

## **Abstrakt (česky)**

Tato práce shrnuje pět publikací, které se zabývají převážně adenylátcyklázovým toxinem (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis* a jeho interakcí s biologickou membránou. CyaA narušuje buněčné membrány tvorbou malých kationt-selektivních kanálů a rozvrací buněčnou signalizaci pomocí enzymu (AC, adenylátcyklázy) přeměňujícího buněčné ATP na cAMP.

První studie objasňuje mechanismus narušování membrány v případě CyaA a příbuzného RTX toxinu,  $\alpha$ -hemolyzinu (HlyA) produkovaného *Escherichia coli*. K tomuto účelu byly použity lipozómy jako umělý membránový systém a fluorescenční zhášecí metoda. Oba zkoumané toxiny vykazovaly postupný únik materiálu z lipozómů a rozdílné iontové selektivity (Fišer a Konopásek 2009).

Jak doprava AC domény, tak tvorba kanálů jsou závislé na vlastnostech predikovaného transmembránového  $\alpha$ -helixu (502-522). V naší práci jsme zkoumali další predikovaný transmembránový segment (565-591), který nese kyselé zbytky Glu(570) a Glu(581). Většina pokusů byla prováděna na erythrocytech a planárních lipidových membránách. Zjistili jsme, že záporný náboj v pozici 570 je zásadní pro iontovou selektivitu kanálu a je patrně umístěn v blízkosti jeho ústí. Substituce v obou pozicích zásadně ovlivňují schopnost translokace AC domény (Basler et al. 2007).

Během bakteriální infekce se toxin CyaA primárně váže na fagocytyující buňky nesoucí na povrchu  $\alpha_M\beta_2$  integrin (CD11b/CD18). V další studii jsme popsali a zkoumali novou aktivitu CyaA která spočívá ve zvyšování intracelulární koncentrace vápenatých iontů ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Toxinem indukovaný nárůst  $[Ca^{2+}]_i$  v monocytech J774A.1 nesoucích CD11b nebyl inhibovatelný specifickými inhibitory buněčných kanálů, ale pouze ionty  $La^{3+}$ . To naznačuje, že vstup  $Ca^{2+}$  do buněk není způsobený buněčnou signalizací. Zdá se, že samotná translokace AC domény vede k přechodnému vpouštění  $Ca^{2+}$  do buněk (Fišer et al. 2007).

Samotná translokace se patrně odehrává ve dvou krocích; začíná inzercí AC domény do membrány, kdy dochází k přesunu iontů  $Ca^{2+}$ . Tím je spouštěno kalpainem zprostředkované štěpení talinu, který ukotvuje integrin k cytoskeletu. Následkem je přesun uvolněného komplexu integrin-CyaA do lipidových raftů, kde prostředí bohaté na cholesterol umožní dokončení translokace AC domény (Bumba et al. 2010).

Schopnost CyaA indukovat vstup  $Ca^{2+}$  do cytoplazmy buněk určuje i posloupnost dalších dějů, které vedou k aktivnímu uklízení CyaA z povrchu makrofágů. Toxoidy schopné vpouštění  $Ca^{2+}$  do buněk a přesunu do raftů jsou endocytovány pomocí clathrinových váčků a procházejí časnými endozómy obsahujícími marker transferrin. Tento způsob dopravy umožňuje následné štěpení toxoidu a prezentaci vzniklých peptidů na molekulách MHC I a II. Naopak mutantní toxoidy neschopné vpouštění  $Ca^{2+}$  jsou velmi rychle z membrány uklíženy makropinocytózou nezávislou na clathrinu (Fišer et al. 2011).

## **Klíčová slova**

*Bordetella*, CyaA, translokace proteinu, membránový kanál, planární lipidové membrány, vápníková signalizace, endocytóza, narušování lipozómů, makrofág, Fura-2