbu na biologické membrány, ale i na translokaci AC domény skrze cytoplazmatickou membránu hostitelských buněk (Rogel and Meller 1991).

- **C-koncový sekreční signál**

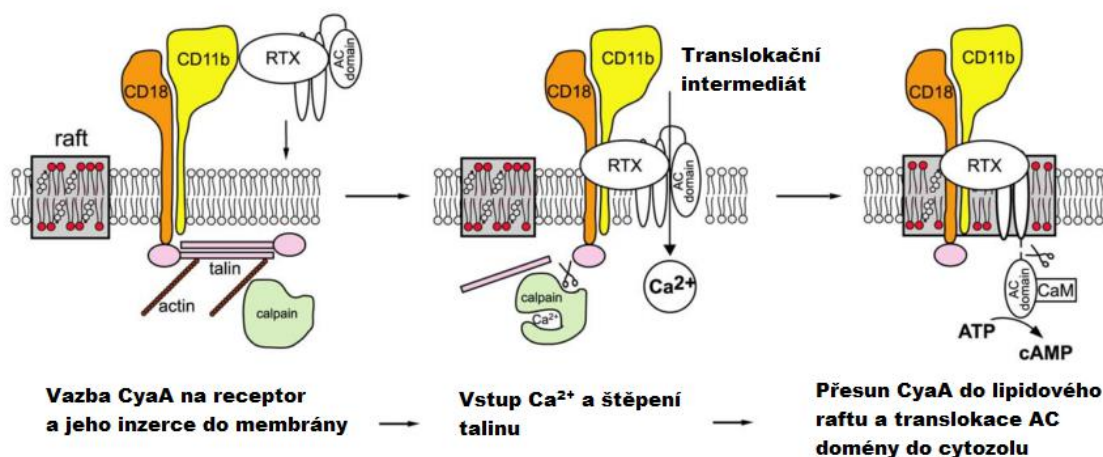
C-terminální úsek sestávající z 1306 AK vykazuje 25% homologii s α -hemolyzinem (HlyA) *E.coli* (Philippe Glaser, Hiroshi Sakamoto, et al. 1988).

C-terminální úsek obsahuje hydrofobní doménu s amfifilní a hydrofobní alfa-helikální strukturou (úsek 500-700 AK), tato oblast je podobná pórtvorné oblasti alfa-hemolyzinu (HlyA) z *E.coli*.

2.5 Interakce CyaA s hostitelskou membránou

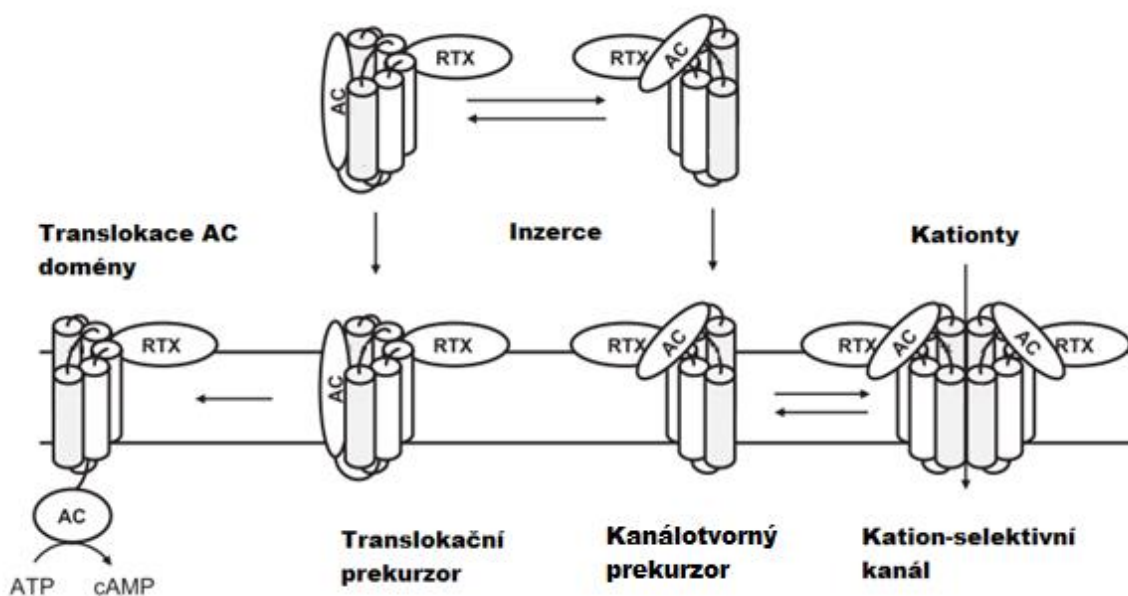
CyaA primárně napadá buňky exprimující na svém povrchu CD11b/CD18 integrin receptor (α M β 2, Mac-1) ten se vyskytuje převážně na myeloidních buňkách (Guermonprez et al. 2001). CD11b/CD18 hraje klíčovou roli v imunitní odpovědi leukocytů. CyaA se primárně váže na fagocyty, které na svém povrchu tento integrin receptor nesou, ale váže se i na buňky, které CD11b/CD18 na svém povrchu neexprimují, například erytrocyty. Tím CyaA obejde receptorem zprostředkovaný vstup do buňky a přímo proniká cytoplazmatickou membránou do cílových buněk (Gentile et al. 1988; Guermonprez et al. 1999).

Po navázání CyaA na receptor CD11b/CD18 zanořuje do hostitelské membrány svou AC doménu, což je provázeno vstupem vápenatých iontů z extracelulárního prostředí do cytoplazmy. Molekula CyaA se tak přímo podílí na vstupu vápníku do buněk (Fiser et al. 2007). Vstup vápenatých iontů aktivuje na vápníku závislou proteázu calpain, která uvolňuje komplex CyaA-CD11b/CD18 z vazby k cytoskeletu. CyaA se pak přesouvá do lipidového raftu, místa bohatého na cholesterol, AC doména je odštěpena od zbytku molekuly CyaA a váže se na cytozolický calmodulin a dochází ke konverzi ATP na cAMP (Bumba et al. 2010). Translokace AC domény je znázorněna na Obr. 3. V cytozolu se N-terminální AC doména CyaA váže intracelulární calmodulin a katalyzuje nekontrolovatelnou konverzi ATP na cAMP. cAMP funguje jako druhá klíčová signální molekula (Confer and Eaton 1982). Dochází k narušení signalizace v buňce, což vede u fagocytů ke ztrátě baktericidních vlastností. Při vysokých koncentracích CyaA dochází k tak rychlému snížení koncentrace ATP v buňce, že buňka odumírá.



Obr. 3 Model translokace AC domény do cytozolu hostitelské buňky. Nejdříve se CyaA váže na integrin CD11b/CD18. Poté se CyaA zanořuje do cytoplazmatické membrány za vzniku translokačního intermediátu. V tomto okamžiku dochází ke vstupu Ca²⁺ do cytozolu. Proteáza calpain odstříhne komplex CyaA-CD11b/CD18 od cytoskeletu a celý komplex se přesouvá do lipidového raftu, kde je proces translokace AC domény dokončen jejím odstřížením od CyaA. Převzato z (Bumba et al. 2010) a upraveno.

Adenylát-cyklázový toxin reaguje s hostitelskou membránou dvěma způsoby. V roztoku se CyaA vyskytuje ve dvou různých konformacích, Obr. 4. V závislosti na konformaci pak dochází buď k translokaci AC domény přes cytoplazmatickou membránu, nebo k tvorbě kationt-selektivních kanálů. Translokace AC domény je přitom zajišťována monomerně, zatímco pro tvorbu kanálů je třeba oligomerizace několika jednotek CyaA. Pro tvorbu kationt-selektivních kanálů v membráně erytrocytů je třeba nejméně dvou jednotek CyaA (Basler et al. 2007; Osicková et al. 1999; Vojtova-Vodolanova et al. 2009).



Obr. 4 Schématické znázornění možných interakcí CyaA s cílovou membránou. Translokační prekurzor vede k přenosu AC domény do hostitelské buňky, zatímco kanálotvorný prekurzor vede k tvorbě kationt selektivních kanálů v cílové membráně. Převzato z (Basler et al. 2007) a upraveno.

Translokace AC domény do buněk a tvorba pórů jsou tedy dvě různé aktivity. Lze je od sebe oddělit teplotou, koncentrací volných vápenatých iontů, specifickou mutací nebo acylací či absencí acylace proteinu (Basler et al. 2007; Osicková et al. 1999; Sakamoto et al. 1992).

2.6 Vliv vápenatých iontů na kanálotvornou aktivitu CyaA

Bakteriální toxiny mohou v hostitelské buňce vyvolávat změny v koncentraci volných vápenatých iontů (TranVan Nhieu et al. 2004). Vápenaté ionty jsou klíčové ionty v každé buňce, regulují zde široké spektrum procesů zahrnující exocytózu, kontrolu enzymů, genovou regulaci, růst buňky, proliferaci, apoptózu (Parekh and Putney 2005). Vápenaté ionty v buňkách fungují jako sekundární intracelulární poslové a kalmmodulin (CaM) je jedna z molekul, které na přítomnost vápníku reaguje (Berridge, Bootman, and Roderick 2003). Kalmmodulin má N- a C-terminální globulární domény. Každá globulární doména CaM má dvě místa pro vazbu vápníku. Pokud se vápník naváže na kalmmodulin, dojde k jeho konformační změně a tím se otevírají nová reakční místa (Guo et al. 2005).

Koncentrace volných iontů vápníku je důležitá pro hemolytickou aktivitu i pro translokaci AC domény do cílové buňky (J Bellalou et al. 1990; Hanski and Farfel

1985). K napadení buňky dochází jen za přítomnosti volných iontů vápníku v koncentraci vyšší než 0,2 mM (Gordon et al. 1989). Jejich navázání vede ke konformační změně CyaA, která je nutná pro toxickou aktivitu (Hewlett et al. 1991). Tato konformační změna následně vede k translokaci katalytické domény CyaA skrze cytoplazmaticou membránu cílové buňky (Rose et al. 1995).

V nedávné době bylo prokázáno, že CyaA při translokaci své AC domény umožňuje vstup vápenatých kationtů do buňky. Pokusy byly prováděny na myeloidních fagocytech, které na svém povrchu exprimují CD11b receptor (Fiser et al. 2007). Naproti tomu jiný RTX toxin, HlyA bakterie *E.coli*, zvyšuje cytoplazmatickou koncentraci vápenatých iontů tvorbou pórů v membráně hostitelské buňky. Původně se tedy předpokládalo, že CyaA bude propouštět vápenaté ionty stejným mechanismem (Valeva et al. 2005). Důvodem, proč CyaA využívá jiný mechanismus vstupu Ca^{2+} může být fakt, že oproti HlyA tvoří mnohem menší póry (Benz et al. 1994; Ehrmann et al. 1991).

Szabo *et al.* (Szabo and Gray 1994) ve své práci naznačují, že póry tvořené CyaA jsou kation-selektivní s lehkou preferencí pro vápenaté ionty oproti monovalentním kationtům. Také ve své práci dochází k názoru, že pro tvorbu vodivého póru je třeba více než jedna molekula adenylát-cyklázového toxinu. Pravděpodobně je pór tvořen agregací transmembránových monomerů.

CyaA ovlivňuje intracelulární iontové prostředí, viz Tab. 1, hostitelské buňky i jiným způsobem. Při tvorbě kationt selektivního kanálu, který vzniká oligomerizací CyaA (Vojtova-Vodolanova et al. 2009), dochází k úniku draselných kationtů z erytrocytů (Gray et al. 1998; Pospíšilová 2010).

Iont	Buňka (mM)	Krev (mM)
K ⁺	139	4
Na ⁺	12	145
Cl ⁻	4	116
Ca ²⁺	< 0,0002	1,8

Tab. 1 Typické koncentrace iontů v savčí buňce a krvi (Lodish, Berk, and Kaiser 2008).

2.7 Závislost aktivity CyaA na napětí

Membránový potenciál je důležitým faktorem, který má vliv na biologickou aktivitu CyaA *in vivo*. Bylo prokázáno, že pro přenos AC domény je třeba negativní membránový potenciál uvnitř buněk (Otero et al. 1995). Na buněčné membráně je na *cis* straně (strana přídavku CyaA) pozitivní potenciál a na *trans* straně negativní potenciál. Při přepnutí pozitivního potenciálu na *cis* straně na potenciál negativní dochází k zavírání CyaA pórů, a tím k poklesu vodivosti membrány (Knapp et al. 2008).

Pórotvorná aktivita CyaA tak není závislá pouze na vápníku, ale také na polaritě vloženého napětí na membránu (Knapp et al. 2008; Otero et al. 1995; Szabo and Gray 1994). Stejně chová i hemolyzin z *E.coli*. Při vkládání negativního napětí na membránu se póry otevírají a naopak při pozitivních potenciálech zavírají (Menestrina and Ropele 1989).

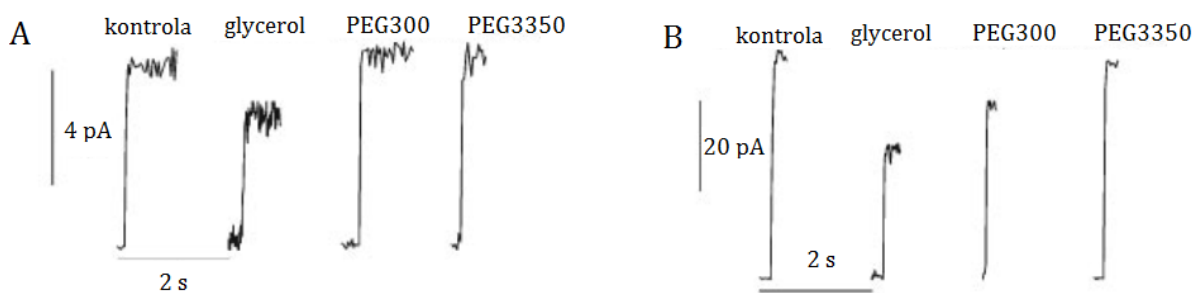
Knapp *et al.* (Knapp et al. 2008) pozorovali změny elektrického proudu v závislosti na použitém kladném či záporném napětí různých hodnot na *cis* straně membrány. Při zvyšujících se hodnotách kladného potenciálu na *cis* straně se zvyšují i hodnoty elektrického proudu. Při negativním potenciálu na *cis* straně se hodnoty elektrického proudu přibližují směrem k nule nebo zůstávají konstantní. Závislost aktivity kanálu CyaA na napětí se zdá být asymetrická. Pro kladná napětí na *cis* straně se zdá být závislost exponenciální, pro negativní napětí na *cis* straně zůstala amplituda elektrického proudu víceméně konstantní.

2.8 Velikost kanálů tvořených CyaA

Iontové kanály jsou obvykle tvořeny jedním nebo několika integrálními membránovými proteiny. Geometrie póru, stejně jako distribuce nábojů, je zásadní pro vodivost, iontovou selektivitu, obecně pro membránový transport.

Pro studium průměru a vodivosti iontových kanálů je využíváno nevodivých látek, neelektrolytů. Tyto nevodivé látky mají vliv na vodivost a viskozitu KCl roztoků, stejně tak jako na vodivost studovaných iontových kanálů. Užití neelektrolytů (např. glycerol, polyetylglykoly - PEG) různých velikostí tak může sloužit pro studium velikosti pórů, které tvoří kanálotvorné proteiny, mezi které patří i CyaA.

Takovýmto způsobem Sobko *et al.* (Sobko et al. 2006) určili průměry kanálů, které tvoří kolicin E1. V závislosti na složení lipidové dvojvrstvy tvoří kolicin E1 v membráně buď malé póry, vodivost okolo 60 pS, nebo velké póry s vodivostí okolo 600 pS. Průměr těchto kanálů byl stanoven pomocí glycerolu, a polyetylen glykolů různých molekulových hmotností (PEG 300 a PEG 3350). Vliv neelektrolytů na vodivost membrány je vidět na Obr. 5. Přidáním glycerolu do kyvety na *cis* stranu došlo k poklesu vodivosti velkých i malých kanálů. Byl-li přidán pouze PEG 300, došlo k poklesu vodivosti pouze velkých kanálů. PEG 3350 neovlivnil vodivost ani malých, ani velkých kanálů.



Obr. 5 Vliv přidání neelektrolytů různých molekulových hmotností na elektrický proud procházející malými (A) a velkými (B) kanály. Převzato z (Sobko et al., 2006) a upraveno.

Vodivost jednotlivých kanálů CyaA je v porovnání s jiným hemolyzinem, HlyA z *E. coli*, při stejných podmínkách měření přibližně 55krát menší. Autoři (Benz et al. 1994) z toho usoudili, že velikost kanálu CyaA bude menší, než je tomu u HlyA. Velikost CyaA (177 kDa) kanálů je odhadována na 0,6-0,8 nm (Benz et al. 1994; Ehrmann et al. 1991), hemolyzin HlyA (110 kDa) z *Escherichia coli* tvoří kanály o průměru 2-3 nm (Benz et al. 1989; Ehrmann et al. 1991). Je tedy patrné, že kanály tvořené CyaA jsou poměrně malé v porovnání s jeho celkovou velikostí oproti HlyA.

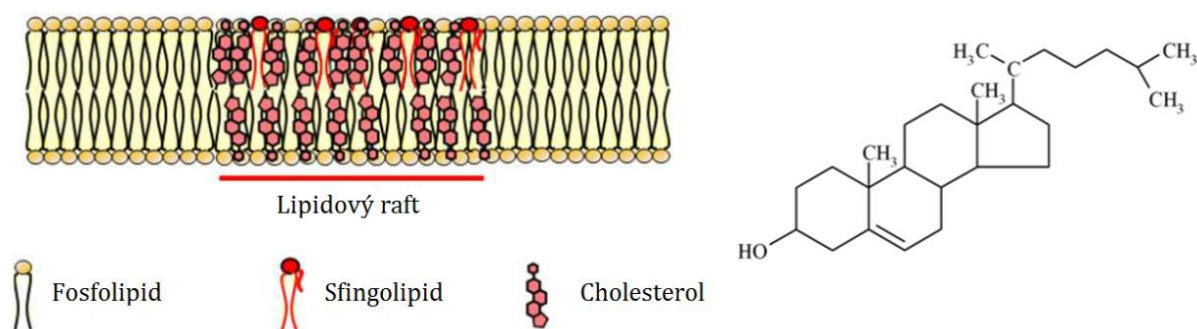
2.9 Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA, lipidové rafty

Cholesterol je steroidní látka amfipatické povahy. Jeho hydroxylová skupina představuje polární část, steroidní jádro část nepolární, viz pravá strana na Obr. 6. Je součástí plazmatických membrán eukaryotických buněk. Ovlivňuje jejich fyzikální vlastnosti, zejména viskozitu. Cholesterol zabraňuje volnému pohybu fosfolipidů v plazmatické membráně, a tím snižuje její fluiditu. Snižuje průchodnost malých, ve vodě rozpustných, molekul skrze lipidovou dvojvrstvu.

Cholesterol spolu se sfingolipidy a některými membránovými proteiny tvoří v biomembránách mikrodomény, tzv. lipidové rafty (Simons and Ikonen 1997). Pro svou rezistenci k detergentům a svému složení bývají také nazývány DRM (detergent resistant membranes) nebo GEMs (glykolipid-enriched microdomains). V poslední době jsou mikrodomény bohaté na cholesterol a sfingomyelin v popředí zájmu, protože se ukázalo, že některé integrální proteiny jsou v nich přednostně lokalizovány. Tyto mikrodomény se podílí na buněčné signalizaci a transportu membránových proteinů (Simons and Toomre 2000).

Ukázalo se, že CyaA translokuje svou AC doménu až po přesunu do lipidového raftu. Nejdříve se CyaA naváže na receptor a posléze se přesouvá do raftu, kde dojde k samotné translokaci (Bumba et al. 2010).

Existuje celá řada patogenních bakterií, které nepatří mezi RTX toxiny (*Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Arcanobacterium*), a které sekretují pórotvorné toxiny, jež pro tvorbu pórů vyžadují přítomnost cholesterolu v membráně, tzv. CDCs (cholesterol-dependent cytolysins) (Tweten 2005).



Obr. 6 Lipidový raft, molekula cholesterolu. Převzato z (Sergent et al. 2012) a upraveno.

2.10 Černé lipidové membrány

Lipidová dvojvrstva je centrální komponentou buněčných membrán. Membrány vymezují prostor buněk, oddělují jednotlivé kompartmenty, hrají zásadní roli při transportu látek dovnitř i ven z buňky, přenáší signál, podílí se na buněčné adhezi.

Metoda černých lipidových membrán (BLM, z anglického black lipid membranes), prvně popsána Muellerem a jeho kolegy v roce 1962 (MUELLER et al. 1962), se blíží fyziologickým podmínkám. Umožňuje zkoumat vlastnosti závislé na biomembránách

jako je například iontový transport nebo vlastnosti kanálotvorných molekul. Pro účely této práce byly BLM užívány pro zkoumání vlastností pórů, které v membránách tvoří CyaA. CyaA vytvoří v membráně pór, kterým se přesouvají ionty. Tento přesun je možné registrovat jako elektrický proud, tedy zvýšení vodivosti membrány.

Název černé lipidové membrány pochází z jejich vlastností, které lze pozorovat optickým zařízením. Umělá fosfolipidová membrána je vytvářena na malém otvoru (řádově desetiny milimetru) v přepážce kyvety, která je naplněná elektrolytem. Při nanášení membrány ze směsi fosfolipidů s organickými rozpouštědly je možno pozorovat barevné interferenční obrazce. Postupně, jak se vytváří dvojvrstva, se nános směsi lipidů ztenčuje a membrána se jeví jako černá. Lipidová dvojvrstva může být vytvořena ze syntetických nebo přírodních lipidů. Přirozeným podmínkám se nejvíce blíží směs několika syntetických či přírodních lipidů. Membrány z čistých lipidů, jako například fosfatidylcholin, fosfatidyletanolamin nebo fosfatidylserin, jsou málo napadány CyaA (Benz et al. 1994).

CyaA tvoří v umělých lipidových membránách malé kation-selektivní póry s velmi nízkou vodivostí oproti kanálům, které tvoří HlyA z *E. coli* (Ludwig et al. 1996; Menestrina and Ropele 1989). Tvorba těchto kanálů je zodpovědná za koloidně-osmotickou lyzi erytrocytů (Benz et al. 1994).

Výhodou černých lipidových membrán oproti jiným technikám, jako je například měření na lipozomech, je snadné měření vodivosti membrány. Umožňují zaznamenat jednotlivé kanály, které toxin tvoří. Zabudování molekuly proteinu do lipidové membrány vede k okamžitému vzrůstu vodivosti. Můžeme tak rozlišit jednotlivé vodivostní stavy. U lipozomů získáme pouze průměrnou hodnotu, nikoli informaci o výskytu velkých či malých kanálů nebo jak dlouho jsou kanály otevřené.

3 Materiál a metody

3.1 Seznam použitých chemikálií

1-butanol, Fluka, USA

Akylamid, Serva, SRN

Ampicilin, Biotika, SR.

Azolektin, Sigma, USA

Coomassie Brilliant Blue R250, Serva, SRN

Diethylaminoethyl-Sepharosa (DEAE-Sepharosa) CL-6B, Sigma-Aldrich, USA

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsulfát sodný (SDS), Serva, SRN

Etanol, Lach-Ner, s.r.o., ČR

Glycerol, Sigma-Aldrich, USA

Chlorid draselný, Lachema, ČR

Chlorid vápenatý, Lachema, ČR

Chloroform, Lachema, ČR

Cholesterol, Sigma-Aldrich, USA

Izopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA

Kyselina octová, Lach-Ner s.r.o., ČR

Kyselina ortofosforečná 85%, Lach-Ner s.r.o., ČR

Močovina, Merck, SRN

n-Decane, Sigma, USA

Octan draselný, Lachema, ČR

Tetracyklin, Sigma-Aldrich, USA

Tris(hydroxymetyl)-aminometan (Tris), Serva, SRN

Tris-hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, SRN

3.2 Přístrojové vybavení

Centrifuga Rotana 406 R, Hettich Zentrifugen, SRN

Centrifuga Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, SRN

Centrifuga Sorvall RC26 Plus, DU Pont Instruments, USA

Digitální analytické váhy, Mettler, Bonn, Německo

Digitální analytické váhy, OHAUS, Explorer Pro, USA

Elektroforéza Mini-PROTEAN II, Bio-Rad, USA

Lupa, Carl Zeiss, Lena

Magnetické míchadlo, IKA, RH basic 2, Německo

Mrazicí box (-20°C), Zanussi, Itálie

Mrazicí box (-80°C), Jouan, Francie

pH metr, Thermo electron corporation, Orion 2 star, USA

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

Termostatová 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

3.3 Roztoky a pufry

30% roztok akrylamidu pro SDS-PAGE elektroforézu

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

Barvicí roztok pro SDS-PAGE elektroforézu

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

Činidlo Bradfordové

Coomassie Brilliant Blue R250.....	0,01% (v/v)
Etanol.....	4,7% (v/v)
H ₃ PO ₄	8,7% (v/v)

Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE elektroforézu

Metanol.....	250 ml
Voda.....	650 ml
Kyselina octová	100 ml

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

30% roztok akrylamidu.....	1,24 ml
----------------------------	---------

Destilovaná voda	1,8 ml
1M Tris-HCl pufr (pH=8,8).....	1,87 ml
10% SDS.....	50 μ l
25% APS.....	12,5 μ l
TEMED.....	12,5 μ l

TB pufr

HEPES	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

pH se upraví na 6,7 pomocí 1 M KOH a poté se přidá MnCl₂ do výsledné koncentrace 55 mM. Roztok se sterilizuje filtrací přes filtry o velikosti pórů 0,22 μ l.

TUC pufr

Tris-HCl pH=8	50 mM
Močovina.....	8 M
CaCl ₂	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 pufr, pH=8,0

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

3.4 Kultivační média

LB médium (Luria-Bertani médium)

Bacto-tryptone	10 g
NaCl.....	5 g
Kvasniční extrakt.....	5 g
Deionizovaná voda.....	doplní se do 1000 ml

pH upraveno na hodnotu 7,2 přidáním 5 M NaOH

MDO médium, pH=7,0

NaH ₂ PO ₄	1 g
Na ₂ HPO ₄	3 g
NH ₄ Cl.....	2 g
Na ₂ SO ₄	0,5 g
Thiamin	0 mg
Kvasničný extrakt.....	20 mg
Glycerol	20 mg
Deionizovaná voda.....	doplní se do 1000 ml

pH upraveno na hodnotu 7,0 přidáním 5 M NaOH

Médium sterilováno autoklávem (0,12 MPa, 120°C, 20 min)

3.5 Směsi pro přípravu umělých membrán

Směs 1: Membrána - azolektin

Azolektin.....	6 mg
Butanol	20 µl

Decane 180 μ l

Směs 2: Membrána – azolektin, cholesterol 20%

Azolektin..... 8 mg

Cholesterol..... 2 mg

Butanol 33,33 μ l

Decane 300 μ l

Směs 3: Membrána – azolektin, cholesterol 30%

Azolektin..... 7 mg

Cholesterol..... 3 mg

Butanol 33,33 μ l

Decane 300 μ l

Směs 4: Ošetření teflonové kyvety před nanesením membrány

Azolektin..... 10 mg

Chloroform..... 100 μ l

Elektrolyty pro měření na umělých membránách

KCl, pH=6,6

KCl 74,55 g

Destilovaná voda doplněno do 1000 ml

KCl, pH=7,4

KCl	74,55 g
Destilovaná voda	doplněno do 1000 ml
Tris	10 mM

KCl pH=7,4, glycerol 50 %:

KCl 1 M.....	25 ml
Glycerol	25 ml
Tris	10 mM

KCl pH=7,4, glycerol 10 %:

KCl 1 M.....	25 ml
Glycerol	5 ml
Destilovaná voda	20 ml
Tris	10 mM

3.6 Metody a pracovní postupy

Pro úplnost uvádím všechny postupy a kroky, které vedou k získání rekombinantního CyaA z *E.coli*. Osobně jsem se účastnila kroků: 3.6.5-3.6.9. Adenylát-cyklázový toxin používaný v mých pokusech pocházel z Akademie věd ČR z laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů. Koncentrace zásobního roztoku toxinu byla 0,67 mg/ml. Pro produkci CyaA byl použit bakteriální kmen *Escherichia coli* XL-1 Blue, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac1q ZAM15Tn10(Tetr)].

3.6.1 Produkce a purifikace CyaA

Kmeny *Escherichia coli* XL1-Blue a BL21(λ DE3) byly krátkodobě uchovávány na agarových LB plotnách s příslušným antibiotikem při 4 °C. Dlouhodobě byly uchovávány ve 40% glycerolu při -80 °C.

3.6.2 Příprava superkompetentních buněk *Escherichia coli*

Na tuhé LB médium s tetracyklinem byla nanesena suspenze buněk dlouhodobě uchovávaného kmene *E. coli* a dále kultivována (37 °C, 16-24 hodin). Následně 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 ($OD_{600} = 0,6$) byla kultura prudce ochlazená v ledové lázni a poté centrifugována (6000 g, 4 °C, 10 minut). Sediment bakteriálních buněk *E. coli* byl resuspendován ve 32 ml ledového TB pufru. Následovala inkubace buněčné suspenze v ledové lázni (4 °C, 10 minut) a opětovná centrifugace buněk (6000 g, 4 °C, 10 minut). Po odstranění supernatantu byl sediment bakteriálních buněk resuspendován ve 4 ml ledového TB pufru. Poté bylo přidáno DMSO do koncentrace 7 % (v/v) a po inkubaci v ledové lázni (4 °C, 10 minut) byla buněčná suspenze rozplněna po 200 μ l do mikrokumavek a zamrazena v tekutém dusíku. Takto připravené superkompetentní buňky *E. coli* byly dlouhodobě uchovávány při teplotě - 80 °C.

3.6.3 Transformace plazmidové DNA do kompetentních buněk

K 50 μ l suspenze superkompetentních buněk byl přidán 1 μ l plazmidové DNA (pCACT3) ze zásobních roztoků. Obsah byl šetrně, ale důkladně, zamíchán. Směs byla inkubována (4°C, 10 minut) a následně přenesena na 5 minut do vodní lázně o teplotě 37 °C a poté ochlazená 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. Nakonec bylo vyseto 50-200 μ l suspenze na tuhé LB médium s příslušným antibiotikem. Buňky byly inkubovány (37 °C, 12-16 hodin).

3.6.4 Produkce toxinu v 500 ml kulturách

Buňky *E.coli* byly transformovány 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 požadovaným genem, a bakterie byly kultivovány za stálého třepání (37 °C, 12-16 hodin). Poté 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 $OD_{600} = 0,6$. Poté byla produkce proteinu indukována přidavkem IPTG, protože geny kódující CyaA, popřípadě CyaC, jsou pod kontrolou inducibilního lac promotoru. Kultura se za stálého třepání nechala růst další 4 hodiny. Nakonec byla kultivace bakterií ukončena prudkým ochlazením narostlé bakteriální kultury v ledové lázni.

Pro analýzu množství proteinu v buňkách *E.coli* byl z narostlé bakteriální kultury odebrán vzorek (1 ml), který byl centrifugován (12000 g, pokojová teplota, 1 minuta). Po odstranění supernatantu byl pelet buněk resuspendován ve 200 μ l TUC pufru. Následně bylo odebráno 20 μ l této směsi pro analýzu množství vyprodukovaného toxinu pomocí SDS-PAGE.

3.6.5 Příprava močovinného extraktu CyaA a jeho derivátů

Narostlá bakteriální kultura byla po kultivaci centrifugována (4000 g, 4 °C, 20 minut). Pelet buněk byl resuspendován v TUC pufru (10 ml) a sonikován (2 minuty, 35 W, 0 °C, 15 sekund sonikace, 60 sekund pauza pro chlazení). Po sonikaci byly zbývající celistvé buňky odstraněny centrifugací (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 po dobu 45 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění močoviny na výslednou koncentraci 8 M. Obsah zkumavky byl poté centrifugován (18000 g, 4°C, 30 minut). Supernatant (močovinný extrakt) obsahující denaturovaný CyaA byl převeden do nových zkumavek

a uchováván při teplotě -20 °C. Pro analýzu množství toxinu v močovinovém extraktu byla použita SDS-PAGE.

3.6.6 Purifikace proteinu iontoměničovou chromatografií na DEAE-Sepharose

Chromatografická kolona byla naplněna 10 ml DEAE-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou. Tím dojde k odstranění etanolu, ve kterém je CyaA uchováván. Kolona byla ekvilibrována TUN-A pufrem do doby, než pH pufru vytékajícího z kolony bylo stejné jako pH nanášeného pufru. V močovinovém extraktu připraveném k purifikaci 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 kontaminujících proteinů byla odstraněna promýváním kolony TUN-A pufrem. 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.

3.6.7 Purifikace proteinu hydrofobní chromatografií na Phenyl-Sepharose

Chromatografická kolona byla naplněna 2 ml Phenyl-Sepharosy a promyta deionizovanou vodou, aby došlo k odstranění etanolu, ve kterém byla matrice uchovávána. Poté byl ekvilibrován TN pufrem.

Vzorek, který obsahoval požadovaný toxin a byl purifikován na iontoměničové DEAE-Sepharose v předchozím kroku, byl čtyřikrát zředěn pomocí TN pufru a nanasen na kolonu s Phenyl-Sepharosou. Kolona byla poté promyta 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH=8,0). Toxin navázaný na Phenyl-Sepharosu byl eluován TUE-A pufrem a odebírán postupně v 1 ml frakcích. Množství proteinu bylo v každé frakci měřeno orientačním testem podle Bradfordové (10 µl frakce a 90 µl činidla Bradfordové).

Přítomnost a čistota CyaA v jednotlivých frakcích byla poté zjišťována pomocí SDS-PAGE. Konečné stanovení koncentrace proteinu v jednotlivých frakcích bylo provedeno metodou podle Bradfordové.

3.6.8 SDS-polyakrylamidová elektroforéza

Ke 20 µl proteinu bylo přidáno 5 µl pětkrát 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, který se skládal z horního 5% zaostřovacího gelu a ze spodního 7,5% rozdělovacího gelu. Elektroforéza byla nastavena na konstantní proud 30 mA, použitý pufr byl Tris-glycinový o pH = 8,3. Po proběhnutí elektroforézy byl odstraněn zaostřovací gel a rozdělené proteiny byly vizualizovány barvicím roztokem SDS-PAGE s Coomassie Brilliant blue R-250. Gel byl následně odbarven v odbarvovacím roztoku pro SDS-PAGE, promyt destilovanou vodou a vysušen. Pro porovnání molekulové hmotnosti rozdělených proteinů byl použit standard molekulových hmotností PageRuler Unstained Protein Ladder.

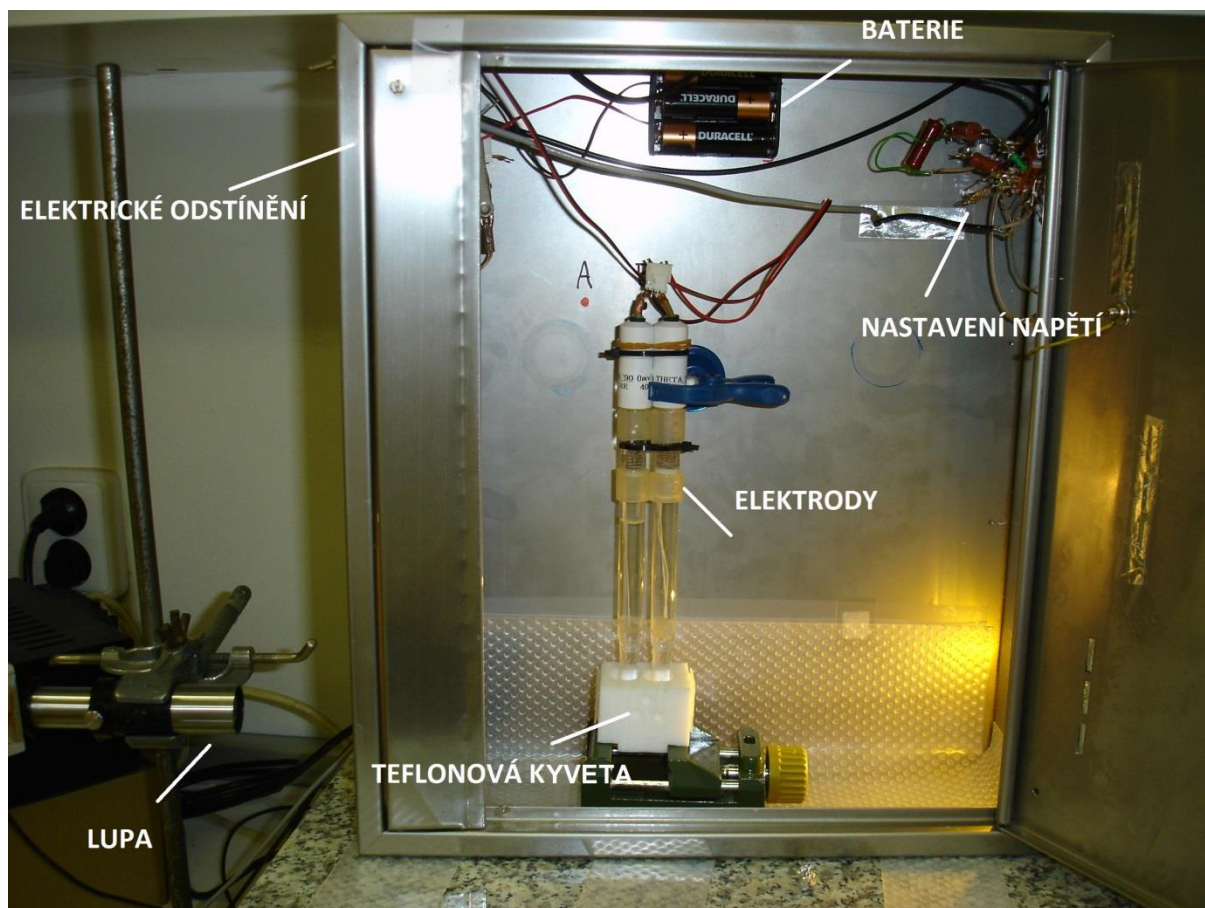
3.6.9 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku bylo použito metody Bradfordové. Byla připravena série ředění BSA v rozmezí 10-100 $\mu\text{l/ml}$, která sloužila jako kalibrační standard. K ředění byl použit stejný pufr, který je užíván k přípravě měřeného vzorku. Poté bylo ke 100 μl jednotlivých ředění standardů, vzorků a samotného pufru, který sloužil jako referenční standard, přidáno 900 μl činidla Bradfordové. Vzorky byly promíchány a inkubovány při pokojové teplotě 15 minut. Poté byla měřena absorbance série standardů a měřeného vzorku proti referenčnímu standardu při vlnové délce 595 nm. Nakonec byla sestavena kalibrační křivka, z níž byla odvozena koncentrace proteinu ve vzorku.

3.6.10 Měření na černých lipidových membránách

3.6.10.1 Aparatura pro BLM

Měření na černých lipidových membránách jsem prováděla pomocí aparatury pro BLM, Obr. 7. Aparatura se skládala z teflonové kyvety, elektrod, přepínače pro nastavení elektrického napětí, baterií, Faradayovy klece, lupy. Celé zařízení bylo umístěno na mramorové desce se vzduchovým odpružením, aby případné mechanické otřesy nerušily měření. Faradayova klec pak sloužila podobně pro odstínění elektrického rušení.



Obr. 7 Aparatura pro měření na BLM.

Teflonová kyveta byla rozdělena na dvě části přepážkou. Čelní stěny byly tvořeny sklem, aby bylo možné pozorovat stav membrány. V přepážce kyvety byl otvor o průměru přibližně 0,5 mm. Membrána byla vytvářena nanášením směsi lipidů přes otvor v přepážce. Složení membrány záviselo na druhu pokusu. Nejčastěji jsem používala azolektin (směs fosfolipidů ze sójových bobů) rozpuštěný v n-dekanu a butanolu (9:1 v/v). Pro některá měření byl ještě přidán cholesterol. Jako elektrolyt jsem používala roztok KCl o koncentraci od 100 mM do 1 M, 50 mM Tris, pH = 7,4. K měření elektrického proudu jsem užívala Ag/AgCl elektrody, zesilovač Femto LCA-4k-1G a LCA-200-100G. Signál byl digitalizován kartou Keithly KPCI-3108 a následně zpracováván v softwaru BLM2 (vytvořeno doc. Jiřím Bokem, MFF, Univerzita Karlova v Praze). Pro vkládání napětí na membránu sloužily dvě AA baterie. Hodnota napětí byla dle potřeby měněna přepínačem napětí (odporovým děličem).

Před samotným měřením bylo nutné teflonovou kyvetu vymýt od případných kontaminací. Nejdříve jsem ji vypláchla horkou vodou a poté etanolem. Nechala jsem kyvetu přibližně 10-15 minut vyschnout a poté jsem na otvor v přepážce kyvety a jeho

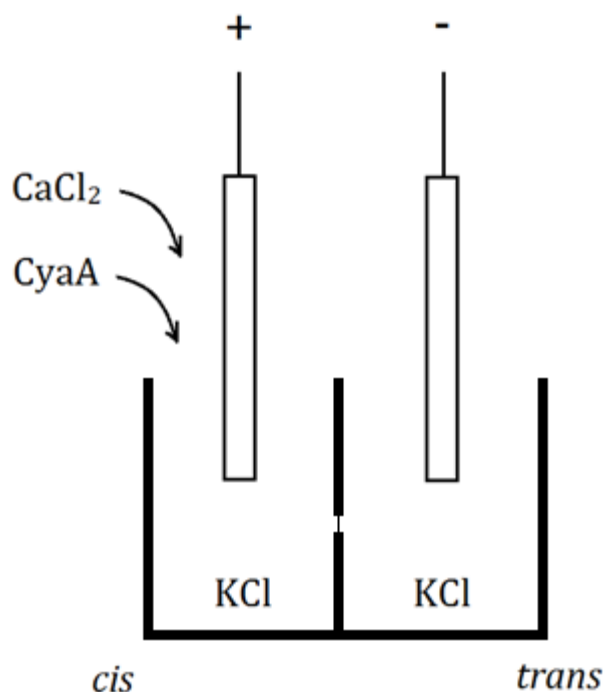
okolí nanasla směs azolektinu s chloroformem (Směs 4). Tato směs byla užívána z důvodů vlastností teflonové kyvety, jejíž výhodou je, že je inertní a snadno omyvatelná, zároveň je však lipofobní a je tedy nutné ji před samotným nanášením azolektinové membrány ošetřit malým množstvím (cca 1-5 μ l) směsi lipidů s chloroformem.

Po 10-15 minutách od nanesení směsi chloroformu a lipidů jsem naplnila obě části kyvety elektrolytem. Objem elektrolytu byl na každé straně přepážky 2,5 ml. Na jednu stranu přepážky jsem přidala CyaA wt (wild type, divoký typ toxinu). Strana, na kterou byl přidáván toxin, je označována jako *cis* Obr. 8. Takovéto uspořádání napodobuje cytoplazmatickou membránu cílové buňky (Karimova et al. 1998). Na *cis* stranu jsem také přidávala 2 mM CaCl_2 .

Před každým měřením bylo vždy nutné zjistit čistotu kyvety, tedy zda se v kyvetě nevyskytuje kontaminace. Do kyvety jsem na *cis* stranu přidala CaCl_2 a pipetou promíchala její obsah. Takto připravenou kyvetu jsem vložila do aparatury pro měření na černých lipidových membránách, ponořila jsem elektrody do kyvety, zavřela aparaturu a spustila měření. Pokud se v záznamu bez přidání CyaA objevila kontaminace, bylo nutné kyvetu opět vyčistit výše popsaným postupem.

Pokud se žádná kontaminace neobjevila během přibližně 10 minut záznamu a na průměrně 3-5 membránách, přidala jsem toxin na *cis* stranu, promíchala pipetou a mohla jsem přistoupit k samotnému měření.

Během jednoho dne měření jsem vytvořila přibližně 20-30 membrán. Azolektinové membrány měly životnost průměrně 5-10 minut, někdy i méně. Membrány s přísadkou cholesterolu byly stabilnější a měly průměrnou životnost o něco delší, okolo 10 minut.



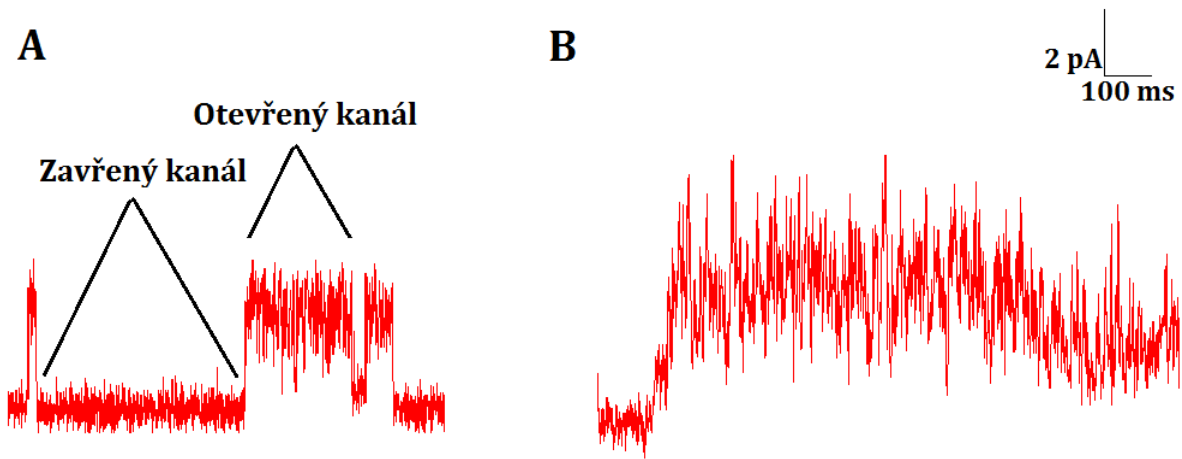
Obr. 8 Schéma pokusu z hlediska přidání CyaA. Strana, na kterou byl přidáván toxin, je označována jako *cis*. Na stejnou stranu jako CyaA byly přidávány vápenaté ionty ve formě 2 mM CaCl₂. Na *cis* stranu bylo vkládáno kladné napětí, na *trans* stranu záporné. Koncentrace elektrolytu se měnila v závislosti na pokusu od 0,1 M až 1 M.

3.6.10.2 Záznam jednotlivých CyaA kanálů

Na membránu bylo vkládáno napětí o známé hodnotě. V mém případě to bylo v rozmezí hodnot -18 mV až 92 mV. Při konkrétní hodnotě nastaveného elektrického napětí byl měřen elektrický proud, který procházel pórem tvořeným CyaA. Zabudování molekuly CyaA do umělé fosfolipidové membrány a otevření kanály bylo možné sledovat jako nárůst naměřeného elektrického proudu.

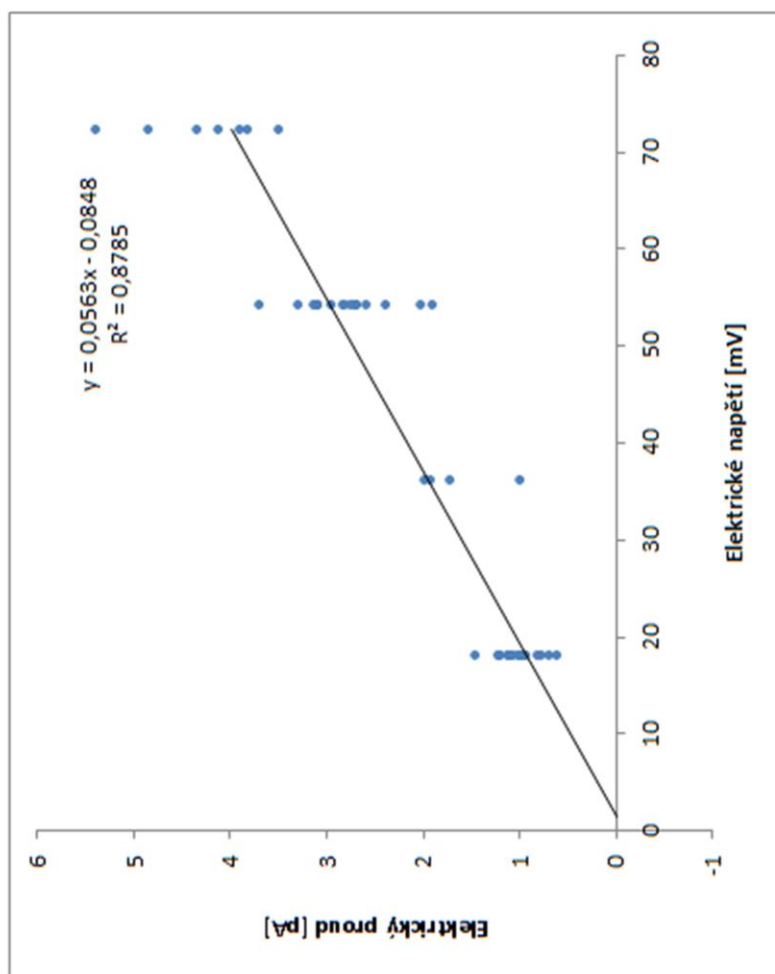
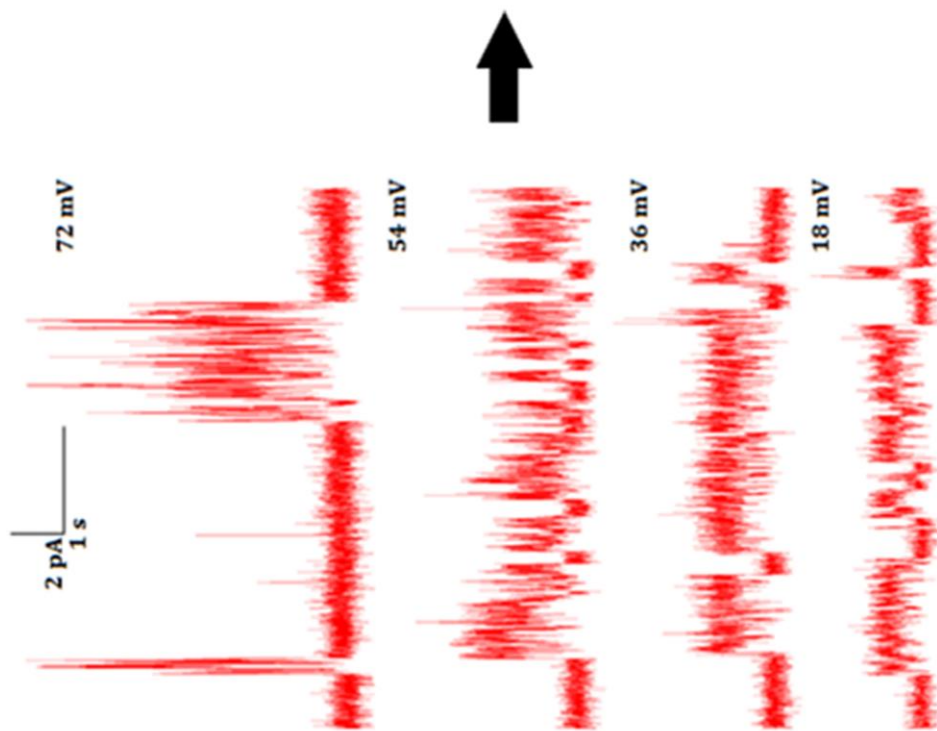
Jednotlivé kanály byly zaznamenávány programem BLM2. Samotné zpracování probíhalo v programu QuB (Milescu, Nicolai, and Bannen 2013). Pro názornost uvádím na Obr. 9 záznam ze softwaru QuB, abych zde ukázala, která měření jsem brala v potaz při vyhodnocování. Na obrázku je znázorněn průběh měřeného elektrického proudu v čase. V okamžiku, kdy se molekula CyaA zabuduje do membrány, je patrný nárůst elektrického proudu. V části A je zobrazen výběr kanálů, které je možné dále vyhodnocovat. V části B je záznam, který není možné vzít do vyhodnocování. Nelze zde rozeznat jednotlivé kanály.

Změřené hodnoty elektrického proudu byly vynášeny v závislosti na elektrickém napětí do grafu. Na Obr. 10 je záznam jednotlivých kanálů při různých hodnotách elektrického napětí.

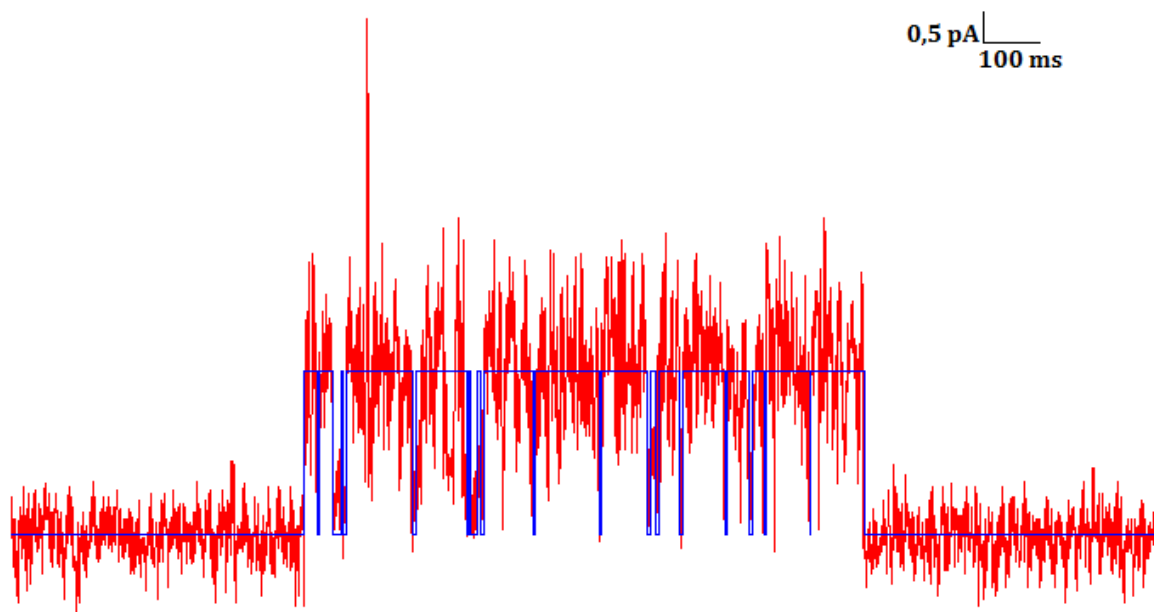


Obr. 9 Výběr záznamu pro další zpracovávání. Červenou barvou je znázorněn průběh měřeného elektrického proudu v čase. Nárůst elektrického proudu směrem nahoru znázorňuje elektrický proud, který prochází kanálem CyaA po jeho zabudování do membrány. V části A je znázorněn kanál, který je možné vzít pro další pracování. Je zde patrný nárůst změřeného elektrického proudu, když se CyaA kanál otevřel, byl určitou dobu otevřený, a poté se opět zavřel. V části B je záznam, který nelze dále zpracovávat.

Z jednoho dne měření vzniklo průměrně 40-60 výřezů kanálů, které byly dále zpracovány. Počet otevření a zavření kanálů v jednotlivých výřezech záviselo na konkrétním výběru. Ukázkový výřez a jeho analýza jsou zobrazeny na Obr. 11.



Obr. 10 Záznam jednotlivých kanálů při různých hodnotách elektrického napětí. V levé části zobrazeny ukázkové výřezy měření z programu QuB. Každý bod v grafu odpovídá jednomu takovému výřezu. Data slouží ke stanovení iontové selektivity, které probíhá v gradientu elektrolytů na stranách membrány.



Obr. 11 Analýza výřezu v programu QuB. Červená linie znázorňuje změřený elektrický proud procházející kanálem CyaA. Modrá linie zobrazuje analýzu tohoto kanálu, počet otevření (horní úroveň linie) a zavření (spodní úroveň linie) kanálu CyaA. V tomto výřezu se kanál 17x otevřel a 18x zavřel. Záznam při 54 mV, záznam signálu nefiltrován.

3.6.10.3 Stanovení iontové selektivity kanálů CyaA

Každá buňka je od svého okolí ohraničena buněčnou membránou. Uvnitř a vně buňky je různá koncentrace iontů. Tok různých iontů přes membránu je dán koncentračními gradienty mezi oběma stranami membrány, propustností pro jednotlivé ionty a rozdílem napětí na membráně. Iontovou selektivitu kanálů, zabudovaných do umělé fosfolipidové dvojvrstvy, je tedy možné definovat jako poměr propustnosti kanálu pro jednotlivé kationty a anionty.

Stanovení iontové selektivity vychází z Goldman-Hodgkins-Katzovy rovnice (Rovnice 1). Máme-li membránu, na které je koncentrační gradient a známe-li koncentrace iontů na obou stranách membrány, můžeme pomocí Goldman-Hodgkins-Katzovy rovnice vypočítat hodnotu elektrického napětí vznikajícího samovolně na membráně.

$$U = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k \cdot c_{trans} + P_a \cdot c_{cis}}{P_k \cdot c_{cis} + P_a \cdot c_{trans}} \quad \text{Rovnice 1}$$

U – elektrické napětí (V)

R – plynová konstanta; 8,31 (J.mol⁻¹.K⁻¹)

T – teplota, 293 (K)

F – Faradayova konstanta, 96500 (A.s.mol⁻¹)

P_k, P_a – propustnost kanálů pro kationty, anionty

c_{cis}, c_{trans} – koncentrace elektrolytů na stranách membrány

Pokud definuji iontovou selektivitu kanálu jako propustnost kationtů ku propustnosti aniontů $S_{k/a} = \frac{P_k}{P_a}$ (ve směru z *cis* strany na *trans* stranu), mohu Rovnici 1 napsat ve tvaru:

$$S_{k/a} = \frac{1 - B \cdot e^{U \cdot w}}{e^{U \cdot w} - B} \quad \text{Rovnice 2}$$

w – konstanta, $w = \frac{F}{RT}$

B – poměr koncentrací elektrolytu na obou stranách membrány, $B = \frac{c_{cis}}{c_{trans}}$

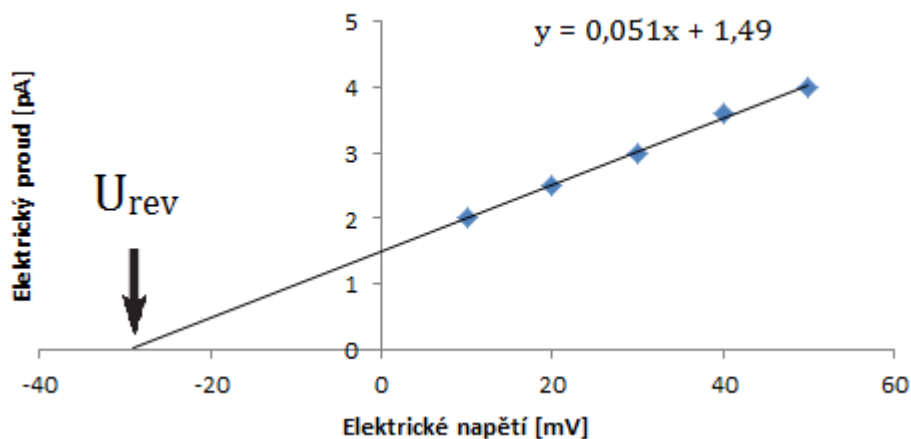
Rovnice 2 je upravena do podoby, kdy sledujeme poměr průchodnosti iontů (Fišer 2003). Např. hodnota $S_{k/a} = 8$, vyjadřuje, že na osm kationtů projde jeden aniont.

V našem případě pokusy, při kterých byla stanovována iontová selektivita, probíhaly v gradientu elektrolytů. Elektrolyty byly na obou stranách stejného složení, ale v různé koncentraci. Ionty se snaží kanálem procházet po koncentračním gradientu, rychleji by měly procházet ty, pro které má kanál větší propustnost, tedy selektivitu. Kanálem tím pádem bude procházet víc iontů jednoho typu. Membrána, která obsahuje iontově selektivní kanál, se stává zdrojem elektrického napětí a elektrického proudu. My se snažíme zjistit hodnotu tohoto elektrického napětí, protože jeho velikost závisí na selektivitě kanálu a na gradientu na membráně. Principem měření iontové selektivity je tedy to, že vkládáme na membránu vnější elektrické napětí a hledáme takové, které vyrovná potenciál samovolně vznikající na membráně. Jinak řečeno, hledáme reverzní napětí (U_{rev}), při kterém přestane protékat membránou elektrický proud.

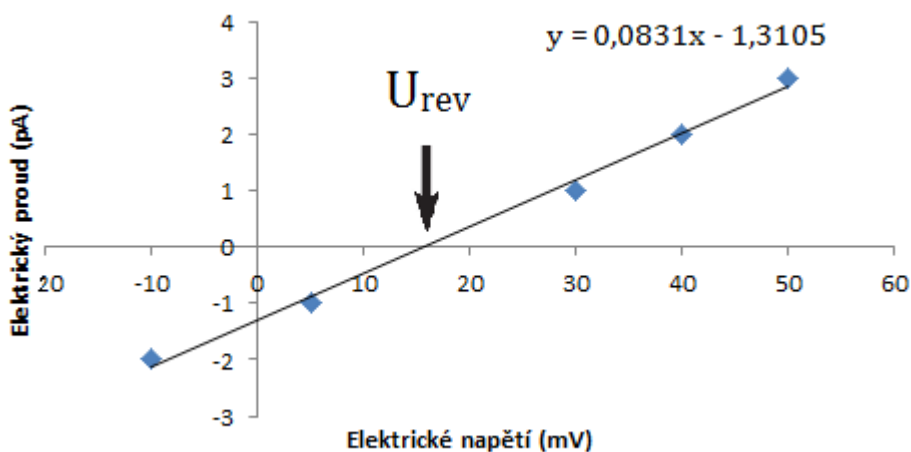
Iontovou selektivitu je možné stanovovat buď za podmínek, kdy je *cis* strana koncentrovanější (v našem případě *cis* strana 1M KCl a *trans* strana 0,1 M KCl) nebo naopak když je *trans* strana koncentrovanější (v našem případě *cis* strana 0,1M KCl a *trans* strana 1 M KCl) Obr. 12 a Obr. 13. V prvním případě je stanovení reverzního potenciálu méně přesné, protože nejsme schopni z technických důvodů vkládat na membránu velmi nízké elektrické napětí, které by kompenzovalo elektrické napětí

membrány. Hodnotu U_{rev} tak získáme extrapolací získaných dat. V případě druhém je získaný reverzní potenciál přesnější, protože hodnotu U_{rev} získám interpolací.

V obou případech z rovnice přímky spočítáme přesnou hodnotu reverzního potenciálu (U_{rev}), která vstupuje do Rovnice 2.



Obr. 12 Stanovení reverzního potenciálu extrapolací. Podmínky měření: *cis* 1 M KCl, *trans* 0,1 M KCl.



Obr. 13 Stanovení reverzního potenciálu interpolací. Podmínky měření: *cis* 0,1 M KCl, *trans* 1 M KCl.

V pokusech, kdy jsme stanovovali, zda kanálem CyaA prochází více draselných či vápenatých iontů bylo třeba použít rozšířenou verzi Goldman-Hodking-Katzovy rovnice (Branch and Wright 2007). Vápník se v porovnání s draslíkem vyskytuje v extracelulárním prostředí v nízké koncentraci. Zdálo by se tedy, že vápník nebude mít na membránový potenciál velký vliv. Nicméně otevřením kanálu, který je

kationselektivní, může dojít ke zvýšení vlivu vápníku na membránový potenciál. Jelikož je však vápník dvojmocný iont, je třeba použít upravenou Goldman-Hodking Katzovu rovnici:

$$E_{AB} = (-RT/F) \cdot (2,303) \log_{10} y \quad \text{Rovnice 3}$$

kde

$$y = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

a dále

$$\begin{aligned} a &= 4P_{Ca}[Ca]_{trans} + P_K[K]_{trans} + P_{Cl}[Cl]_{cis} \\ b &= P_K[K]_{trans} - P_K[K]_{cis} + P_{Cl}[Cl]_{cis} - P_{Cl}[Cl]_{trans} \\ c &= -(4P_{Ca}[Ca]_{cis} + P_K[K]_{cis} + P_{Cl}[Cl]_{trans}) \end{aligned}$$

P – propustnost pro konkrétní iont

a, b, c – koeficienty kvadratické rovnice

hranaté závorky značí koncentrace iontů, *cis* značí stranu toxinu

3.6.10.4 Výpočet vodivosti kanálu CyaA

Pro výpočet vodivosti jednotlivých kanálů je využíváno Ohmova zákona, kdy vodivost G [S] je definována jako poměr elektrického proudu a elektrického napětí:

$$G = \frac{I}{U} \quad \text{Rovnice 4}$$

Při měření na černých lipidových membránách sledujeme dvě hladiny elektrického proudu pomocí softwaru QuB. Základní hladina je klidový elektrický proud. Když se zabuduje molekula CyaA a otevře se kanál, zvýší se elektrický proud na určitou hodnotu. Z rozdílu těchto elektrických proudů počítáme vodivost kanálů CyaA.

4 Výsledky

4.1 Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA

Bezprostřední okolí ovlivňuje iontové kanály. Určuje totiž lokální distribuci nábojů a hraje roli pro geometrii ústí kanálů, což následně ovlivňuje jejich funkci. Jedním z kroků translokace AC domény je přesun CyaA do lipidového raftu, což je místo bohaté na cholesterol. V lipidovém raftu je AC doména translokována do cytozolu hostitelské buňky a poté odstrážena proteázami přítomnými v buňce od zbytku molekuly CyaA (Bumba et al. 2010). Zde poté dochází po aktivaci buněčným kalmodulinem ke konverzi ATP na cAMP (Wolff et al. 1980).

Nás zajímalo, zda má cholesterol vliv i na kanálotvornou aktivitu CyaA. Autoři (Osicková et al. 1999) ve své práci naznačují existenci dvou možných konformací (pórotvorná a translokační) CyaA a jejich způsobů interakce s hostitelskou membránou. Není známo, zda translokace AC domény nějakým způsobem ovlivňuje tvorbu kanálů. Pokud by ji však například inhibovala, tak by přítomnost cholesterolu, a tím případně častější translokace AC domény, v membráně znamenala menší výskyt kanálů CyaA.

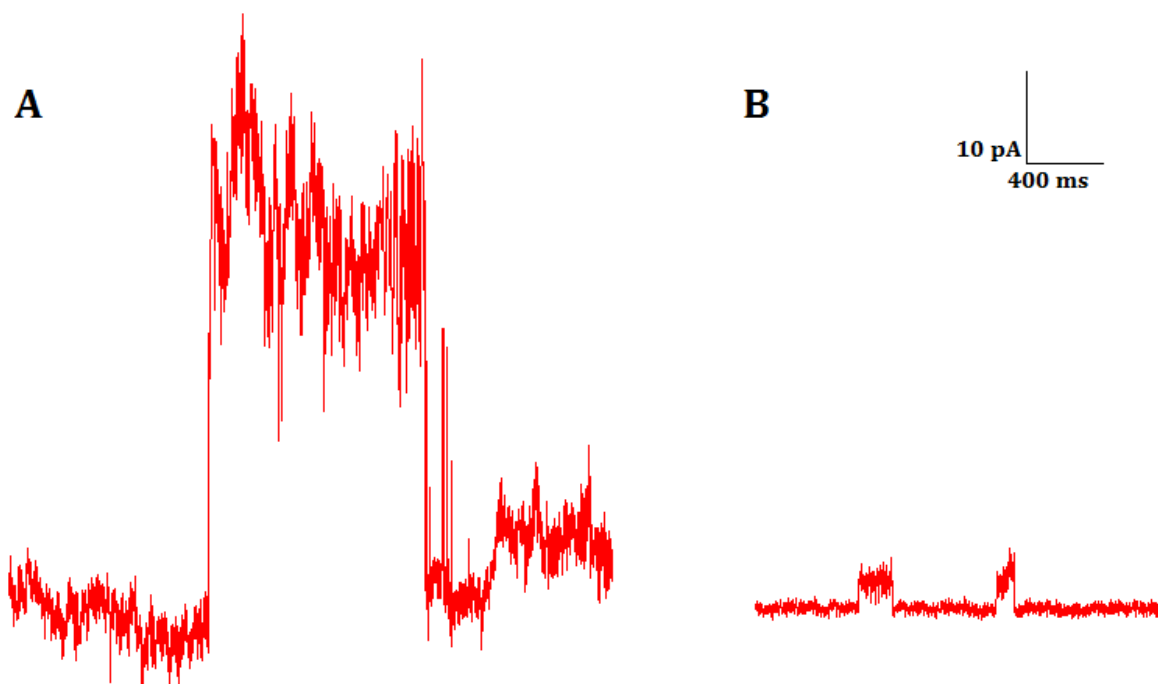
Dalším bodem našeho zájmu bylo zjistit případně iontovou selektivitu CyaA kanálů v cholesterolových membránách. Předpokládali jsme, že se budou v této membráně vytvářet kanály jiného typu než v azolektinových membránách.

4.1.1 Výskyt velkých kanálů tvořených CyaA v membránách s cholesterolem

Jako první jsem vytvořila membránu, která obsahovala 20 % cholesterolu (Směs 2). Z tohoto měření se však nepodařilo stanovit iontovou selektivitu. Záznam jednotlivých kanálů nebylo možno vzít pro další vyhodnocování. Namíchala jsem tedy novou směs, která obsahovala 30 % cholesterolu (Směs 3). Zde již předchozí problém nenastal a bylo možné pozorovat jednotlivé kanály CyaA, proto všechna další měření probíhala na membráně s 30% obsahem cholesterolu.

Za podmínek, kdy byl na obou stranách membrány 1 M roztok KCl, Tris 10 mM (pH = 7,4), na *cis* stranu bylo přidáno 0,5 μ l CyaA (výsledná koncentrace 134 ng/ml) a 5 μ l

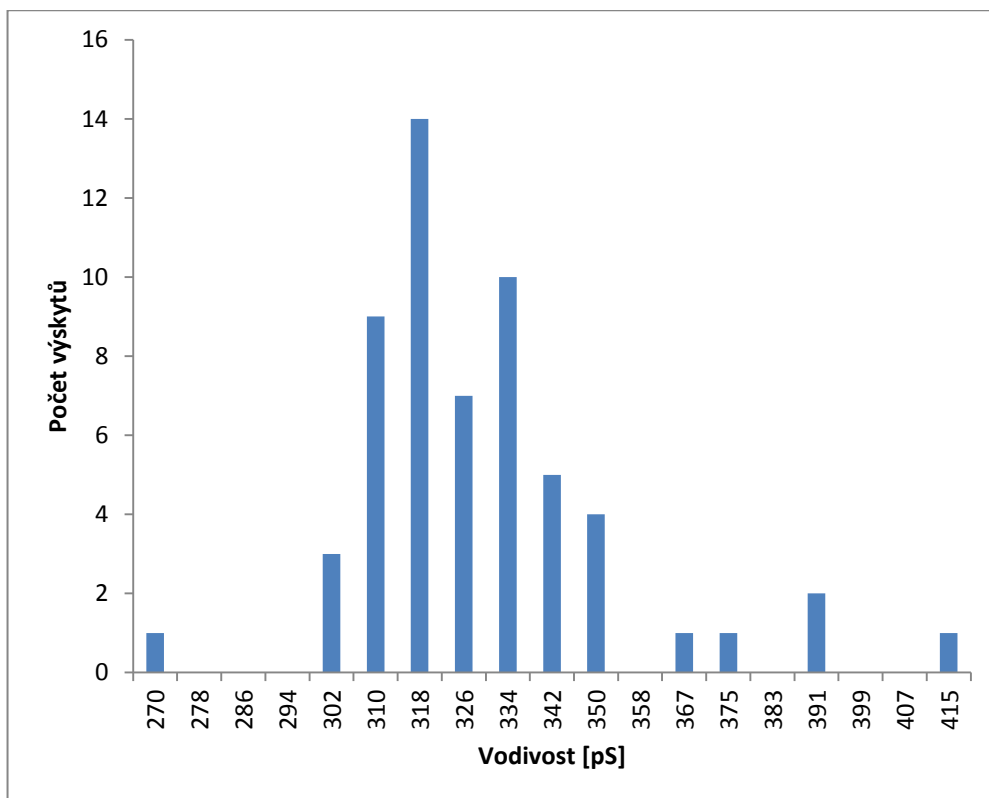
CaCl₂ (výsledná koncentrace 2 mM) jsem zaznamenala výskyt velkých kanálů Obr. 14. Měření probíhalo za pokojové teploty, T=25°C.



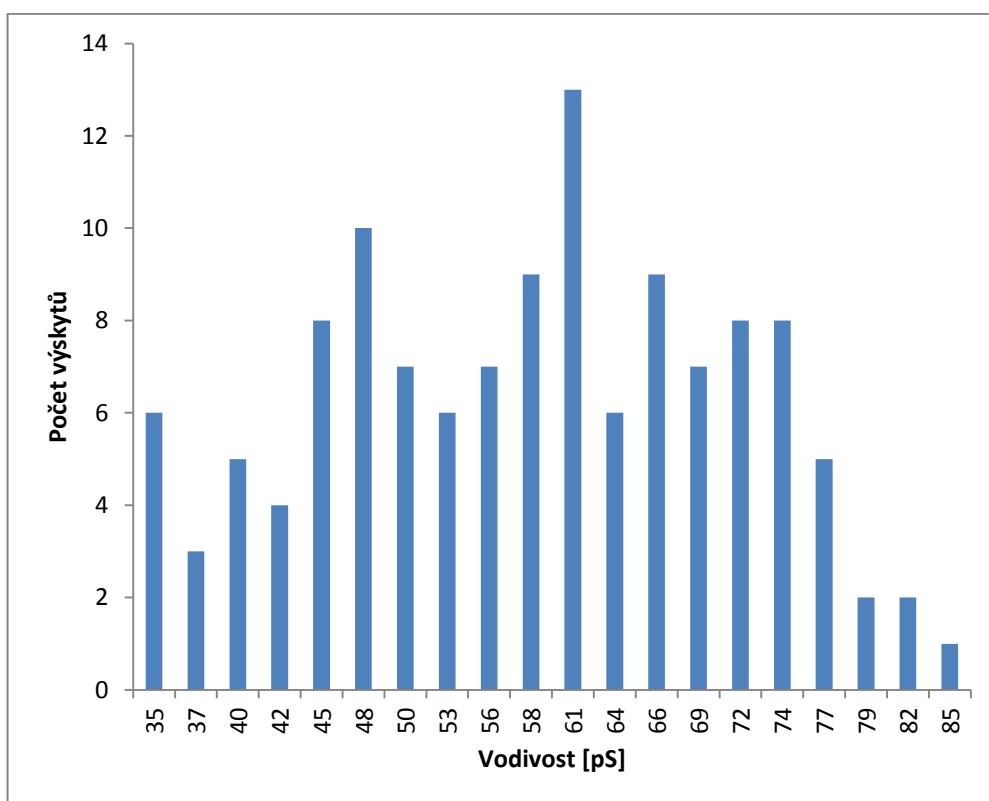
Obr. 14 Porovnání pozorovaných kanálů v membráně s cholesterolem. A - velký kanál, vodivost 321 ± 19 pS. B - malý kanál, vodivost 57 ± 13 pS. Signál byl filtrován low-pass filtrem při 0,07 kHz.

Frekvence výskytu velkých kanálů (s větší vodivostí) byla přibližně 1-2 kanály na jednu vytvořenou membránu (při jednom měření vytvořeno průměrně 25 membrán). Z mnou vybraných výřezů v programu Qub připadal v průměru na 4 malé kanály (s menší vodivostí) 1 velký kanál. Průměrná vodivost velkých kanálů byla při konstantním napětí 54 mV 321 ± 19 pS. Průměrná vodivost malých kanálů byla taktéž při konstantním napětí 54 mV 57 ± 13 pS. Histogramy vodivostí jednotlivých kanálů obou druhů jsou zobrazeny na Obr. 15 a Obr. 16. Kanály s nižší vodivostí byly poměrně heterogenní skupinou.

Oproti pokusům s pouze azolektinovou membránou, byla membrána s přidavkem cholesterolu mnohem stabilnější, odolávala lépe mechanickým otřesům a téměř nepraskala. Jedna membrána měla životnost přibližně 10 minut.



Obr. 15 Histogram vodivostí jednotlivých velkých kanálů. Průměrná vodivost kanálů 321 ± 19 pS.

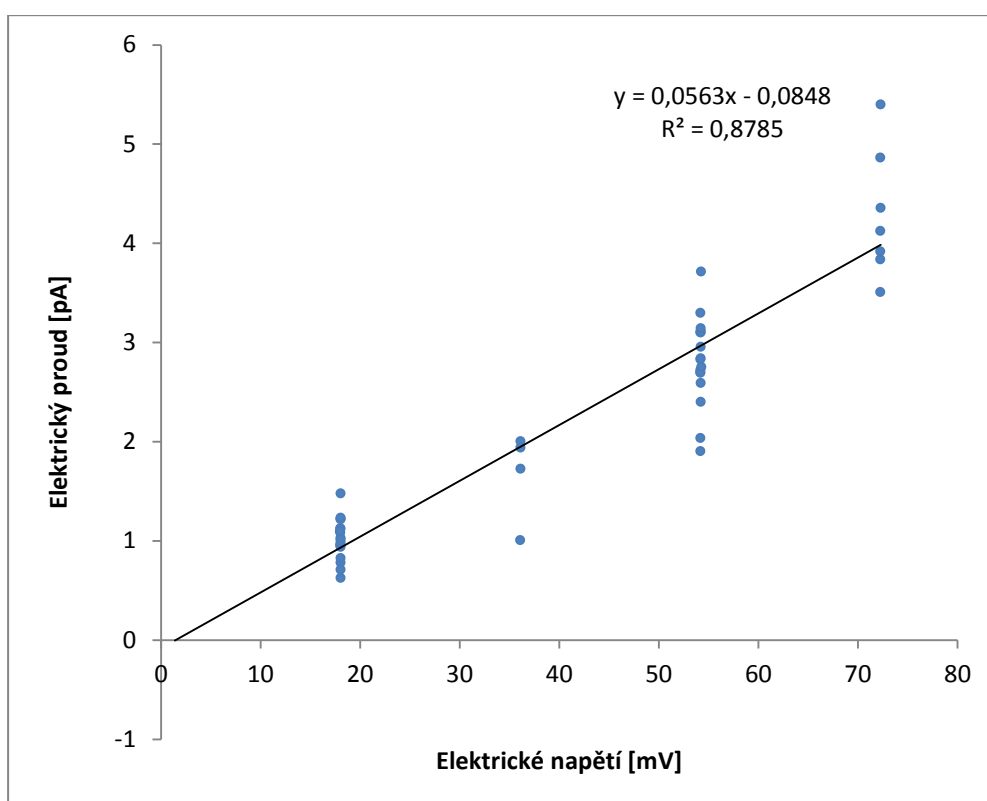


Obr. 16 Histogram jednotlivých vodivostí malých kanálů. Průměrná vodivost kanálů 57 ± 13 pS.

4.1.2 Iontová selektivita kanálů CyaA v cholesterolových membránách

Iontovou selektivitu jsem u membrány s 30% obsahem cholesterolu měřila za podmínek 1 M KCl, Tris 10 mM, (pH = 7,4) na *cis* straně a 0,1 M KCl, Tris 10 mM, (pH = 7,4) na *trans* straně. Na *cis* stranu jsem přidala 0,5 μ l CyaA (výsledná koncentrace 134 ng/ml) a 5 μ l 1 M CaCl₂ (výsledná koncentrace 2 mM). Měření probíhalo za pokojové teploty, T=25°C.

Velké kanály se za podmínek, kdy je na membráně gradient elektrolytů, takřka nevyskytovaly. Iontovou selektivitu se podařilo stanovit jen u malých kanálů, data z měření zobrazena na Obr. 17.



Obr. 17 Data pro stanovení iontové selektivity malých kanálů v 30% cholesterolové membráně. Z rovnice přímky je stanoven reverzní potenciál $U_{rev} = 1,5$ mV, ze kterého je Goldman-Hodking Katzovou rovnicí vypočítána iontová selektivita.

Výsledky měření iontové selektivity kanálů v cholesterolových membránách jsou shrnuty v Tab. 2. Kanály jsou dle výsledné iontové selektivity kationtselektivní. Kationtselektivita kanálů v membránách s cholesterolem je však oproti kanálům bez cholesterolu nižší.

Druh membrány	Typ kanálu	Iontová selektivita ($S_{k/a}$)
Azolektin	Malý	4,6
Azolektin + 30% cholesterol	Malý	1,1
Azolektin + 30% cholesterol	Velký	-

Tab. 2 Iontová selektivita cholesterolových membrán, pro porovnání uvádím iontovou selektivitu membrány bez cholesterolu.

4.2 Vliv elektrického napětí na aktivitu CyaA

CyaA tvoří dva druhy pórů v závislosti na orientaci elektrického membránového potenciálu. Pokud je elektrické napětí kladné při 50 mV na *cis* straně (straně, kde je přidáván CyaA), pak CyaA tvoří póry s průměrnou vodivostí jednotlivých kanálů kolem 45 pS v 1 M KCl (pH 7). Tyto póry jsou otevřené přibližně 2 s. Je-li na *cis* stranu vložen negativní potenciál, tak se objevují fluktuace elektrického proudu, který pórem prochází. Doba otevření těchto rychle se otevírajících a zavírajících kanálů je kratší než 10 ms (Knapp et al. 2008). Kanálotvorná aktivita je tedy při negativním potenciálu snížena. Pokud není vloženo elektrické pole na membránu, tak se kanály CyaA orientují, jako když je vložen kladný potenciál na *cis* stranu, což odpovídá situaci *in vivo* (Knapp et al. 2008).

My jsme chtěli zjistit, zda hodnota elektrického napětí má vliv na dobu, za kterou se molekula CyaA zabuduje do membrány po jejím vytvoření. Také jsme chtěli zjistit, zda existuje závislost mezi dobou otevření kanálu CyaA a hodnotou elektrického napětí. Předpokládali jsme, že při vyšší hodnotě elektrického napětí by mohl být čas, za jaký se molekula CyaA zabuduje do membrány, nižší, než u nižších hodnot napětí. Při vyšší hodnotě elektrického napětí by kanály mohly být buď delší dobu otevřené, nebo se jich zabudovává víc.

4.2.1 Závislost rychlosti zabudování CyaA na elektrickém napětí

Pro měření byla užita azolektinová membrána (Směs 1). Kyveta byla naplněna na obou stranách elektrolytem KCl, Tris 10 mM, pH = 7 o koncentraci 1 M. Na *cis* stranu bylo přidáno 5 μ l 1 M CaCl₂ (výsledná koncentrace 2 mM) a 0,5 μ l CyaA (výsledná koncentrace 134 ng/ml). Měření probíhalo za pokojové teploty, T = 25°C.

Dobu, za kterou se molekula CyaA zabudovala do membrány, jsem zjišťovala měřením času od okamžiku, kdy se membrána zformovala do okamžiku zabudování prvního kanálu. Jakmile se molekula CyaA inkorporovala, membránu jsem zničila a opět nanesla novou a měřila čas zabudování nové molekuly CyaA. Takto jsem pokračovala do té doby, než jsem získala soubor hodnot, které jsou uvedeny v Tab. 3. Z této přehledné tabulky se zdá, že není žádná souvislost mezi hodnotou elektrického napětí a dobou, kdy se molekula CyaA zabudovala do černé lipidové membrány.

Důvod, proč je velmi omezený počet výsledků u hodnot napětí 18-36 mV, je takový, že se molekuly CyaA při počátečních nízkých hodnotách vkládaného napětí do membrány takřka neinkorporovaly.

Napětí [mV]	Doba, za kterou se molekula zabudovala [s]	Průměrná hodnota času zabudování	Směrodatná odchylka
91	6,26	7,2	1,3
91	8,13		
72	60,91	34	32
72	62,65		
72	7,77		
72	6,12		
55	60,12	22	18
55	29,10		
55	11,11		
55	8,21		
55	8,43		
55	26,55		
55	19,54		
55	8,88		
35	5,61	5,61	
37	54,84	54,84	
18	40,41	40,41	

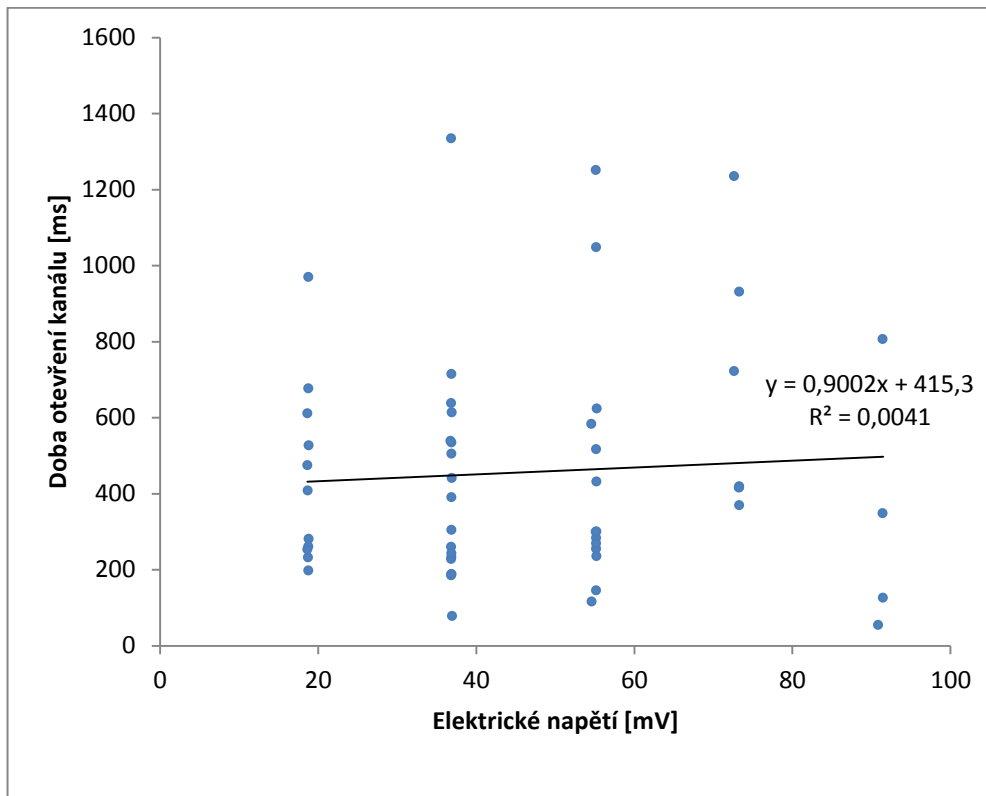
Tab. 3 Vliv napětí na dobu, za kterou se molekula CyaA zabudovala do membrány. Měření probíhalo v 1 M KCl, Tris 10 mM, (pH = 7,4) na obou stranách membrány. Na *cis* straně 134 ng/ml CyaA, 2 mM CaCl₂. Měření probíhalo za pokojové teploty, T = 25°C.

4.2.2 Závislost doby otevření kanálu CyaA na napětí

Pro měření byla použita azolektinová membrána (Směs 1). Kyveta byla naplněna na obou stranách elektrolytem KCl, Tris 10 mM, (pH = 7) o koncentraci 1 M. Na *cis* stranu

bylo přidáno 5 μl 1 M CaCl_2 (konečná koncentrace 2 mM) a 0,5 μl CyaA (konečná koncentrace 134 ng/ml). Měření probíhalo za pokojové teploty, $T = 25^\circ\text{C}$.

Výsledkem měření je Obr. 18. Z grafu vyplývá, že není žádná závislost mezi hodnotou elektrického napětí a dobou otevření CyaA kanálu.



Obr. 18 Závislost doby otevření kanálu CyaA na hodnotě elektrického napětí.

4.3 Velikost kanálů CyaA

Dřívější pokusy (Hille 1971, 1972), které se zabývaly velikostí a selektivitou iontových kanálů, byly prováděny s monovalentními kationty s různě velkým hydratačním obalem. V roztoku jsou kationty zcela obklopeny molekulami vody, čímž dochází ke zkreslení ve výpočtech velikosti kanálu.

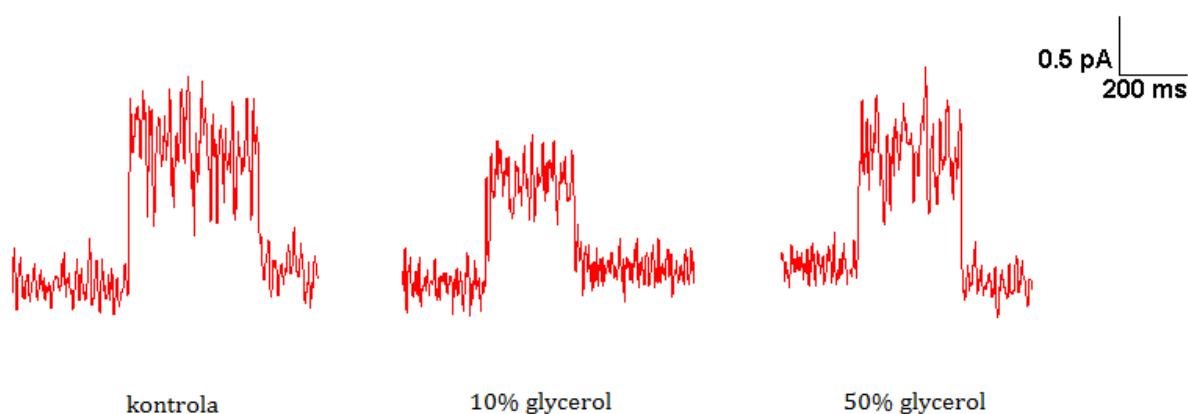
V mé diplomové práci byla na začátku pokusů, které měly vést k určení velikosti pórů CyaA, v plánu série podobných měření, které prováděli Sobko et al. v roce 2006 (Sobko et al. 2006). Tedy využití série neelektrolytů různé velikosti pro pozorování inhibice kanálu CyaA, kterým daný neelektrolyt prochází. Jelikož jsou neelektrolyty molekuly bez celkového náboje, tak jsme předpokládali, že při vstupu do kanálu se hydratační

obal ztrácí a prochází jen samotný elektrolyt. Výsledek by tak oproti dřívějším metodám měření mohl poskytnout reálnější představu o velikosti CyaA kanálu.

První měření probíhalo v elektrolytu s 50% obsahem glycerolu. Elektrolyt byl velmi vazký a měla jsem problém vytvořit membránu v přepážce kyvety. Po delším úsilí, když se membránu podařilo vytvořit, se kanály tvořily jen velmi neochotně. Příklad CyaA byl standardně 0,5 μl (konečná koncentrace 134 ng/ml), přídavek 1M CaCl_2 byl 5 μl (konečná koncentrace 2 mM). Vkládané napětí na membránu bylo v rozmezí 18-90 mV. Měření probíhalo za pokojové teploty, $T = 25^\circ\text{C}$. K vyhodnocení byl vzat jen záznam z napětí 54 mV. Průměrná vodivost kanálů v 50% glycerolu byla 29,44 pS.

Druhé měření probíhalo v 10% glycerolu. Roztok byl opět vazký, ale méně než v případě 50% glycerolu. Práce s ním byla o něco lepší, nicméně i v tomto případě byl problém vytvořit membránu v přepážce kyvety. Příklad CyaA a CaCl_2 byl totožný jako při prvním měření. Průměrná vodivost kanálů při 54 mV v 10% glycerolu byla 23,42 pS.

Pro kontrolu jsem užila záznam kanálů CyaA v 0,5 M KCl, Tris 10 mM ($\text{pH} = 7,4$) se stejným přídávkem toxinu a vápenatých iontů jako při měření s 10% a 50% glycerolem. Průměrná vodivost kanálů za těchto podmínek byla 25,39 pS.



Obr. 19 Vliv glycerolu na elektrický proud procházející jednotlivými kanály CyaA. Záznam kanálu zcela nalevo zobrazuje nárůst elektrického proudu způsobený vytvořením kanálu bez přítomnosti glycerolu. Záznam uprostřed znázorňuje kanál vytvořený v 10% glycerolu. Záznam zcela vpravo zobrazuje kanál v 50% glycerolu. Měření probíhalo při 54 mV. Signál byl filtrován low-pass filtrem při 0,07 kHz.

	0,5M KCl kontrola	0,5M KCl, 10% glycerol	0,5M KCl, 50% glycerol
Průměrná vodivost kanálů při 55 mV, [pS]	25,39	23,42	29,44
Směrodatná odchylka	4,88	5,42	6,02

Tab. 4 Průměrná vodivost kanálů za různého složení elektrolytu.

Z měření vyplývá, že glycerol s největší pravděpodobností pórem CyaA neprochází. Na záznamu na Obr. 19 je možné vidět, že v 10% glycerolu je elektrický proud procházející pórem CyaA o něco menší než je tomu u kontroly a v 50 % glycerolu. Z Tab. 4 je však patrné, že hodnoty průměrných vodivostí kanálů jsou srovnatelné s ohledem na směrodatné odchylky měření.

4.4 Vliv vápenatých iontů na iontovou selektivitu kanálů CyaA

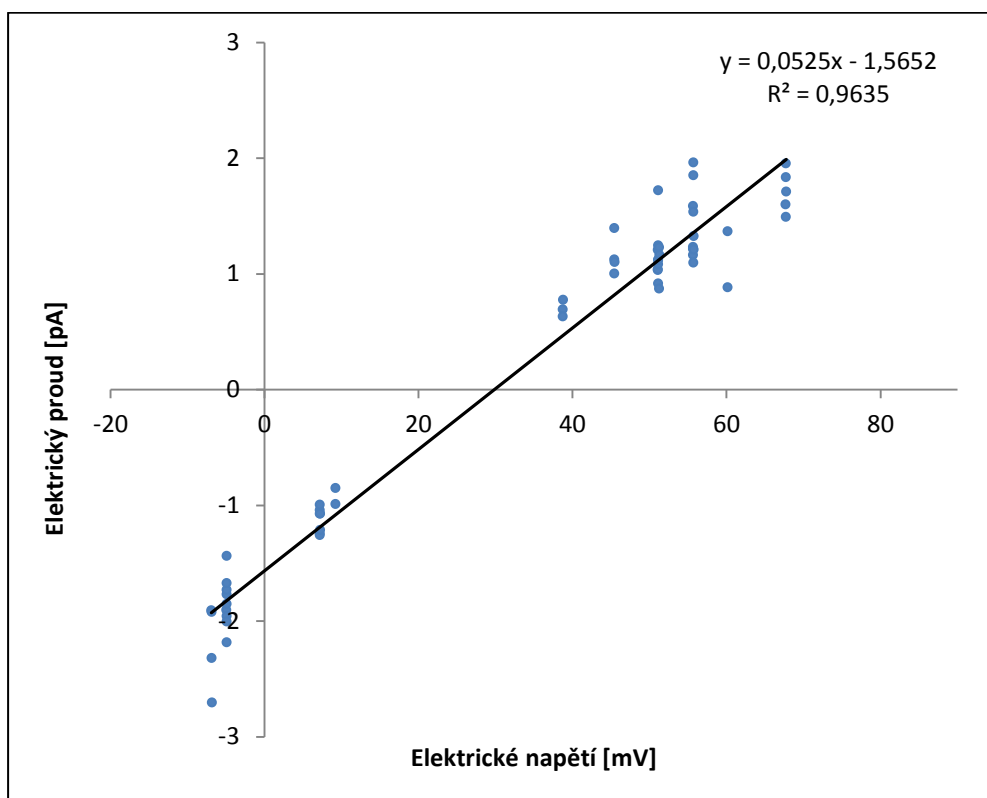
CyaA potřebuje vápenaté ionty pro vazbu na cílové buňky, tvorbu hemolytických kanálů a translokaci AC domény do buněk (Hanski and Farfel 1985). Minimální stimulační koncentrace vápenatými ionty se pohybuje od 0,6 do 0,8 mM, saturace vápenatými ionty nastává při koncentraci 10 mM a více (Knapp et al. 2003).

V našich pokusech jsme sledovali, zda mají vápenaté ionty vliv na iontovou selektivitu kanálů CyaA. Dále jsme se zabývali propustností kanálů CyaA pro vápenaté ionty. Zajímalo nás, kolikrát méně či více procházejí vytvořeným kanálem vápenaté ionty oproti draselným iontům.

4.4.1 Vliv vápenatých iontů na iontovou selektivitu CyaA kanálů

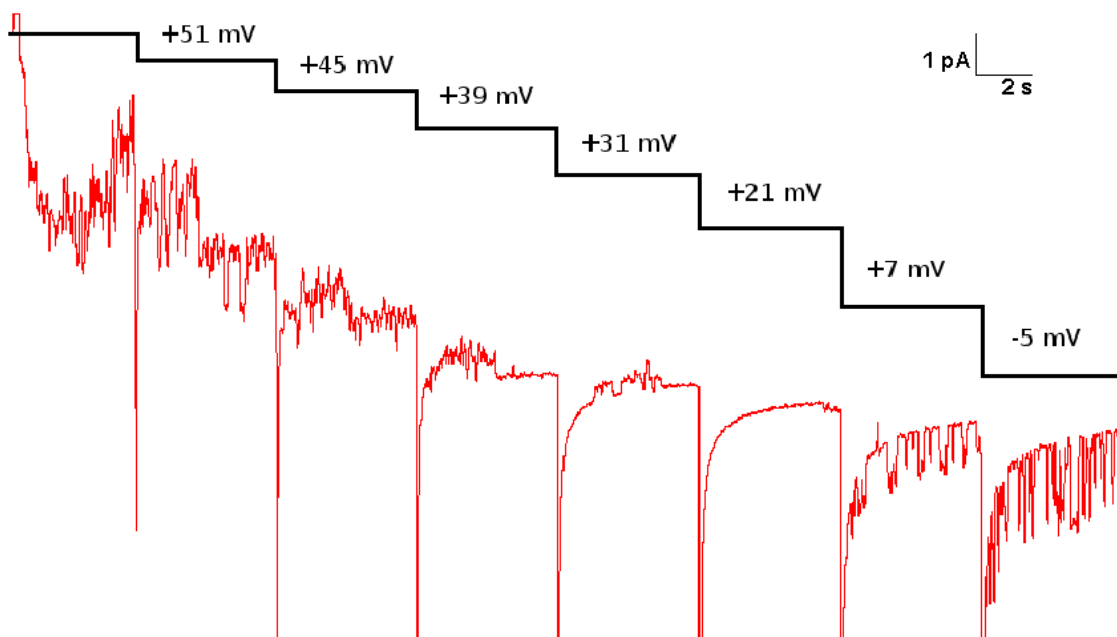
V literatuře je iontová selektivita CyaA kanálů bez přidání vápníku udávána v rozmezí 9-11 (Benz et al. 1994). Proto jsme provedli pokus bez přidání vápníku k toxinu. Podmínky měření byly následující. Na *cis* straně byl KCl o koncentraci 0,1 M, Tris 10 mM (pH = 7,4) a bylo přidáno 0,5 μ l CyaA (konečná koncentrace 134 ng/ml). Na *trans* straně byl KCl o koncentraci 1 M, Tris 10 mM (pH = 7,4). Během měření se ukázalo, že toxin je bez přítomnosti vápníku velmi málo aktivní. Bylo proto nutné přidat CyaA a konečný přídavek tak činil 4 μ l (finální koncentrace toxinu v roztoku činila 1,07 μ g/ml). Naměřená data jsou zobrazena na Obr. 20. Iontová selektivita kanálů CyaA bez

přidání vápníku byla $S_{k/a} = 4,6$. Kanály byly kation-selektivní, ale oproti literatuře byla iontová selektivita snížena.



Obr. 20 Data pro výpočet iontové selektivity CyaA kanálů pro draselné a chloridové ionty bez přidání vápníku. Hodnota $U_{rev} = 29,8$. Iontová selektivita byla 4,6. Kanály byly kationtselektivní.

Po stanovení iontové selektivity bez vápníku byl na obě strany kyvety přidán vápník, $5 \mu\text{l}$ 1 M CaCl_2 (konečná koncentrace 2 mM). Jelikož kyveta již z předchozího měření obsahovala větší množství toxinu ($1,07 \text{ mg/ml CyaA}$), způsobil přidavek vápníku takovou aktivitu toxinu, že nebylo možné sledovat jednotlivé kanály, protože se okamžitě zabudovalo příliš mnoho kanálů. Iontovou selektivitu za podmínek s vápníkem jsme proto stanovili z makroskopického pozorování Obr. 21. Oproti pokusu bez vápníku byla iontová selektivita snížena, $S_{k/a} = 2,8$.



Obr. 21 Stanovení iontové selektivity kanálů CyaA v přítomnosti vápenatých iontů z makroskopického pozorování závislosti elektrického proudu na elektrickém napětí. Při hodnotě elektrického napětí 21 mV došlo k zavření kanálů, což odpovídá hodnotě $U_{rev} = 21$ a iontové selektivitě $S_{k/a} = 2,8$.

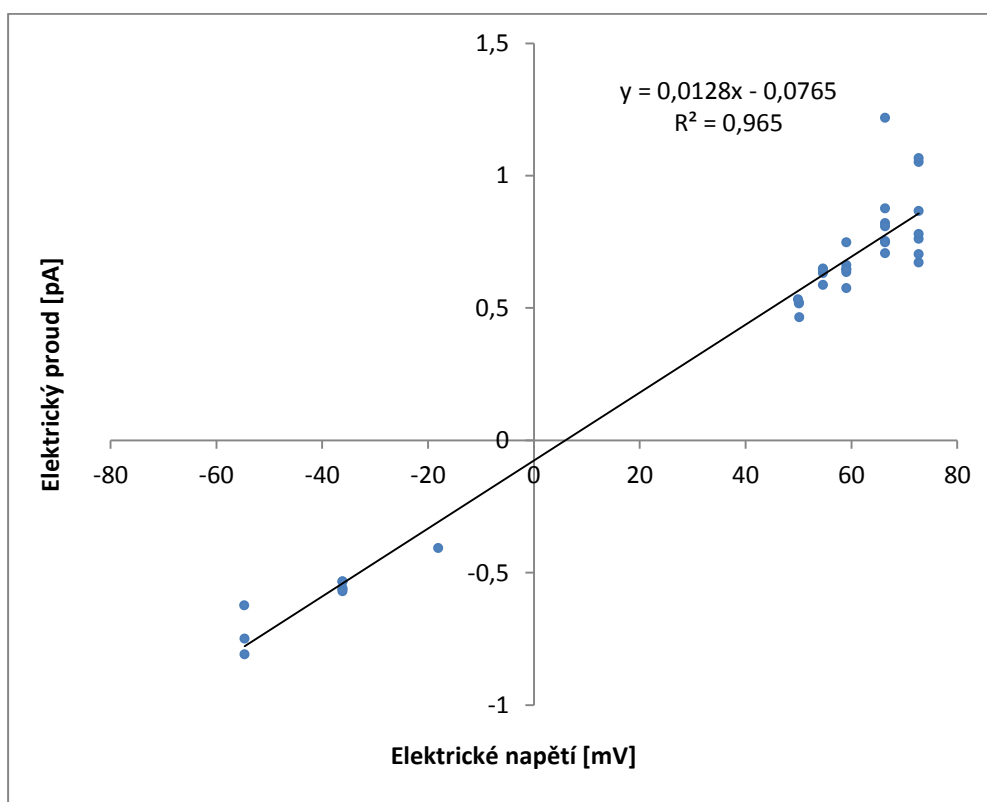
4.4.2 Propustnost kanálů CyaA pro vápenaté ionty

Dále nás zajímalo, kolikrát méně či více prochází vytvořeným kanálem vápenaté ionty oproti iontům draselným. Pro tyto účely byl použit roztok octanu draselného. Použití octanu draselného namísto chloridu draselného by nemělo mít takřka žádný vliv na vodivost CyaA kanálů, jak již popsali Benz et. al (Benz et al. 1994).

Pro pokus byla použita asolektinová membrána (Směs 1). Na *cis* straně byl 1 M octan draselný, 50 mM CaCl_2 . Na *trans* straně byl 100 mM octan draselný, 500 mM CaCl_2 . Na *cis* stranu jsem přidala 0,25 μl CyaA (konečná koncentrace 67 ng/ml). Výsledná data jsou zobrazena na Obr. 22. Iontová selektivita byla $S_{k/a} = 1,3$. Kanály byly slabě kationselektivní.

Pro zjištění propustnosti CyaA kanálů pro vápenaté ionty byla použita rozšířená Goldman-Hodking Katzova rovnice (Rovnice 3). Propustnost CyaA kanálů pro draslík a chlor byla stanovena z výsledků předchozích pokusů. Propustnost draslíku ku chloru byla 4:1. Tedy na čtyři draselné ionty projde jeden iont chloridový.

Po dosazení do upravené Goldman-Hodking Katzovy rovnice jsme získali propustnost vápníku ku draslíku 7,8:4. Na přibližně 8 molekul vápníku projdou 4 molekuly draslíku. Kanál byl pro vápník propustný.



Obr. 22 Data pro stanovení propustnosti kanálu CyaA pro draselné a vápenaté ionty. Hodnota $U_{rev} = 5,98$ mV byla dosazena do rozšířené Goldman-Hodking-Katzovy rovnice, jejímž výsledkem byla získána propustnost vápenatých iontů ku draselným iontům v poměru 8:4. Kanály CyaA byly propustné pro vápenaté ionty.

5 Diskuze

Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* je toxin se dvěma odlišnými aktivitami. První aktivitou je tvorba kation-selektivních pórů (Benz et al. 1994). Druhou aktivitou je enzymatická, kdy po translokaci AC domény toxinu a její aktivaci buněčným kalmodulinem katalyzuje přeměnu cytozolického ATP na cAMP. Kanálotvorná aktivita CyaA a translokace AC domény jsou dva, na sobě nezávislé, děje, které je možné od sebe oddělit (Basler et al. 2007; Osicková et al. 1999; Sakamoto et al. 1992). CyaA se po sekreci váže na receptor CD11b/CD18, pro správně orientovanou inzerci CyaA do fosfolipidové dvojvrstvy je potřeba kladný membránový potenciál (Knapp et al. 2008). Po inzerci CyaA do plazmatické membrány zanořuje toxin svou AC doménu do membrány a dochází k přesunu komplexu receptor-toxin do lipidového raftu (Bumba et al. 2010). Při translokaci katalytické AC domény dochází ke vstupu vápenatých iontů do cytoplazmy hostitelské buňky (Fiser et al. 2007). Ve své diplomové práci jsem se věnovala první zmiňované aktivitě adenylátcyklázového toxinu, kanálotvorné aktivitě.

5.1 Vliv cholesterolu na kanálotvornou aktivitu CyaA

Pokusy s cholesterolovými membránami naznačují, že cholesterol s největší pravděpodobností má vliv na chování CyaA v černých lipidových membránách. V membránách s 30% obsahem cholesterolu se objevovaly dvě populace kanálů, velké s průměrnou vodivostí 321 ± 19 pS, a malé s průměrnou vodivostí 57 ± 13 pS. Oba pokusy probíhaly při konstantní hodnotě elektrického napětí 54 mV.

Velká směrodatná odchylka u malých kanálů naznačuje, že malé kanály jsou poměrně heterogenní skupinou. Hodnoty vodivostí malých kanálů se pohybují v rozmezí 29 pS až 82 pS. Toto široké rozpětí může být způsobeno tím, že nevíme, kam přesně se CyaA v cholesterolové membráně váže. Je možné, že se CyaA váže do oblasti s cholesterolem, nebo na jeho rozhraní s fosfolipidovou dvojvrstvou, a nebo se váže zcela mimo oblast, kde je cholesterol. Pro zjištění, kam přesně se CyaA v cholesterolové membráně váže, by bylo zajímavé podívat se na membránu fluorescenčním mikroskopem. Oblasti bohaté na cholesterol a CyaA by bylo třeba fluorescenčně označit a pak by bylo možné pozorovat, kam se CyaA v membráně váže. V minulosti již byly prováděny pokusy, které se zabývaly lipidovými rafty a jejich vizualizací v membránách složených

z cholesterolu a různých fosfolipidů. Pokusy byly prováděny na planárních fosfolipidových monovrstvách i dvojrvtvách a na GUV (great unilamellar vesicles, lipidové váčky vytvářeny z umělých membrán). Pro vizualizaci byly použity fluorescenčně značené analogy lipidů (Dietrich et al. 2001). Stejně tak byly již prováděny pokusy zabývající se vlivem koncentrace cholesterolu na umělé membrány (Cacas et al. 2012; Zhao et al. 2007).

5.2 Iontová selektivita kanálů CyaA v cholesterolové membráně

Iontovou selektivitu se podařilo v cholesterolové membráně stanovit jen u pozorovaných malých kanálů. Není jasné, jak se cholesterol v membráně za vysoké (1 M) koncentrace KCl chová. Je možné, že se cholesterol chová jinak za nízké koncentrace KCl a jinak za vysoké. Pokusy za nízké koncentrace KCl na obou stranách membrány jsem nedělala a do budoucna by bylo jistě zajímavé tyto pokusy doplnit a porovnat se současnými výsledky mého měření.

Iontovou selektivitu by bylo možné stanovit i jiným postupem, než jak jsme se pokoušeli my. Tento postup se používal zejména v minulosti (Benz et al. 1989). Autoři stanovovali iontovou selektivitu následovně. Měnila se velikost jednoho iontu soli, která tvoří elektrolyt a sledovalo se, co se bude dít s vodivostí. Byly použity chloridy s různými kationty. Pro různé kationty byly nalezeny různé vodivosti jednotlivých kanálů. Je-li kanál selektivní pro kationty, tak v případě, že kationt soli zůstává stejný a mění se anionty, je naměřena stejná vodivost kanálů. Tento postup je v porovnání s naším, kdy měříme reverzní napětí, pracnější.

5.3 Vliv elektrického napětí na aktivitu CyaA

Z našich pozorování vyplývá, že hodnota elektrického napětí nemá vliv na to, za jakou dobu se molekula CyaA zabuduje do membrány nebo jak dlouho je kanál při konkrétní hodnotě elektrického napětí otevřený. Výsledek měření je trochu překvapující, protože autoři (Knapp et al. 2008) při svých pokusech pozorovali sníženou kanálotvornou aktivitu při negativním elektrickém napětí na membráně a nižší dobu, kdy je kanál otevřen oproti kladnému potenciálu. Očekávali jsme při našich měřeních stejný trend. Vyšší aktivita při kladném membránovém potenciálu se může projevit buď delší

dobou, kdy je kanál otevřený nebo tím, že se do membrány zabudovává více kanálů. Ani jedno jsme však v závislosti na hodnotě elektrického napětí nepozorovali.

Možným vysvětlením je malý počet měření nebo fakt, že nemáme zcela kontrolu nad plochou membrány. Směs, kterou je otvor v přepážce kyvety ošetřen před nanesením membrány, někdy viditelně zmenšovala jeho průměr. Vždy jsem se snažila tento defekt před začátkem měření odstranit, ale je zřejmé, že plocha membrány neměla vždy stejnou velikost. Plochu membrány lze sledovat pomocí elektrické kapacity, ze které je možno spočítat plochu membrány. Pak by bylo možné korelovat dobu otevření kanálu s plochou membrány, do které se toxin může zabudovávat. Pokud je plocha membrány malá, mají toxiny menší prostor, kam se mohou zabudovat a také je menší pravděpodobnost, že se do kontaktu s membránou dostanou.

5.4 Velikost kanálů CyaA

K určení velikosti kanálů CyaA jsme používali glycerol. Předpokládali jsme snížení vodivosti kanálů CyaA pokud by glycerol procházel. V 50% glycerolu nebyl oproti pokusu s čistým KCl patrný žádný rozdíl ve vodivosti kanálů. V 10% glycerolu byla průměrná vodivost kanálů o něco menší než u čistého KCl, ale vzhledem ke směrodatným odchylkám obou souborů naměřených hodnot nelze říci, zda v 10% glycerolu došlo ke snížení vodivosti kanálů CyaA.

Na začátku experimentů bylo v plánu použít kromě glycerolu ještě sérii polyetylenglykolů různé molekulové hmotnosti. Vzhledem k tomu, že glycerol na vodivost kanálů CyaA neměl vliv, bylo od dalších pokusů s těmito neelektrolyty upuštěno.

V minulosti byly provedeny osmoprotekční pokusy na červených krvinkách. Pokud byly k ovčím erytrocytům přidány spolu s CyaA malé cukry jako arabinóza, sacharóza a manitol, byly erytrocyty ochráněny před osmotickou lyzí, kterou by jinak toxin způsobil (Ehrmann et al. 1991). Tyto cukry by proto mohly být také použity pro měření na černých lipidových membránách, za účelem zjištění, zda budou procházet kanálem CyaA či nikoli. Já jsem s nimi z časových důvodů ve své práci nepracovala.

5.5 Propustnost kanálů CyaA pro vápenaté ionty

CyaA potřebuje pro svou hemolytickou aktivitu i pro translokaci AC domény do cytozolu ionty vápníku (Bellalou et al. 1990; Hanski and Farfel 1985). V nedávné době bylo dokázáno, že při translokaci AC domény přes cytoplazmatickou membránu dochází ke vstupu vápenatých iontů do buňky (Fiser et al. 2007). Nás zajímalo, zda kanály tvořené CyaA v umělých lipidových membránách budou propustné pro vápenaté ionty. Dříve než byl prokázán vstup iontů vápníku do cytozolu hostitelské buňky při translokaci AC domény, bylo předpokládáno, že za vstup iontů vápníků jsou zodpovědné kation-selektivní kanály CyaA. Tato domněnka pramenila ze skutečnosti, že jiný RTX toxin, HlyA bakterie *Escherichia coli*, propouští vápenaté ionty do cytozolu cílové buňky tvorbou kanálů v plazmatické membráně hostitelské buňky (Valeva et al. 2005).

Výsledkem našich měření je zjištění, že kanály CyaA tvořené v umělé lipidové dvojvrstvě jsou propustné pro vápník. Pozorované kanály CyaA byly dvakrát propustnější pro vápenaté ionty než pro draselné. Tento výsledek je v souladu s autory (Szabo and Gray 1994), kteří již v minulosti pozorovali, že kanály CyaA jsou propustnější pro dvojmocné kationty oproti jednomocným. Výsledek našich měření by znamenal, že ionty vápníku mohou vstupovat do cytozolu hostitelské buňky oběma způsoby, při translokaci AC domény i v důsledku tvorby pórů v membráně. Není ale jisté, kolik vápenatých iontů prochází kanálem CyaA přes cytoplazmatickou membránu ve skutečnosti. V extracelulárním prostředí je koncentrace iontů vápníku menší (1,8 mM) než koncentrace draselných iontů (4 mM), pravděpodobnost průchodu iontů vápníku je tedy menší.

Vápenaté ionty, stejně jako jakékoli jiné ionty, mají vliv na iontovou selektivitu kanálů CyaA. Iontová selektivita kanálů CyaA v našich pokusech bez přidání vápníku byla $S_{k/a} = 4,6$. Kanály byly kation-selektivní. V pokusech s přidáním vápníku k toxinu, za stejných podmínek měření jako bez vápníku, byla iontová selektivita kanálů CyaA $S_{k/a} = 2,8$. Selektivita kanálů CyaA byla snížena. Je možné, že vápenaté ionty reagují s membránou poblíž ústí kanálu CyaA a tím kanál blokují pro průchod ostatních kationtů.

6 Souhrn

Ve své diplomové práci jsem se věnovala adenylát-cyklázovému toxinu bakterie *Bordetella pertussis* a jeho interakci s černými lipidovými membránami. Pro tyto účely jsem používala aparaturu určenou pro měření na černých lipidových membránách.

Prvním cílem této práce bylo zjistit, zda a případně jak ovlivňuje cholesterol aktivitu a iontovou selektivitu kanálů CyaA. Při použití asolektinových membrán obohacených cholesterolem bylo možné pozorovat zvýšený výskyt velkých kanálů CyaA s vodivostí 321 ± 19 pS. Vodivost pozorovaných malých kanálů byla 57 ± 13 pS. U kanálů s větší vodivostí se nepodařilo stanovit iontovou selektivitu. Je možné, že cholesterol je ovlivněn vysokou koncentrací elektrolytu KCl. Iontová selektivita kanálů s nižší vodivostí byla oproti pokusům s membránami bez přidání cholesterolu snížena.

Druhým cílem bylo zjistit, zda má velikost elektrického napětí vliv na aktivitu CyaA kanálů. Z výsledků mých měření vyplývá, že velikost elektrického napětí na dobu, za kterou se molekula CyaA zabuduje do membrány nebo jak dlouho je kanál CyaA otevřený, nemá vliv.

Třetím cílem bylo zjistit, jak velké jsou kanály tvořené CyaA. Tento cíl se nepodařilo splnit, protože glycerol kanály CyaA neprocházel a jiné molekuly, které by mohly vést k určení velikosti kanálů CyaA nebyly použity.

Čtvrtým cílem bylo zjistit, zda vápenaté ionty prochází kanálem CyaA, což se podařilo prokázat. Vápenaté ionty kanálem CyaA prochází. Poměr propustnosti kanálů CyaA pro vápenaté a draselné ionty vykazuje vyšší preferenci kanálu pro vápenaté ionty oproti draselným.

7 Seznam literatury

- Barry, E M et al. 1991. "Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation." *Journal of bacteriology* 173(2):720–6. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207064&tool=pmc&rendertype=abstract>).
- Basler, Marek et al. 2007. "Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of Bordetella adenylate cyclase toxin." *The Journal of biological chemistry* 282(17):12419–29. Retrieved January 13, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17347146>).
- Bellalou, J, H Sakamoto, D Ladant, C Geoffroy, and a Ullmann. 1990. "Deletions affecting hemolytic and toxin activities of Bordetella pertussis adenylate cyclase." *Infection and immunity* 58(10):3242–7. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=313645&tool=pmc&rendertype=abstract>).
- Benz, Maier, Daniel Ladant, Agnes Ullmann, and Peter Sebo. 1994. "Adenylate Cyclase Toxin (CyaA) of Bordetella pertussis. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of Escherichia coli." *The Journal of biological chemistry* 269(44):27231–27239.
- Benz, Schmid, W Wagner, and W Goebel. 1989. "Pore formation by the Escherichia coli hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates." *Infection and immunity* 57(3):887–95. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=313194&tool=pmc&rendertype=abstract>).
- Berridge, Michael J, Martin D Bootman, and H Llewelyn Roderick. 2003. "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(7):517–29. Retrieved January 30, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838335>).
- Boehm, D F, R a Welch, and I S Snyder. 1990. "Domains of Escherichia coli hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes." *Infection and immunity* 58(6):1959–64. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258750&tool=pmc&rendertype=abstract>).
- Branch, Michael, and Stephen Wright. 2007. "The Nernst/Goldman equation simulator." Retrieved (<http://www.nernstgoldman.physiology.arizona.edu/>).
- Bumba, Ladislav, Jiri Masin, Radovan Fiser, and Peter Sebo. 2010. "Bordetella Adenylate Cyclase Toxin Mobilizes Its b 2 Integrin Receptor into Lipid Rafts to Accomplish Translocation across Target Cell Membrane in Two Steps." *PLoS pathogens* 6(5):e1000901. Retrieved December 5, 2012

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2869314&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Cacas, Jean-Luc et al. 2012. "Lipids of plant membrane rafts." *Progress in lipid research* 51(3):272–99. Retrieved March 4, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554527>).

Confer, D L, and J W Eaton. 1982. "Phagocyte impotence caused by an invasive bacterial adenylate cyclase." *Science (New York, N.Y.)* 217(4563):948–50. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6287574>).

Dietrich, C et al. 2001. "Lipid rafts reconstituted in model membranes." *Biophysical journal* 80(3):1417–28. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1301333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).

Ehrmann, Valci, S Lloyd, and Itfid Erik L. 1991. "Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*." *FEBS letters* 278(1):79–83.

El-Azami-El-Idrissi, Mohammed et al. 2003. "Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: Role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain." *The Journal of biological chemistry* 278(40):38514–21. Retrieved January 13, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12885782>).

Fabiánová, Kateřina, Jana Zavadilová, Čestmír Beneš, and Bohumír Kříž. 2011. "Pertuse a parapertuse v České republice v roce 2011 Pertussis and parapertussis in the Czech Republic in 2011." 2010:2009–2013. Retrieved (http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Clanek_CEM.pdf).

Fiser, Radovan et al. 2007. "Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b+ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities." *The Journal of biological chemistry* 282(5):2808–20. Retrieved December 10, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148436>).

Fišer, Radovan. 2003. "Adenylátcyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis* a jeho interakce s biologickou membránou."

Gangola, P, and B P Rosen. 1987. "Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*." *The Journal of biological chemistry* 262(26):12570–4. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2442165>).

Gentile, F, a Raptis, L G Knipling, and J Wolff. 1988. "*Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Penetration into host cells." *European journal of biochemistry / FEBS* 175(3):447–53. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900763>).

Glaser, P et al. 1989. "Identification of residues essential for catalysis and binding of calmodulin in *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by site-directed mutagenesis." *The EMBO journal* 8(3):967–72. Retrieved

(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=400898&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).

Glaser, Philippe, Antoine Danchin, Daniel Ladant, Octavian Barzu, and Agnes Ullmann. 1988. "Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein." *The Tokai journal of ...* 13:239-252. Retrieved February 7, 2013 (<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/2908526>).

Glaser, Philippe, Hiroshi Sakamoto, Jacques Belialou, Agnes Ullmann, and Antoine Danchin. 1988. "Secretion of cyclolysin ,the calmodulin-sensitive adenylate cyclase - haemolysin bifunctional protein of Bordetella pertussis." 7(12):3997-4004.

Goodwin, M S, and a a Weiss. 1990. "Adenylate cyclase toxin is critical for colonization and pertussis toxin is critical for lethal infection by Bordetella pertussis in infant mice." *Infection and immunity* 58(10):3445-7. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=313675&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).

Gordon, Valery M et al. 1989. "Adenylate Cyclase Toxins from Bacillus anthracis and Bordetella pertussis." 264(25):14792-14796.

Gray, Szabo, Otero, Gray, and Hewlett. 1998. "Distinct mechanisms for K⁺ efflux, intoxication, and hemolysis by Bordetella pertussis AC toxin." *The Journal of biological chemistry* 273(29):18260-7. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660789>).

Guermontprez, P et al. 2001. "The adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis binds to target cells via the alpha(M)beta(2) integrin (CD11b/CD18)." *The Journal of experimental medicine* 193(9):1035-44. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193436&tool=pm-centrez&rendertype=abstract>).

Guermontprez, P, D Ladant, G Karimova, a Ullmann, and C Leclerc. 1999. "Direct delivery of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 162(4):1910-6. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9973458>).

Guo et al. 2005. "Structural basis for the interaction of Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin with calmodulin." 1-12.

Hackett, M, L Guo, J Shabanowitz, D F Hunt, and E L Hewlett. 1994. "Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from Bordetella pertussis." *Science (New York, N.Y.)* 266(5184):433-5. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7939682>).

Hanski, Emanuel Bordetella pertussis Invasive Adenylate Cyclase, and Zvi Farfel. 1985. "Bordetella pertussis Invasive Adenylate Cyclase. Partial resolution and properties of its cellular penetration." *The Journal of biological chemistry* 290(9):5526-5532.

- Havlík, Jiří. 2008. "Je černý kašel stále závažné onemocnění?" *Medical Tribune* 12/C2. Retrieved (<http://www.tribune.cz/clanek/11905-je-cerny-kasel-stale-zavazne-onemocneni>).
- Hewlett et al. 1991. "Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*. Conformational change associated with toxin activity." 17503–17508.
- Hille, B. 1971. "The permeability of the sodium channel to organic cations in myelinated nerve." *The Journal of general physiology* 58(6):599–619. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2226049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hille, B. 1972. "The permeability of the sodium channel to metal cations in myelinated nerve." *The Journal of general physiology* 59(6):637–58. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2203202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Hui, D, C Morden, F Zhang, and V Ling. 2000. "Combinatorial analysis of the structural requirements of the *Escherichia coli* hemolysin signal sequence." *The Journal of biological chemistry* 275(4):2713–20. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10644734>).
- Jr, Everett C Short, and Harold J Kurtz. 1971. "Properties of the Hemolytic Activities of *Escherichia coli* Properties of the Hemolytic Activities of *Escherichia coli*." 3(5).
- Karimova, G et al. 1998. "Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: Implication for the in vivo delivery of CD8+ T cell epitopes into antigen-presenting cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(21):12532–7. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22865&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Knapp, Oliver et al. 2003. "Channel formation in model membranes by the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: effect of calcium." *Biochemistry* 42(26):8077–84. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834359>).
- Knapp, Oliver, Elke Maier, Jirí Masín, Peter Sebo, and Roland Benz. 2008. "Pore formation by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin in lipid bilayer membranes: role of voltage and pH." *Biochimica et biophysica acta* 1778(1):260–9. Retrieved March 17, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976530>).
- Lally, E T, R B Hill, I R Kieba, and J Korostoff. 1999. "The interaction between RTX toxins and target cells." *Trends in microbiology* 7(9):356–61. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10470043>).
- Lodish, Harvey, Arnold Berk, and Chris A. Kaiser. 2008. *Molecular Cell Biology*. 6th ed. New York: Freeman.
- Ludwig, a et al. 1996. "Analysis of the in vivo activation of hemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*." *Journal of bacteriology* 178(18):5422–30. Retrieved

- (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=178361&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Masin, Jiri et al. 2005. "Acylation of Lysine 860 Allows Tight Binding and Cytotoxicity of Bordetella." 12759–12766.
- Mattoo, Seema, and James D Cherry. 2005. "Molecular Pathogenesis , Epidemiology , and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to Bordetella pertussis and Other Bordetella Subspecies." 18(2):326–382.
- Menestrina, G, and M Ropele. 1989. "Voltage-dependent gating properties of the channel formed by E. coli hemolysin in planar lipid membranes." *Bioscience reports* 9(4):465–73. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2686776>).
- Milescu, L.S., C. Nicolai, and J. Bannen. 2013. "QuB Software." Retrieved (<http://www.qub.buffalo.edu/>).
- Moayeri, M, and R a Welch. 1997. "Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated Escherichia coli hemolysin." *Infection and immunity* 65(6):2233–9. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175308&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>).
- Mobberley-schuman, Paula S, and Alison A Weiss. 2005. "Influence of CR3 (CD11b / CD18) Expression on Phagocytosis of Bordetella pertussis by Human Neutrophils." 73(11):7317–7323.
- MUELLER, P, DO RUDIN, HT Tien, and WC WESCOTT. 1962. "Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro." *Circulation* 26:1167–1171. Retrieved March 5, 2013 (<http://circ.ahajournals.org/content/26/5/1167.short>).
- Munier, Heline et al. 1991. "Isolation and characterization of catalytic and calmodulin-binding domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase." *Eur. J. Biochem.* 474:469–474.
- Nicaud, J M, N Mackman, L Gray, and I B Holland. 1985. "Characterisation of HlyC and mechanism of activation and secretion of haemolysin from E. coli 2001." *FEBS letters* 187(2):339–44. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3894051>).
- Osicková, a, R Osicka, E Maier, R Benz, and P Sebo. 1999. "An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 and 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin and modulates formation and cation selectivity of its membrane channels." *The Journal of biological chemistry* 274(53):37644–50. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608820>).
- Otero, Angela S., Xiao B. Yi, Mary C. Gray, Gabor Szabo, and L. Hewlett Erik. 1995. "Membrane Depolarization Prevents Cell Invasion by Bordetella pertussis Adenylate Cyclase Toxin." 9695–9697.

- Parekh, Anant B, and James W Putney. 2005. "Store-operated calcium channels." *Physiological reviews* 85(2):757–810. Retrieved November 26, 2012 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15788710>).
- Pospíšilová, Eva. 2010. "Adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*: mechanismus úniku draselných iontů z makrofágů."
- Rogel, Arie, and Ruth Meller. 1991. "Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis*. The relationship between induction of cAMP and hemolysis." 3154–3161.
- Rose, Thierry, Peter Sebo, Jacques Bellalou, and Daniel Ladant. 1995. "Interaction of Calcium with *Bordetella pertussis* Adenylate." 270(44):26370–26376.
- Sakamoto, Jacques Bellalou, Peter Sebo, and Daniel Ladant. 1992. "STRUCTURAL AND FUNCTIONAL INDEPENDENCE OF T H E CATALYTIC AND HEMOLYTIC." 348:13598–13602.
- Sergent, Odile et al. 2012. "Up-to-Date Insight About Membrane Remodeling as a Mechanism of Action for Ethanol-Induced Liver Toxicity." *Trends in Alcoholic Liver Disease Research - Clinical and Scientific Aspects*.
- Simons, K, and E Ikonen. 1997. "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387(6633):569–72. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177342>).
- Simons, K, and D Toomre. 2000. "Lipid rafts and signal transduction." *Nature reviews. Molecular cell biology* 1(1):31–9. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413487>).
- Simsova, Marcela, Peter Sebo, and Claude Leclerc. 2004. "The adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*--a novel promising vehicle for antigen delivery to dendritic cells." *International journal of medical microbiology: IJMM* 293(7-8):571–6. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15149033>).
- Sobko, Alexander a, Elena a Kotova, Yuri N Antonenko, Stanislav D Zakharov, and William a Cramer. 2006. "Lipid dependence of the channel properties of a colicin E1-lipid toroidal pore." *The Journal of biological chemistry* 281(20):14408–16. Retrieved March 11, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16556601>).
- Szabo, and Gray. 1994. "Adenylate Cyclase Toxin from *Bordetella pertussis* Produces Ion Conductance across Artificial Lipid Bilayers in a Calcium- and Polarity-dependent Manner." 269(36):22496–22499.
- TranVan Nhieu, Guy, Caroline Clair, Gianfranco Grompone, and Philippe Sansonetti. 2004. "Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens." *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96(1):93–101. Retrieved January 13, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093131>).

- Tweten, RK. 2005. "Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins." *Infection and immunity* 73(10). Retrieved April 1, 2013 (<http://iai.asm.org/content/73/10/6199.short>).
- Valeva, Angela et al. 2005. "Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent." *The Journal of biological chemistry* 280(44):36657-63. Retrieved January 13, 2013 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131494>).
- Vojtova-Vodolanova, Jana et al. 2009. "Oligomerization is involved in pore formation by Bordetella adenylate cyclase toxin." *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(9):2831-43. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19417082>).
- Weingart, C L, and a a Weiss. 2000. "Bordetella pertussis virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils." *Infection and immunity* 68(3):1735-9. Retrieved (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Wolff, J., G. Hope Cook, Alan R. Goldhammer, and S. A. Berkowitz. 1980. "Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase." 77(7):3841-3844.
- Zhao, Jiang et al. 2007. "Phase studies of model biomembranes: complex behavior of DSPC/DOPC/cholesterol." *Biochimica et biophysica acta* 1768(11):2764-76. Retrieved March 15, 2013 (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2701629&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).