

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
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Anna Soldánová

Příprava a krystalizace metabolického represoru LutR z bakterie *Bacillus subtilis*
Preparation and crystallization of a metabolic repressor LutR from *Bacillus subtilis*

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Pavlína Maloy Řezáčová, Ph.D.

Praha 2022

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, 3. 1. 2022

Podpis:

Anna Soldánová

Tato práce byla vypracována v Laboratoři strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. Financována byla Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (program „NPU I“), číslo projektu LO1304.

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Pavlíně Maloy Řezáčové, Ph.D. za její nesmírně trpělivé a vlídné vedení, pevnou ruku při lovení důležitých krystalů, analýzu difrakčních dat a cenné rady a připomínky k experimentům i během psaní. Dále bych chtěla poděkovat především Ing. Ireně Sieglkové za neocenitelnou pomoc při práci v laboratoři a jazykovou korekturu práce, RNDr. Janě Škerlové, Ph.D. a RNDr. Veronice Krejčířikové, Ph.D. za podporu, rady a sdílení zkušeností z oblasti přípravy a krystalizace represorů.

RNDr. Milanu Fábrymu, CSc. děkuji za přípravu expresních plazmidů, Mgr. Pavlu Srbovi, Ph.D. za velkou pomoc s prováděním NMR experimentů a společně s Ing. Václavem Veverkou, Ph.D. za školení v jejich vyhodnocování, doc. RNDr. Jiřímu Bryndovi, CSc. a Ing. Petru Pachlovi, Ph.D. za pomoc v oblasti krystalografie a za provedení difrakčních měření a Mgr. Monice Nedomové, Ph.D. za rychlé zasvěcení do tajů programu SnapGene. Celému pracovišti Strukturní biologie na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i. pak děkuji za vytvoření příjemného a inspirativního pracovního prostředí. Dále také děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za konzultace a její ochotu pomoci nejen v průběhu sepisování této práce.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu při psaní této práce i během celého předchozího studia, a to zejména babičce Jarmile Soldánové a mamince PhDr. Světlaně Soldánové. A na závěr můj velký dík patří především také mému příteli Ing. Jiřímu Doušovi, bez jehož trpělivosti a skálopevné opory bych poslední kilometry tohoto maratonu jen stěží zvládla.

Abstrakt

Metabolické transkripční represory jsou proteiny, které regulují transkripci různých genů bakteriálního metabolismu. Typicky obsahují dvě domény: N-koncovou doménu vázající DNA (DBD, z angl. DNA-binding domain) a C-koncovou doménu vázající molekulu efektoru. Po vazbě efektoru (nejčastěji molekuly metabolitu) protein změní svou konformaci, čímž dojde ke změně jeho afinity k DNA operátoru a následné modulaci transkripce genů kódujících proteiny dané metabolické dráhy.

LutR patří do rodiny bakteriálních transkripčních regulátorů GntR. V divokém kmeni *Bacillus subtilis* RO-NN-1 je LutR zodpovědný za represi transkripce genů potřebných pro využití laktátu, zatímco funkce LutR z laboratorních kmenů *B. subtilis* PY79 a 168 se liší. Díky mutaci je produkován protein o prvních 21 aminokyselin kratší, což výrazně ovlivňuje jeho vazebnou specifitu při rozpoznávání sekvence DNA. Tato varianta LutR pak funguje jako globální regulátor a reguluje velký počet genů, jejichž transkripce je spjata s přechodem z fáze exponenciálního růstu bakteriální populace do fáze stacionární.

Znalost 3D struktury komplexu LutR s DNA by pomohla objasnit přesný mechanismus, jakým delece v DBD LutR mění její vazebnou specifitu. V rámci této práce byla heterologní exprese v *Escherichia coli* připravena DBD LutR z divokých kmenů *B. subtilis* v dostatečném množství a čistotě pro krystalizaci. Metodou difúze par se podařilo získat krystaly komplexu DBD LutR s DNA pro rentgenostrukturní analýzu difraktující do rozlišení 2,8 Å.

Klíčová slova: regulace transkripce, transkripční represory, RTG studie, krystalizace, difrakční analýza.

Abstract

Metabolic transcriptional repressors are proteins controlling transcription of specific genes involved in bacterial metabolism. These proteins typically consist of two domains: N-terminal DNA-binding domain (DBD) and C-terminal effector-binding domain. When an effector (usually a metabolite molecule) binds to the protein, the conformation of the protein is changed. This causes a change in affinity to its DNA operator and that subsequently modulates the transcription of genes of the specific metabolic pathway.

LutR belongs to the GntR family of bacterial transcriptional regulators. In undomesticated strain RO-NN-1 of *Bacillus subtilis*, LutR regulates transcription of genes required for L-lactate utilization. Interestingly, LutR from laboratory strains PY79 and 168 has a different function. Due to a mutation, it lacks the first 21 amino acids and this alters its DNA recognition specificity. This LutR variant acts as a global regulator and regulates many genes associated with transition from exponential growth to stationary phase of bacterial population.

Knowledge of 3D structure of LutR with DNA could elucidate the impact of this short deletion in LutR DBD on the mechanism of DNA recognition. In this work, the DBD of LutR from undomesticated strains of *B. subtilis* was prepared by heterologous expression in *Escherichia coli* in sufficient yields and purity for crystallization trials. Crystals of LutR DBD and DNA complex for X-ray structural analysis diffracting to resolution 2,8 Å were obtained by vapour diffusion crystallization technique.

Key words: regulation of transcription, transcriptional repressors, X-ray study, crystallization, diffraction analysis.

Obsah

1 ÚVOD	10
2 PŘEHLED LITERATURY	12
2.1 Regulace metabolismu u bakterií.....	12
2.2 Regulace na úrovni transkripce	13
2.3 Metabolické transkripční represory	16
2.4 Regulátor (represor) využití laktátu (LutR)	20
2.5 Metody a techniky strukturní biologie	28
3 CÍLE PRÁCE.....	32
4 MATERIÁL A METODY	33
4.1 Bakteriální kmeny	33
4.2 Plazmidy	33
4.3 DNA operátory.....	34
4.4 Příprava rekombinantního proteinu LutR₂₋₇₈	35
4.5 Biochemická charakterizace LutR₂₋₇₈ a testování vazby DNA	40
4.6 Strukturní charakterizace LutR₂₋₇₈ a jeho vazby DNA.....	42
5 VÝSLEDKY	45
5.1 Příprava LutR₂₋₇₈ heterologní expesí v <i>E. coli</i>.....	45
5.2 Návrh a příprava DNA duplexů.....	48
5.3 Analýza vazby LutR₂₋₇₈ a DNA	52
5.4 Krystalizace komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA metodou difúze par	60
6 DISKUZE	75
7 SOUHRN	80
8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	81

Seznam použitých zkratek

<i>Zkratka</i>	<i>Význam anglicky</i>	<i>Význam česky</i>
1D	One-dimensional	Jednorozměrný
2D	Two-dimensional	Dvojměrný
3D	Three-dimensional	Trojměrný, prostorový
AA	Acrylamide	Akrylamid
AraR	L-Arabinose (operon) repressor	Represor operonu pro využití L-arabiny
ATP	Adenosin 5'-triphosphate	Adenosin 5'-trifosfát
A_{xnm}	Absorbance at x nm	Absorbance při x nm
BESSY	Berlin Electron Storage Ring Society for Synchrotron Radiation	Synchrotronové zařízení v Berlíně
bicin	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycine	N,N-bis(2-hydroxyethyl)glycin
BIS	N,N'-methylene-bis-acrylamide	N,N'-metylen-bis-akrylamid
BL	Beamline	Označení paprsku synchrotronového záření
bp	Base pair	Pár bází
BSA	Bovine serum albumine	Hovězí sérový albumin
D ₂ O	Deuterium oxide	Deuterovaná (těžká) voda
DBD	DNA-binding domain	Doména vázající DNA
DeoR	Deoxyribose (operon) repressor	Represor operonu pro využití deoxyribosy
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
EBD	Effector-binding domain	Doména vázající molekulu efektoru
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EMSA	Electromobility shift assay	Gelová retardační analýza
ETG	Ethyl-β-D-1-thiogalaktopyranoside	Ethyl-β-D-1-thiogalaktopyranosid

FPLC	Fast protein liquid chromatography	Provedení proteinové kapalinové chromatografie za použití středního tlaku
GntR	D-Gluconate (operon) repressor	Represor operonu pro využití D-glukonátu
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence	2D NMR experiment detekující interakce jader sledovaných dvou izotopů přes jednu vazbu
HTH	Helix-turn-helix	Strukturní motiv šroubovice-otáčka-šroubovice
HZB	Helmholtz-Zentrum Berlin	Hemholtzovo Centrum v Berlíně (výzkumný ústav)
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranoside	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid
<i>lac</i> (operon)	D-Lactose metabolism operon	Operon pro využití D-laktosy
LacI	D-Lactose (operon) repressor	Represor operonu pro využití D-laktosy
<i>lacZ</i>	β -Galactosidase gene	Reportérový gen kódující β -galaktosidasu
LB (médium)	Luria-Bertani medium	Médium Luria-Bertani
<i>lut</i> geny	L-Lactate utilization genes	Geny pro využití L-laktátu
LutP	L-Lactate permease	L-Laktát permeasa
LutR	L-Lactate utilization repressor	Represor operonu pro využití L-laktátu
LutR ₁₋₂₄₀	-	Varianta LutR z divokých kmenů <i>B. subtilis</i>
LutR ₁₋₇₈	-	DBD LutR z divokých kmenů <i>B. subtilis</i>
LutR ₂₂₋₂₄₀	-	Kratší varianta LutR z laboratorních kmenů <i>B. subtilis</i>
LutR ₂₂₋₇₈	-	DBD kratší varianty LutR z laboratorních kmenů <i>B. subtilis</i>
LutR ₂₋₇₈	-	DBD LutR z divokých kmenů <i>B. subtilis</i> použitá v experimentální části této práce
MarR	Multiple antibiotic resistance regulators	Transkripční regulátory mnohonásobné rezistence vůči antibiotikům

MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MOPS	4-Morpholinopropanesulfonic acid	4-Morfolinopropansulfonová kyselina
MPD	2-Methyl-2,4-pentanediol	2-Methyl-2,4-pentandiol
mRNA	Messenger RNA	Mediátorová RNA
MW	Molecular weight	Molekulová hmotnost
NagR	N-acetyl-D-glucosamine (operon) repressor	Represor operonu pro využití N-acetyl-D-glukosaminu
NMR	Nuclear magnetic resonance	Nukleární magnetická rezonance
NTP	Nucleotid 5'-triphosphates	Nukleotid 5'-trifosfáty
O	Operator	Operátor
OA _x	-	DNA duplex inspirovaný krystalovou strukturou komplexu AraR dlouhý x bp
OD _{xnm}	Optical density at x nm	Optická denzita (hustota) při x nm
ON _x	-	DNA duplex inspirovaný krystalovou strukturou komplexu NagR dlouhý x bp
O _x	-	DNA duplex dlouhý x bp
PBS (pufr)	Phosphate buffered saline	Fyziologický roztok pufovaný fosfátem
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerasová řetězová reakce
PDB	Protein Data Bank	Databáze proteinových struktur
PEG	Polyethylenglycol	Polyethylenglykol
PEG MME	Polyethylenglycol monomethylether	Polyethylenglykol monomethylether
RNA	Ribonucleic acid	Ribonukleová kyselina
RNAP	RNA polymerase	RNA polymerasa
RTG	X-ray	Rentgenový
SDS	Sodium dodecyl sulfate	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

SEC	Size exclusion chromatography	Gelová permeační chromatografie
SinI	SinR antirepressor („inhibitor“)	Antirepresor proteinu SinR
SinR	Sporulation inhibition regulator	Hlavní transkripční regulátor tvorby biofilmu (regulátor inhibice sporulace)
SorC	D-Sorbitol (operon) repressor	Represor operonu pro využití D-sorbitolu
Spo0A	Stage 0 sporulation protein A	Transkripční regulátor počátku sporulace
TBE (pufr)	Tris-borate-EDTA buffer	Pufr ze směsi Tris, kyseliny borité a EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEV (proteasa)	Tobacco Etch virus protease	Proteasa z viru leptané mozaiky tabáku
TreR	D-Trehalose (operon) repressor	Represor operonu pro využití D-trehalosu
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trp</i> (operon)	L-Tryptophan biosynthesis operon	Operon pro biosyntézu L-tryptofanu
UV	Ultra violet	Ultrafialový
wHTH	Winged helix-turn-helix	Strukturní motiv „okřídlená“ šroubovice-otáčka-šroubovice
α -CTD	RNAP α -subunit C-terminal domain	C-koncová doména α -podjednotky RNAP
α -NTD	RNAP α -subunit N-terminal domain	N-koncová doména α -podjednotky RNAP

1 Úvod

Jedna z nejdůležitějších schopností živých organismů je schopnost vnímat změny ve vnějším i vnitřním prostředí a pohotově na ně reagovat. Stejně tak je tomu i u bakterií. V okolním prostředí bakterie dochází k neustálým výkyvům životních podmínek. Jedním z příkladů těchto měnících se podmínek je dostupnost živin. Bakterie se velmi dobře adaptovaly na časté střídání jejich dostatku a nedostatku a vyvinuly se u nich četné mechanismy zpracování různých alternativních zdrojů základních živin – dusíku a uhlíku.

Bacillus subtilis je Gram-pozitivní bakterie s nízkým počtem GC párů v genomu. V průběhu let se stala významným modelovým organismem pro studium řady procesů, například regulace tvorby biofilmu, sporulace a dalších (Hamon a Lazazzera, 2001; shrnuto v Mielich-Süss a Lopez, 2015). Primárním životním prostředím *B. subtilis* je půda. V půdě žije velké množství různých organismů, což z ní vytváří velmi konkurenční prostředí, kde často dochází k boji o životní prostor a dostatečný příjem živin. Strategie půdních organismů v boji o přežití se různí, od exkrece antimikrobiálních látek zajišťujících bezpečí proti konkurentům (shrnuté v Sumi *et al.*, 2014), přes produkci sloučenin zprostředkávajících imunitu a resistenci proti antibiotikům produkovaných jinými organismy (například Laskaris *et al.*, 2010), po kooperaci, diferenciaci a tvorbu mnohobuněčných společenstev například ve formě biofilmu (Aguilar *et al.*, 2007).

V moderním světě má *B. subtilis* široké využití, především v průmyslu k rekombinantní produkci enzymů, vitamínů a dalších látek (shrnuté v Schallmeyer *et al.*, 2004) či k fermentaci v potravinářství (například japonský sójový produkt natto; Kamada *et al.*, 2015; Kubo *et al.*, 2011). Fermentace je děj, při kterém dochází k rozkladu komplexnějších sloučenin (polysacharidů aj.) na jednodušší za vzniku energeticky nabitých sloučenin (ATP aj.), a slouží tedy mikroorganismům jako zdroj energie. Jedním z fermentačních procesů je i mléčné kvašení, kdy za anaerobních podmínek vzniká z jednoduchých cukrů glykolýzou kyselina mléčná neboli laktát. Laktát je zároveň sloučenina, kterou jsou mnohé druhy bakterií schopny využít jako alternativní zdroj uhlíku v době nedostatku živin.

V divokých kmenech *B. subtilis* jsou geny kódující enzymy potřebné pro využití L-laktátu (tzv. *lut* geny – z angl. „lactate utilization“) regulovány transkripčním regulátorem LutR (z angl. „lactate utilization repressor“, Chai *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2014). V laboratorních kmenech *B. subtilis* je však tento protein vytvářen o prvních 21 aminokyselin kratší a na rozdíl

od LutR z divokých kmenů *B. subtilis* funguje jako globální transkripční regulátor regulující expresi mnoha genů spojených především s přechodem z exponenciální do stacionární fáze (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014).

LutR patří do strukturní rodiny bakteriálních transkripčních faktorů GntR. Pro ty je typická struktura složená ze dvou podjednotek – domény vázající efektor (EBD, z angl. „effector-binding domain“) a domény vázající se na DNA (DBD, z angl. „DNA-binding domain“) – (Suvorova *et al.*, 2015; Rigali *et al.*, 2002; shrnuto v Jain, 2015). Znalost trojrozměrné (3D) struktury obou variant LutR v komplexu s DNA by pomohla objasnit mechanismus, jakým krátká delece v DBD LutR ovlivňuje vazebnou specifitu při rozpoznání sekvence operátorové DNA.

V teoretické části této práce jsou rozebrány metabolické pochody, jichž se LutR účastní, a jejich souvislost v průběhu životního cyklu *B. subtilis*. Praktická část této práce je zaměřena na přípravu DBD LutR z divokých kmenů *B. subtilis* a její biochemickou studii samostatně i ve vazbě s operátorovou DNA s cílem připravit krystaly tohoto protein-DNA komplexu pro rentgenostrukturní analýzu.

2 Přehled literatury

2.1 Regulace metabolismu u bakterií

Bakterie žijí v proměnlivém prostředí, na jehož změny musí neustále pohotově reagovat a adaptovat se. Jedním ze způsobů této adaptace je jejich schopnost využívat různé zdroje energie, uhlíku a dusíku. V každém okamžiku je pro bakterii důležité, aby optimálně využívala dostupné zdroje živin a dovedla s nimi ekonomicky hospodařit. K tomu jí slouží různé metabolické dráhy: jak katabolické, tedy ty, které se podílejí na rozkladu živin, tak anabolické, které naopak vedou k syntéze potřebných molekul. Jednotlivé metabolické procesy jsou zprostředkovány proteiny s funkcí enzymů. Jelikož se jedná o propojenou a poměrně složitou síť různých procesů, je potřeba ji účinně a efektivně regulovat (Goelzer *et al.*, 2008; shrnuto v Shimizu, 2013). Tato regulace probíhá na různých úrovních.

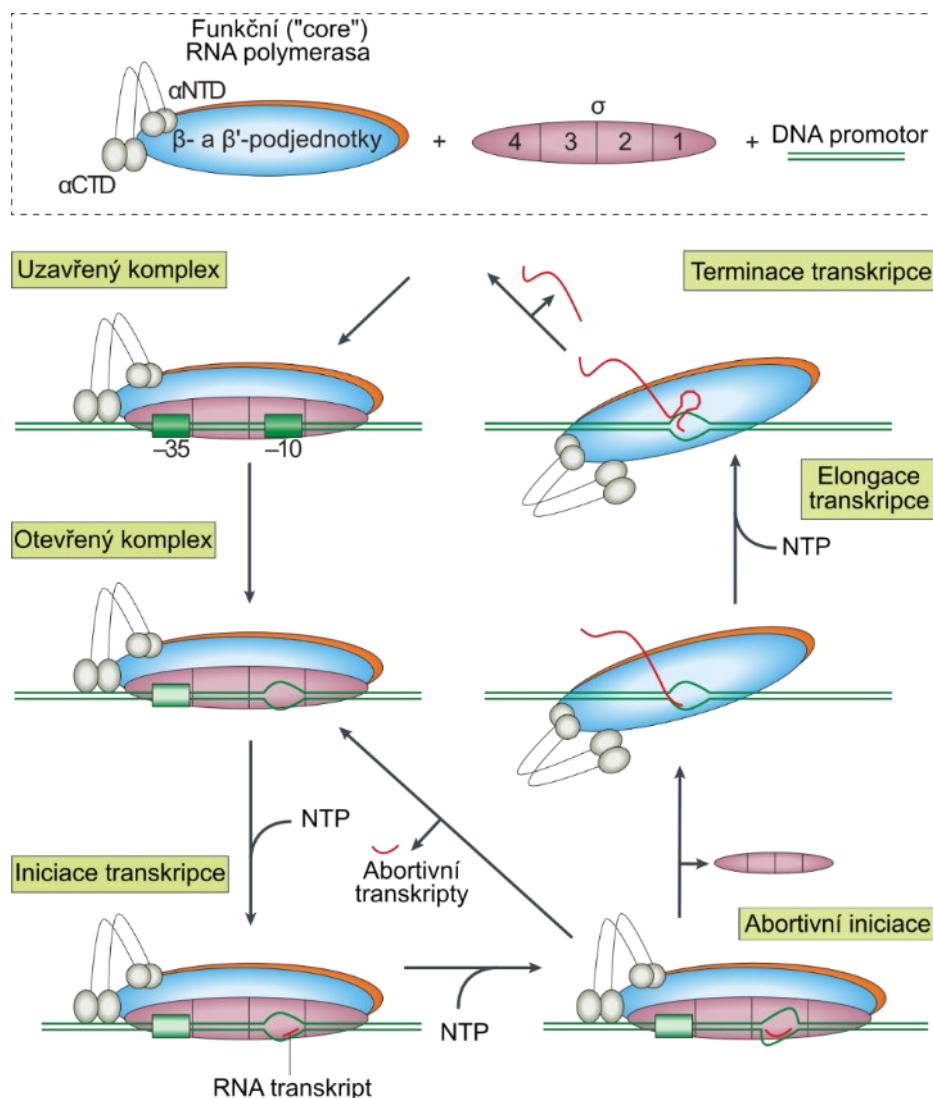
Obecně lze tuto regulaci rozdělit na a) rovinu produkce daného enzymu a b) rovinu modulace aktivity enzymu. Vznik enzymu může být regulován na úrovni transkripce (shrnuto v Browning a Busby, 2016; ve Washburn a Gottesman, 2015; a například ve Stülke a Hillen, 2000) či translace (shrnuto ve Winkler a Breaker, 2005; a v Jeong *et al.*, 2017). Aktivita enzymu bývá regulována např. posttranslačními modifikacemi, jako je fosforylace (Jers *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2014), nebo allostericky prostřednictvím změny konformace po navázání molekuly tzv. efektoru (Macol *et al.*, 2001; Shulman *et al.*, 2008; Comino *et al.*, 2017). Efektorem pak nejčastěji bývá molekula metabolitu, která svou vazbou zprostředkovává informaci o konkrétním stavu vnějšího nebo vnitřního prostředí (Goelzer *et al.*, 2008).

Jiný pohled na úrovně regulace pak je podle dosahu daného regulačního procesu. Z tohoto pohledu se dělí regulace na globální a lokální. Globální regulace ovlivňuje velké množství dílčích procesů a její účinek je tedy pleiotropní. Příkladem můžou být globální transkripční regulátory, které ovlivňují transkripci mnoha různých genů; u *B. subtilis* například Spo0A řídící počátek sporulace (Molle *et al.*, 2003) nebo SinR jako hlavní regulátor tvorby biofilmu (Kearns *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2006). Naproti tomu lokální regulace se zaměřuje na jeden konkrétní proces, například jeden konkrétní transkripční regulátor, jehož funkcí je regulovat transkripci jednoho konkrétního genu či skupiny genů uspořádaných do operonu. Příkladem u *B. subtilis* je transkripční represor GntR, čili represor dráhy pro degradaci D-glukonátu (Fujita a Fujita, 1987).

2.2 Regulace na úrovni transkripce

Regulace na úrovni transkripce je pro bakterie výhodná, protože šetří energii a zdroje živin. Transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu informace uložené v DNA do mRNA pomocí DNA-dependentní RNA polymerasy (RNAP) za účasti řady dalších pomocných proteinů. RNAP se skládá ze dvou podjednotek α a podjednotek β , β' a ω . Tyto podjednotky tvoří tzv. funkční „core“ RNAP, která je schopná prodlužování transkriptu, ale nedokáže se sama navázat na promotor a transkripci zahájit. Interakci RNAP s promotorem zprostředkovává tzv. σ -faktor, který společně s „core“ RNAP tvoří holoenzym RNAP (shrnutí v Browning a Busby, 2016).

Proces transkripce pak probíhá ve třech fázích: (1) iniciace, kdy dochází k nasednutí RNAP na promotor; (2) elongace, kdy probíhá přidávání jednotlivých nukleotidů do vznikajícího vlákna mRNA; a (3) terminace, při které dochází k ukončení transkripce, oddělení transkriptu a RNAP (Obrázek 1; shrnutí v Browning a Busby, 2016). Regulace procesu transkripce může probíhat ve kterékoliv z těchto fází (shrnutí ve Washburn a Gottesman, 2015; a v Browning a Busby, 2016). Klíčová je však u bakterií regulace iniciace transkripce (Goelzer *et al.*, 2008), která bude dále blíže rozebrána.



Obrázek 1: Zjednodušené schematické znázornění průběhu transkripce bakteriálních genů

Transkripci bakteriálních genů zprostředkovává DNA-dependentní RNAP, která se skládá ze dvou podjednotek α a podjednotek β , β' a ω . Vazbou tzv. σ -faktorů vzniká holoenzym RNAP, tedy takový, který je schopný zahájení transkripce ze specifické sekvence rozpoznávaného promotoru. Interakcí RNAP s DNA promotorem se tvoří tzv. uzavřený komplex. V místě počátku transkripce se rozdělí vlákna DNA, čímž dojde k přeměně na otevřený komplex. Přidáváním NTP vzniká iniciující komplex, který syntetizuje vlákno RNA. Někdy se stává, že je RNAP držena v místě promotoru (abortivní iniciace) a dochází k syntéze krátkých (tzv. abortivních) RNA transkriptů. Fáze elongace nastává, když RNAP opustí promotor, dojde k uvolnění σ -faktorů a vznikající mRNA je prodlužována přidáváním NTP. Když RNAP narazí na transkripční terminátor, RNA transkript a RNAP jsou uvolněny a tím je transkripce ukončena. RNAP pak znovu může vstoupit do cyklu transkripce od začátku – prostřednictvím interakce se σ -faktory a příslušným DNA promotorem.

Vysvětlivky zkratk (abecedně): α CTD – C-koncová doména α podjednotky RNA polymerasy, α NTD – N-koncová doména α podjednotky RNA polymerasy, NTP –ribonukleotid 5'-trifosfáty; RNAP – RNA polymerasa.

Obrázek byl převzat a upraven v programu Inkscape 1.1.1 podle Browning a Busby, 2016.

2.2.1 Regulace na úrovni iniciace transkripce

Iniciace transkripce zahrnuje rozpoznání konkrétních konsenzus sekvencí v oblastech -10 a -35 σ -faktorem, tvorbu uzavřeného komplexu sestavením celého RNAP holoenzymu v oblasti promotoru a následně tvorbu otevřeného komplexu – otevřením transkripční bubliny díky rozpojení komplementárních řetězců DNA. RNAP pak začíná podle templátového vlákna přidáváním NTP syntetizovat RNA transkript (viz Obrázek 1, shrnuto v Browning a Busby, 2016). Regulace iniciace transkripce může být konkrétně zaměřena přímo na RNAP anebo na regulační oblast daného genu.

Regulace zaměřená na RNAP moduluje vznik holoenzymu, jeho aktivitu nebo preferenci promotorových oblastí (shrnuté v Browning a Busby, 2016). Sem patří mimo jiné regulace prostřednictvím různých σ -faktorů. Jak již bylo řečeno, σ -faktory zprostředkovávají interakci mezi RNAP a specifickou promotorovou oblastí (shrnuté ve Feklístov *et al.*, 2014). Lze je rozdělit do dvou rodin: (1) tzv. „housekeeping“ σ -faktory (volně přeloženo jako σ -faktory „udržující pořádek“), které jsou zodpovědné za transkripci většiny genů; a (2) alternativní σ -faktory. Ty se specializují na transkripci za konkrétních neobvyklých životních podmínek, např. ve stresových podmínkách (shrnuté ve Feklístov *et al.*, 2014; a v Browning a Busby, 2016).

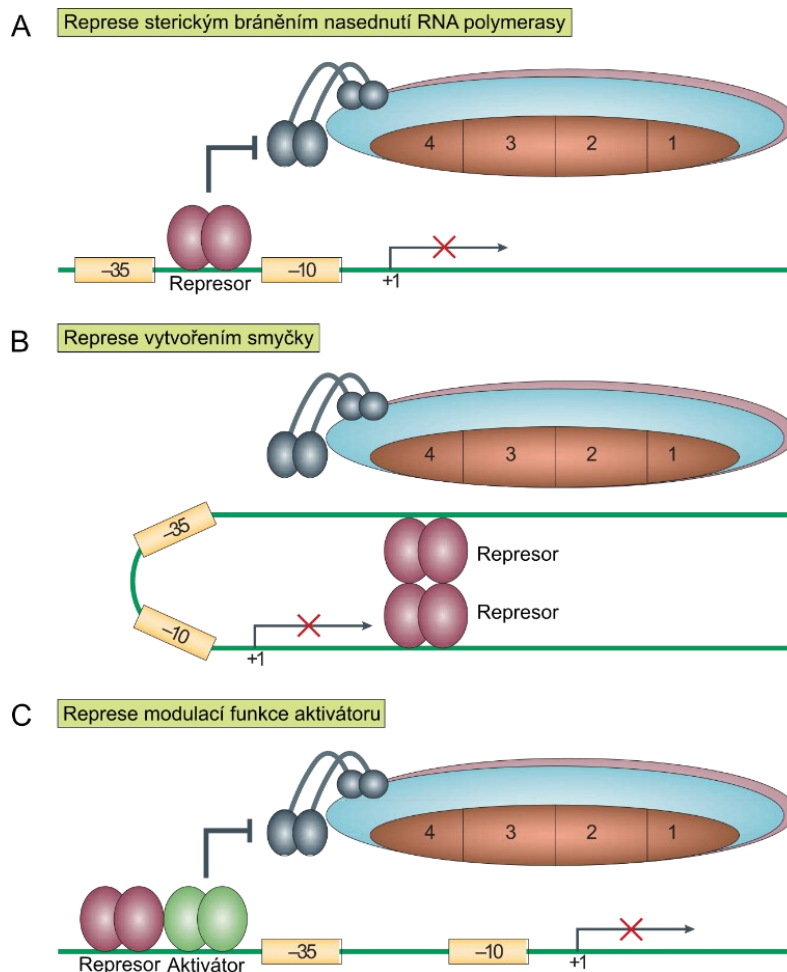
Iniciace transkripce je dále regulována v regulační oblasti genu. Kromě dalších mechanismů, které modifikují přímo DNA promotor, do této kategorie náleží především transkripční regulátory (shrnuté v Browning a Busby, 2004; v Browning a Busby, 2016; a v Browning *et al.*, 2019). V kontextu regulace metabolismu to jsou proteiny podílející se na regulaci transkripce genů, které kódují enzymy a další proteiny účastnící se různých metabolických drah. Geny jedné metabolické dráhy bývají často uspořádány do tzv. operonů, tedy transkripčních jednotek pod regulací jediného promotoru (Jacob a Monod, 1961). Jelikož je regulace metabolismu s co nejmenším vynaložením energie pro bakterie tak důležitá, patří tato úroveň regulace v říši bakterií mezi velmi rozšířenou, protože umožňuje omezit potenciální plýtvání zdroji na samém počátku jejich využití (Goelzer *et al.*, 2008).

Regulace prostřednictvím transkripčních regulátorů může být pozitivní, zprostředkovaná aktivátory, anebo negativní, zprostředkovaná represory (shrnuté v Browning a Busby, 2016). Jednotlivé způsoby regulace se také mohou vzájemně kombinovat a tvořit tak složitější promotory regulované více způsoby (shrnuté v Browning a Busby, 2019).

Aktivátory jsou proteiny, jejichž vazba na DNA zvyšuje aktivitu daného promotoru. Mohou tak činit prostřednictvím interakce s α -podjednotkami RNAP nebo σ -faktorem, popřípadě jejich vazba na DNA indukuje změnu konformace promotoru, což umožní transkripci příslušných genů (shrnuto v Browning a Busby, 2016). Negativní regulaci prostřednictvím represorů se věnuje podrobněji další kapitola.

2.3 Metabolické transkripční represory

Metabolické represory zprostředkovávají negativní regulaci transkripce tak, že svou vazbou na DNA brání transkripci příslušných regulovaných genů. Represory rozpoznávají specifickou sekvenci DNA, tzv. DNA operátor. Konkrétní molekulární mechanismus represe transkripce může mít několik různých podob, které se liší pro konkrétní druhy represorů (Obrázek 2; shrnuto v Browning a Busby, 2004). Nejjednodušším způsobem represe je sterické bránění nasednutí RNAP na oblast promotoru (Obrázek 2A). Dalším způsobem může být tvorba smyčky, která vzniká, když se v regulační oblasti genu nachází více rozpoznávaných operátorů umístěných dále od sebe, na něž se váže a následně oligomerizuje několik podjednotek represoru (Obrázek 2B). Dalším způsobem represe pak může být ovlivnění funkce aktivátoru prostřednictvím interakce s ním (Obrázek 2C) – (shrnuto v Browning a Busby, 2004).

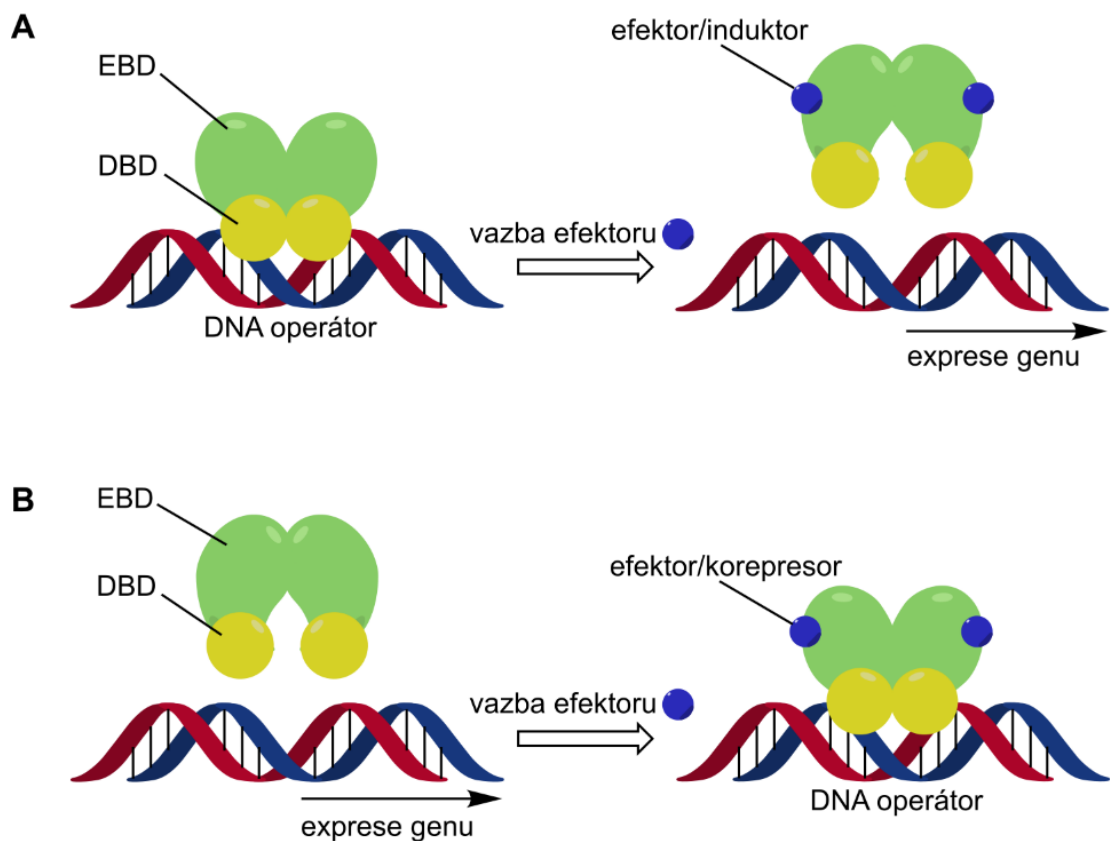


Obrázek 2: Schematické znázornění různých způsobů represe transkripce prostřednictvím represorů

(A) Represe sterickým bráněním nasednutí RNA polymerasy; (B) Represe vytvořením smyčky; (C) Represe modulací funkce aktivátoru

Obrázek byl převzat a upraven v programu Inkscape 1.1.1 podle Browning a Busby, 2004.

Aktivita represorů bývá v závislosti na stavu vnějšího i vnitřního prostředí bakterie modulována tzv. efektorovými molekulami. Jedná se o typ allosterické regulace, kdy navázání efektoru na represor mění jeho konformaci, a tím v důsledku dochází ke změně transkripce příslušných genů. Dá se říci, že represory plní funkci tzv. přepínačů transkripce, kdy o „vypnutém“ nebo „zapnutém“ stavu rozhoduje právě vazba efektorové molekuly (Goelzer *et al.*, 2008; shrnuto v Jain, 2015). Tento mechanismus regulace transkripce navrhli již na začátku 60. let minulého století Jacob a Monod (Jacob a Monod, 1961) na základě studií regulace *lac* operonu (kódujícího proteiny pro využití D-laktosy) a lyticko-lysogenního cyklu fága lambda (Pardee *et al.*, 1959; shrnuto v Lewis, 2011). Tento model regulace transkripce prostřednictvím represorů ve své podstatě platí dodnes a zjednodušeně je znázorněn na Obrázku 3.



Obrázek 3: Schematické znázornění molekulárního mechanismu funkce represorů metabolických operonů

(A) Represory katabolických operonů: efektor se nazývá induktor a bývá často vstupní molekulou dané degradační dráhy nebo jejím metabolitem. Vazba efektoru na represor zapříčiní uvolnění represoru z DNA operátoru, čímž umožní následnou transkripci genů kódujících enzymy dané degradační dráhy. Také je tento způsob nazýván enzymová indukce a jeho nejznámějším příkladem je regulace *lac* operonu pro využití D-laktosy (Pardee *et al.*, 1959; Jacob a Monod, 1961).

(B) Represory anabolických operonů: efektor se nazývá korepresor a bývá často konečným produktem dané syntetické dráhy. Jeho vazba na represor zapříčiní vazbu represoru na DNA operátor a zabránění další transkripce genů kódujících enzymy dané syntetické dráhy. Tento způsob je také nazýván represe koncovým produktem a vyskytuje se například jako jeden z regulačních mechanismů *trp* operonu pro biosyntézu L-tryptofanu (Shimizu *et al.*, 1973).

Vysvětlivky zkratk (abecedně): DBD – DNA-vazebná doména (z angl. „DNA-binding domain“); EBD – efektor-vazebná doména (z angl. „effector-binding domain“). Schéma bylo vytvořeno v programu ChemBioDraw Ultra 14.0 (Cambridge Soft, USA) a upraveno v programu Inkscape 1.1.1.

V této práci budou dále rozebírány represory, jejichž funkce je modulována způsobem znázorněným na Obrázku 3A, tedy ty, které vazba efektoru uvolní z DNA operátoru. Jedná se především o represory genů a operonů kódujících enzymy katabolických drah (shrnuto v Stülke a Hillen, 2000).

Transkripční represory sdílí typickou doménovou organizaci, ze které vychází obecný mechanismus jejich fungování. Obvykle se skládají ze dvou domén: C-koncové domény, na kterou se váže molekula efektoru, a N-koncové domény, která rozpoznává specifickou sekvenci DNA a váže se na ni. Podle své funkce získaly tyto domény i své pojmenování EBD („effector-binding domain“) a DBD („DNA-binding domain“) – (shrnuto v Jain, 2015).

Označení transkripční represor vypovídá o základní funkci těchto proteinů, kterou je zabránit transkripci genů, jež se pod regulací daného represoru nacházejí. Když je represor navázán na rozpoznávanou sekvenci operátorové DNA, svou přítomností blokuje nasednutí RNAP na DNA některým z výše uvedených mechanismů (viz Obrázek 2; shrnuto v Browning a Busby, 2004). Jakmile je však přítomna molekula efektoru, dojde k jejímu navázání na EBD a protein změní svou konformaci. Tato změna způsobí, že represor již dále nebrání nasednutí RNAP a transkripce příslušných genů může proběhnout (Obrázek 3A; shrnuto v Jain, 2015; v Browning *et al.*, 2019; a v Browning a Busby, 2004).

Dnes už je známo, že chování transkripčních regulátorů je ve skutečnosti mnohdy složitější než původní model Jacobse a Monoda (Visweswariah a Busby, 2015). Často dochází ke kombinaci více typů regulace, případně se regulace účastní více regulátorů zároveň v aditivním či kooperativním módu (shrnuto v Browning *et al.* 2019). Díky neustálému vývoji technik molekulární biologie a genetiky se o konkrétních mechanismech regulace bakteriální transkripce dozvídáme více a více (shrnuto v Balleza *et al.*, 2009; a v Browning *et al.*, 2019).

2.3.1 Transkripční represory drah pro katabolismus zdrojů uhlíku u bakterie *B. subtilis*

Podle odhadů tvoří transkripční regulátory bezmála 10 % z celkového počtu bakteriálních genů kódujících proteinové sekvence (Pérez-Rueda a Collado-Vides, 2000). U *B. subtilis* to je 6 % bez σ -faktorů a atenuátorů transkripce (Moreno-Campuzano *et al.*, 2006). Celkově bylo pro *B. subtilis* předpovězeno 237 proteinů s funkcí transkripčních regulátorů. Pro přibližně polovinu z nich byla v roce 2006 jejich funkce experimentálně potvrzena (Moreno-Campuzano *et al.*, 2006). Pro 59 % z těchto 237 byla předpovězena funkce represorů a pro 17 % funkce aktivátorů. Dále bylo predikováno 17 % duálních regulátorů s oběma funkcemi. Pro zbývajících cca 6 % nebylo možné regulační funkci určit (Moreno-Campuzano *et al.*, 2006).

Tyto regulátory se dají podle sekvenční podobnosti jednotlivých domén rozdělit do strukturních rodin. Jelikož se strukturou a funkcí domény velmi liší, jeden protein může být zařazen do více rodin podle sekvence DBD anebo EBD. Další možnost klasifikace domén je do rodin podle struktury DBD a do tzv. podrodin podle struktury EBD (Rigali *et al.*, 2002).

Transkripční regulátory *B. subtilis* se řadí do celkem 51 různých strukturních rodin, přičemž nejpočetnější jsou rodiny MarR a GntR (Moreno-Campuzano *et al.*, 2006). Metabolické represory, které regulují transkripci genů pro využití různých sacharidů jako zdrojů uhlíku, pak pocházejí většinou z rodin DeoR, SorC, LacI a GntR (Škerlová, 2015). *B. subtilis* však dovede jako zdroj uhlíku využívat i jiné sloučeniny než jen sacharidy a jejich deriváty – například L-laktát (Chai *et al.*, 2009).

2.4 Regulátor (represor) využití laktátu (LutR)

Podobně jako tomu bylo u řady jiných genů, také gen kódující LutR, *lutR*, byl poprvé anotován v roce 1997 v rámci prvního projektu kompletní sekvenace genomu *B. subtilis* (Kunst *et al.*, 1997). Tehdy byl pojmenován jako *yvfI*, kdy „y“ označovalo geny, u jejichž produktů zatím nebyla známa funkce. Na základě sekvenční analýzy bylo určeno, že *yvfI* pravděpodobně kóduje transkripční regulátor patřící do rodiny GntR (Kunst *et al.*, 1997). Bylo předpovězeno, že obsahuje N-koncovou DBD a C-koncovou EBD, podobně jako další členové této rodiny transkripčních regulátorů (Kunst *et al.*, 1997; Köroğlu *et al.*, 2008; shrnuto v Jain, 2015).

První náhled na možnou funkci tohoto genu poskytla v roce 2008 práce Köroğlu *et al.*, jejíž autoři pomocí transpozonové mutagenese určili, že gen *yvfI* je nezbytný pro produkci dipeptidického antibiotika bacilysinu (Köroğlu *et al.*, 2008). Zároveň také poukázali na to, že se v databázi UniProt (Konsorcium UniProt, 2020) v té době nacházela jiná varianta sekvence předpokládaného proteinu YvfI, která byla oproti variantě anotované Kunst *et al.* (1997) na N-konci delší (Köroğlu *et al.*, 2008).

Další funkce pro produkt genu *yvfI* byla předpovězena na základě jeho lokalizace v genomu, a to v blízkosti operonu obsahujícího geny pro metabolickou dráhu využití L-laktátu, *lutABC*, a genu pro L-laktát permeasu, *lutP* (Chai *et al.*, 2009). Toto zjištění vedlo k přejmenování genu *yvfI* na *lutR* (z angl. „lactate utilization regulator/repressor“). V *B. subtilis* dělí operon *lutABC* a oblast, kde se nachází geny *lutR* a *lutP*, sekvence o délce přibližně 15 kb. Autoři v práci Chai *et al.* (2009) také zjistili, že homology těchto genů se vyskytují napříč různými druhy bakterií

a jedná se tedy pravděpodobně o dříve neznámou velmi konzervovanou dráhu umožňující využití L-laktátu jako zdroje uhlíku.

Další vhled do funkce LutR přinesla rozsáhlá studie İrigül-Sönmez *et al.* (2014). Výsledky této práce ukazují na to, že LutR funguje jako globální regulátor a reguluje velké množství různých genů, jejichž exprese je spojena s přechodem z fáze exponenciálního růstu bakteriální populace do fáze stacionární (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014). Ve stejném roce pak byla publikována studie, která definitivně poukázala na to, že existují dvě varianty LutR v různých kmenech *B. subtilis*, které se liší délkou DBD a svou funkcí (Chiu *et al.*, 2014).

První varianta obsahuje kratší DBD a vyskytuje se v domestikovaných kmenech *B. subtilis*, jako jsou například PY79 a 168 (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014) a v této práci bude dále pojmenována jako LutR₂₂₋₂₄₀. Druhá varianta s DBD na N-konci delší o 21 aminokyselin byla nalezena v divokých kmenech *B. subtilis*, např. RO-NN-1 (Chiu *et al.* 2014) a v této práci bude dále označována jako LutR₁₋₂₄₀. Sekvence EBD je pro obě varianty stejná. Funkční studie těchto dvou variant LutR ukázaly, že se svou funkcí od sebe liší velmi významně, jak bude popsáno v následujících kapitolách.

2.4.1 Funkce LutR₂₂₋₂₄₀ z domestikovaných kmenů *B. subtilis*

Köroğlu *et al.* (2008) své studie prováděli na kmeni *B. subtilis* PY79, který se řadí mezi laboratorní. Z toho vyplývá, že funkce *lutR* jako genu nezbytného pro tvorbu dipeptidického antibiotika bacilysinu byla zatím potvrzena pouze pro tento domestikovaný kmen, zatímco u divokých kmenů tato funkce známa není. Bacilysin, dříve znám také pod jmény bacillin nebo tetain (Atsumi *et al.*, 1975), patří mezi řadu antimikrobiálních a antifungálních látek, které je *B. subtilis* schopen produkovat (shrnuto v Sumi *et al.*, 2014). Skládá se z aminokyselinových zbytků L-alaninu a L-anticapsinu a je syntetizován neribozomální cestou, tedy prostřednictvím enzymatických reakcí (shrnuto v Özcengiz a Öğülür, 2015).

K vlivu LutR₂₂₋₂₄₀ na syntézu některých antimikrobiálních peptidů se autoři vrátili v roce 2014 a pokračovali ve studiích funkce LutR₂₂₋₂₄₀ z kmene *B. subtilis* PY79 pomocí transkripčního profilování a dalších analýz (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014). Jak již bylo zmíněno výše, v této studii byla popsána úloha LutR₂₂₋₂₄₀ jako globálního regulátoru, který se účastní regulace genů zapojených do fyziologických a metabolických procesů tzv. přechodové fáze, tedy fáze přechodu mezi exponenciálním růstem a stacionární fází (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014). Tyto

procesy a geny, na jejichž regulaci se LutR₂₂₋₂₄₀ podílí, İrigül-Sönmez *et al.* (2014) rozdělili do několika kategorií: (1) antimikrobiální látky, jejich produkce a rezistence vůči nim; (2) metabolismus dusíku a uhlíku; (3) růst buněčné stěny; (4) produkce extracelulárních i intracelulárních degradativních enzymů; (5) mobilní genetické elementy a jejich přenos; (6) tvorba biofilmu; (7) stres buněčné stěny a (8) odklad sporulace. Vazba LutR₂₂₋₂₄₀ k regulačním oblastem *lutABC* a *lutP*, podle nichž byl protein pojmenován, však prokázána nebyla (Chiu *et al.*, 2014).

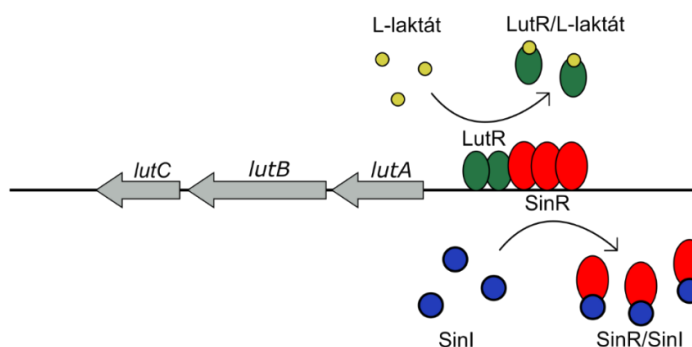
Stejně jako dříve Chai *et al.* (2009) se i İrigül-Sönmez *et al.* (2014) zaměřili na potenciální regulační interakci mezi LutR a SinR, ale v tomto případě LutR₂₂₋₂₄₀. SinR je označován jako hlavní globální regulátor tvorby biofilmu a u *B. subtilis* byl extenzivně studován jeho regulon, mechanismus jeho funkce i struktura (Kearns *et al.*, 2005; Colledge *et al.*, 2011; Newman *et al.*, 2013; Milton *et al.*, 2020 a další). Způsob a míra kooperačního chování LutR₂₂₋₂₄₀ a SinR při vazbě k regulačním oblastem genů byla testována pomocí gelových retardačních analýz (EMSA, z angl. „electrophoretic mobility gel shift assay“). SinR interagoval se všemi testovanými regulačními oblastmi genů z regulonu LutR₂₂₋₂₄₀, nicméně způsob interakce se u různých genů lišil v tom, zda byl její účinek simultánní, aditivní či stimulační (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014). Tyto výsledky naznačují, že se regulony obou globálních regulátorů z velké části překrývají, což zřejmě může sloužit k jemné regulaci a celkovému ladění načasování a míry exprese genů přechodové fáze (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014).

2.4.2 Funkce LutR₁₋₂₄₀ z divokých kmenů *B. subtilis*

Autoři v práci Chai *et al.* (2009) pro své experimenty využili DNA kmene *B. subtilis* 3610, který se řadí mezi nedomestikované. Zabývali se studiem operonu kódujícího proteinovou dráhu s dosud neidentifikovanou funkcí. Tento operon, dříve znám pod jménem *yvfV-yvfW-yvbY*, autoři objevili v rámci pokračujících studií cílových genů hlavního regulátoru tvorby biofilmu SinR (Chu *et al.*, 2006) a na základě jeho objevené funkce ho označili jako *lutABC* (Chai *et al.*, 2009). V blízkosti *lutABC* byly totiž objeveny geny pro předpokládanou L-laktát permeasu *lutP* (dříve *yvfH*) a také transkripční regulátor typu GntR *lutR* (dříve *yvfI*; Kunst *et al.*, 1997), a to jak v genomu *B. subtilis*, tak v genomech řady dalších bakterií (Chai *et al.*, 2009). Blízká poloha genu *lutP* vedla autory k myšlence, že *lutABC* bude nějak souviset s využitím L-laktátu. Operon *lutABC* kóduje tři proteiny, které pravděpodobně obsahují železosírné (Fe-S) klastry a domény podobné oxidoreduktasám (Kunst *et al.*, 1997). Ve svých

experimentech autoři zjistili, že je tento operon potřebný pro růst na L-laktátu jako jediném zdroji uhlíku, stejně jako gen *lutP* (Chai *et al.*, 2009). Homology genů *lutABC* se vyskytují napříč různými druhy bakterií a jedná se tedy pravděpodobně o dříve neznámou velmi konzervovanou dráhu pro využití L-laktátu (Chai *et al.*, 2009).

Transkripce operonu *lutABC* je kontrolována dvěma různými transkripčními regulátory – kromě SinR také právě LutR, který podle této své nově objevené funkce získal své jméno (Chai *et al.*, 2009). Výsledky studie naznačují, že SinR a LutR se kooperativně podílejí na negativní regulaci tohoto operonu (Obrázek 4; Chai *et al.*, 2009). Nepřítomnost kteréhokoliv z těchto dvou represorů vede k transkripci *lutABC*, na základě čehož autoři této práce odhadují, že LutR a SinR se na DNA vážou v blízkém kontaktu a pro tuto vazbu na sobě navzájem závisí (Chai *et al.*, 2009).



Obrázek 4: Schéma předpokládaného mechanismu transkripční regulace *lutABC* operonu kódujícího enzymy potřebné pro využití L-laktátu

LutR a SinR kooperativně zprostředkovávají negativní regulaci *lutABC* operonu, který kóduje proteiny potřebné pro využití L-laktátu. Pokud je kterýkoliv z těchto dvou represorů uvolněn z vazby k DNA operátoru, transkripce *lutABC* může probíhat. Pokud jsou v okolním prostředí bakterie vhodné podmínky pro tvorbu a růst biofilmu, je represivní aktivita SinR inhibována antirepresorem SinI a *lutABC* je transkribován. V přítomnosti L-laktátu zase dochází k jeho předpokládané vazbě na LutR, což také vede k derepresi a následné transkripci *lutABC*.

Schéma bylo vytvořeno v programu Inkscape 1.1.1 podle Chai *et al.*, 2009.

Chiu *et al.* (2014) svou pozornost zaměřili na *lutP*. Své studie prováděli na kmeni *B. subtilis* RO-NN-1, který se řadí mezi kmeny nedomestikované. Autoři této práce byli první, kdo rozlišili LutR₂₂₋₂₄₀ z domestikovaných kmenů *B. subtilis* a LutR₁₋₂₄₀ z kmenů divokých (Chiu *et al.*, 2014). Ověřili také, že podle předpokladu LutR zprostředkovává represi *lutP* (Chiu *et al.*, 2014). Naopak při testování vazby LutR₁₋₂₄₀ k regulačním oblastem některých z genů, které reguluje LutR₂₂₋₂₄₀ (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014), se ukázalo, že LutR₁₋₂₄₀ se k těmto DNA úsekům neváže

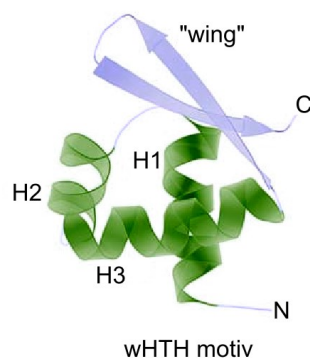
(Chiu *et al.*, 2014). Toto zjištění je konzistentní s hypotézou, že odlišnost funkce LutR₁₋₂₄₀ a LutR₂₂₋₂₄₀ je způsobena změnou rozpoznávané DNA sekvence (Chiu *et al.*, 2014).

Jak pro *lutABC*, tak pro *lutP* byla na základě fúze s reportérovým genem *lacZ* pozorována indukce L-laktátem závislá na velikosti dávky (Chai *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2014). Chiu *et al.* (2014) poté pomocí EMSA analýz testovali vliv L-laktátu a některých jeho metabolitů (L-alaninu, pyruvátu a acetylkoenzymu A) na interakci LutR s úsekem DNA obsahujícím jeho vazebné místo. Tímto experimentem se nepodařilo prokázat vliv žádné z uvedených sloučenin. Je tedy možné, že efektorovou molekulou pro LutR je dosud nepopsaný metabolit L-laktátu (Chiu *et al.*, 2014).

2.4.3 LutR z hlediska strukturní biologie

Jak již bylo zmíněno, LutR patří do strukturní rodiny transkripčních regulátorů GntR, která získala jméno podle represoru operonu pro katabolismus D-glukonátu (Fujita a Fujita, 1987; Haydon a Guest, 1991). Tato rodina se dělí do několika podrodin podle struktury C-koncové EBD (Rigali *et al.*, 2002; shrnuto v Jain, 2015). LutR se řadí do podrodiny FadR, která získala název podle regulátoru metabolismu mastných kyselin (FadR, z angl. „fatty acid metabolism regulator“; Yeo *et al.*, 2017; Rigali *et al.* 2002; shrnuto v Jain, 2015). Odlišnost struktur EBD transkripčních regulátorů ze stejné rodiny umožňuje velkou strukturní a funkční variabilitu jednotlivých represorů (Rigali *et al.*, 2002). Tato práce se dále zaměřuje na strukturu a funkci DBD.

Represory z rodiny GntR sdílejí DNA-vazebný motiv zvaný šroubovice-otáčka-šroubovice (HTH, z angl. „helix-turn-helix“; Suvorova *et al.*, 2015). Ten se vyskytuje v různých variacích podle počtu α -šroubovic a případných β -skládáních listů a jejich vzájemné topologie (shrnuto v Aravind *et al.*, 2005). Pro LutR₁₋₂₄₀ byl předpovězen DNA-vazebný motiv tzv. „winged“ HTH (wHTH) typický pro mnoho dalších členů této rodiny, v němž kromě klasické HTH struktury tvoří pár krátkých β -skládáních listů útvar podobný malému křídlu, podle kterého tento motiv získal pojmenování (Obrázek 5). Za rozpoznání specifické DNA sekvence obvykle bývá zodpovědných několik konkrétních aminokyselinových zbytků v daném vazebném motivu.



Obrázek 5: Stuhové zobrazení 3D struktury typického DNA-vazebného motivu wHTH

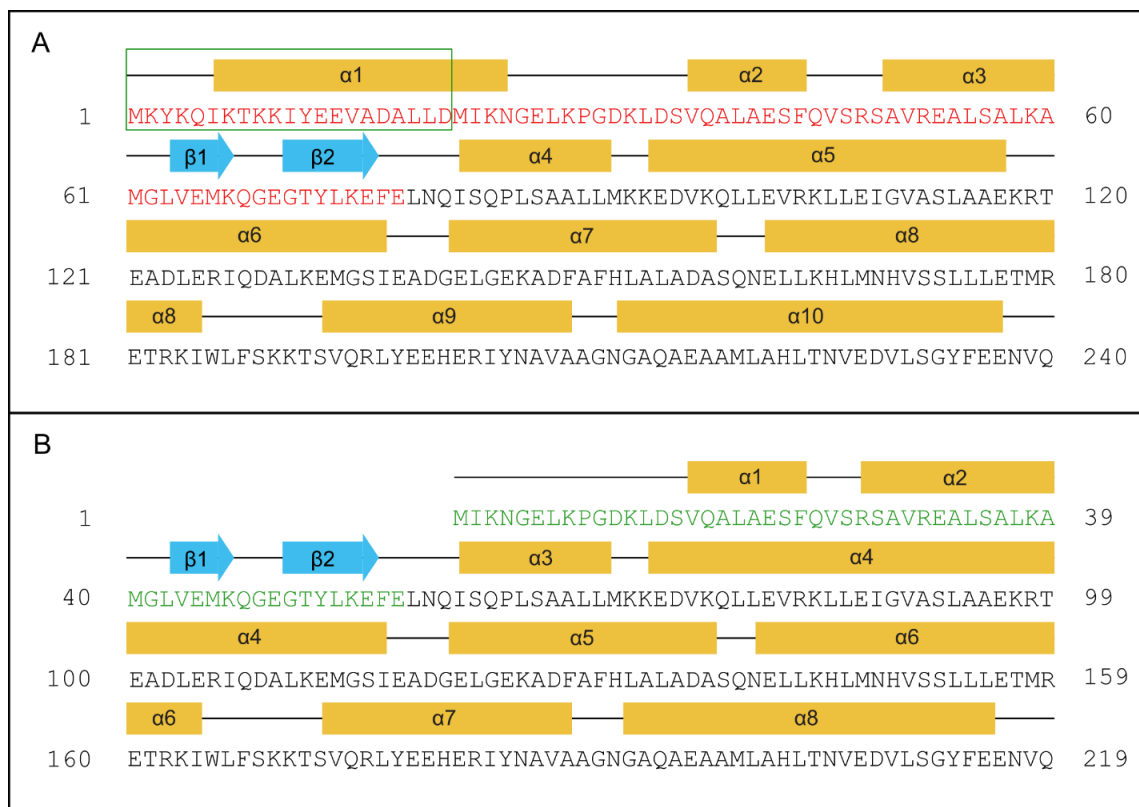
Tento DNA-vazebný motiv se obvykle skládá ze tří α -helixů (zeleně) a dvou až více β -skládaných listů (fialově), které tvoří útvar podobný "křídélku".

Vysvětlivky zkratk (abecedně): C – C-konec motivu; H1-3 – α -helix č. 1 – 3 podle pozice od N-konce; N – N-konec motivu, wHTH – „winged“ (volně přeloženo jako „okřídlený“) strukturní motiv šroubovice-otáčka-šroubovice (z angl. „helix-turn-helix“).

Obrázek byl převzat a upraven v programu Inkscape 1.1.1 podle Aravind *et al.*, 2005.

Proteiny LutR₁₋₂₄₀ a LutR₂₂₋₂₄₀ se ve své DBD liší. Delece jednoho nukleotidu způsobuje posun čtecího rámce při transkripci a její předčasné ukončení. Zároveň se však v těsné blízkosti nachází další, alternativní počátek transkripce, a tak je LutR₂₂₋₂₄₀ produkován o prvních 21 aminokyselin kratší (Chiu *et al.*, 2014). Podle predikce sekundární struktury nástrojem JPred 4 (Drozdetskiy *et al.*, 2015; Obrázek 6) tato delece zasahuje do prvního α -helixu, který je součástí vazebného motivu wHTH, takže výrazně ovlivňuje vazebnou specifitu těchto dvou variant LutR.

Pro LutR₁₋₂₄₀ byla pomocí EMSA analýz identifikována vazebná sekvence obsahující palindrom 5'-TCATC-N₁-GATGA-3' (Chiu *et al.*, 2014). Tato sekvence se nachází v regulačních oblastech operonu *lutABC* i genu *lutP*. LutR₂₂₋₂₄₀ se naproti tomu váže k velkému množství promotorových oblastí, a proto funguje jako globální regulátor. Určení konkrétní sekvence pro vazbu LutR₂₂₋₂₄₀ bylo komplikovanější. Irigul-Sonmez *et al.* (2014) pro to využili nástroj zvaný MEME Suite (Bailey *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2015), který analyzuje sekvence z hlediska výskytu opakujících se motivů. Na jeho základě určili tzv. konsenzus motiv s velkým počtem pyrimidinových bazí 5'-TTCCTCCTTTNTT-3', který se vyskytoval ve fragmentech DNA, k nimž se LutR₂₂₋₂₄₀ vázal (Irigul-Sonmez *et al.*, 2014).



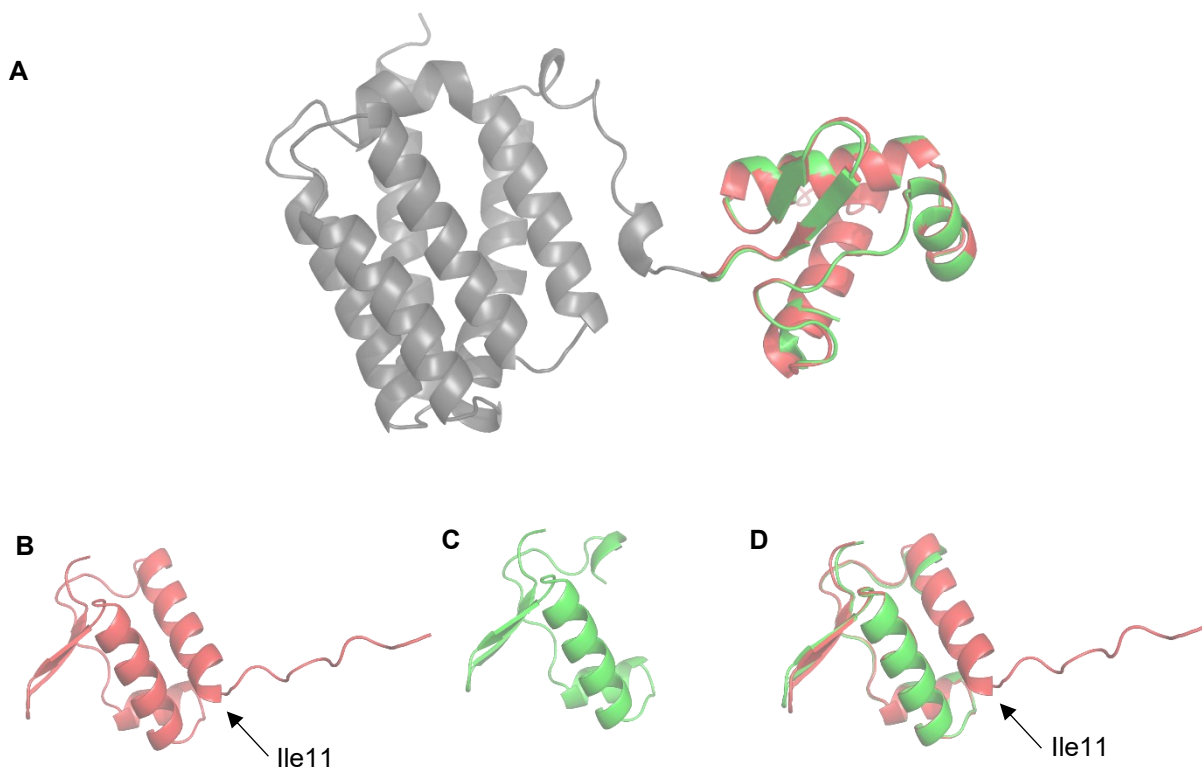
Obrázek 6: Predikce sekundární struktury LutR₁₋₂₄₀ a LutR₂₂₋₂₄₀ nástrojem JPred 4

(A) Primární struktura LutR₁₋₂₄₀ srovnaná s predikcí sekundárních struktur. Červeným písmem je vyznačena DBD, zeleným rámečkem N-koncových 21 aminokyselin, které chybí v LutR₂₂₋₂₄₀. Tmavě žlutou jsou vybarveny α -šroubovice, světle modrou β -skládané listy.

(B) Primární struktura LutR₂₂₋₂₄₀ srovnaná s predikcí sekundárních struktur. Zeleným písmem je vyznačena DBD, tmavě žlutou jsou vybarveny α -šroubovice, světle modrou β -skládané listy.

Obrázek byl připraven v programu Inkscape 1.1.1 na základě predikcí programem JPred 4 (Drozdetskiy *et al.*, 2015).

Novinkou ve světě strukturní biologie je nástroj AlphaFold (Senior *et al.*, 2020; Jumper *et al.*, 2021). Je založen na strojovém učení umělých neuronových sítí a na základě výpočetního algoritmu dovede predikovat strukturu proteinů. Z těchto struktur vznikla databáze AlphaFold (Varadi *et al.*, 2021) rozšiřující se každým dnem o nové modely. Na začátku prosince 2021 do této databáze přibyla i predikce struktury LutR (dohledatelné pod kódem UniProt O07007; [cit. 28. 12. 2021]). Jde o predikci struktury monomerní formy proteinu, jež obsahuje domény DBD a EBD (Obrázek 7A). Zajímavé je porovnání modelů DBD, které AlphaFold predikuje pro delší a kratší variantu (Obrázky 7B, 7C a 7D). Modely ukazují, že v LutR₂₂₋₂₄₀ dochází k delecí prvního α -helixu, který dle predikce začíná aminokyselinovým zbytkem na pozici 11, a také N-koncového úseku bez predikované sekundární struktury o délce 10 aminokyselinových zbytků.



Obrázek 7: Predikce 3D struktury LutR nástrojem AlphaFold 2.0

(A) Stuhové zobrazení predikce 3D struktury LutR s překryvem obou variant DBD; šedě je vybarvena EBD, která je pro obě varianty stejná, delší varianta DBD LutR je zobrazena červeně a kratší zeleně.

(B) Stuhové zobrazení predikce 3D struktury DBD delší varianty LutR z divokých kmenů *B. subtilis* (LutR₁₋₇₈), šipkou je označena poloha první aminokyseliny předpovězeného α -helixu Ile11.

(C) Stuhové zobrazení predikce 3D struktury DBD kratší varianty LutR z laboratorních kmenů *B. subtilis* (LutR₂₂₋₇₈).

(D) Překryv stuhového zobrazení predikcí 3D struktur LutR₁₋₇₈ (červeně) a LutR₂₂₋₇₈ (zeleně). Šipkou je označena poloha první aminokyseliny předpovězeného α -helixu Ile11 v LutR₁₋₇₈.

Obrázky byly vytvořeny v programu PyMOL 2.5.2 (Schrödinger, USA) za použití predikce nástrojem AlphaFold 2.0 (Jumper *et al.*, 2021).

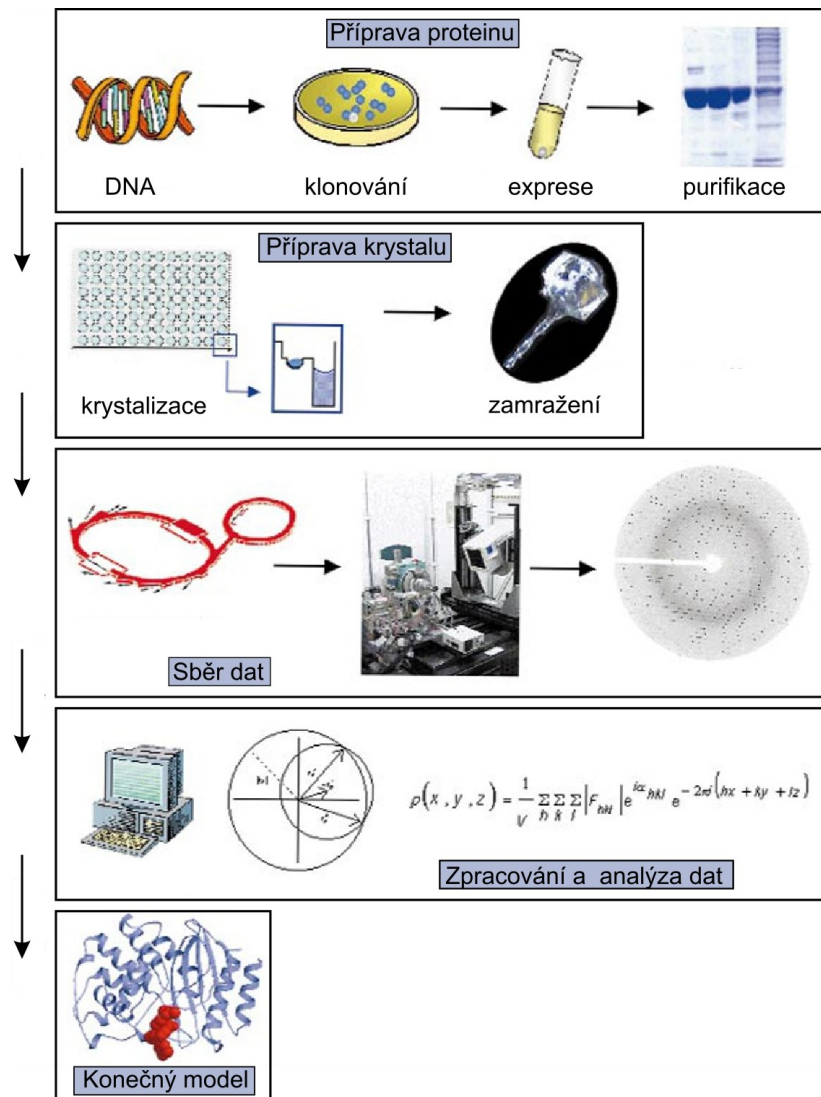
Ačkoliv AlphaFold přináší nesmírně cenné strukturní informace, v případě DNA-vazebných proteinů obsahujících více domén, jako je právě i LutR, má své limity. AlphaFold totiž není schopen spolehlivě modelovat vzájemnou polohu jednotlivých domén, oligomerní strukturu ani strukturu protein-DNA komplexu. Tyto limity lze překonat jen experimentálním určením trojrozměrné (3D) struktury proteinu v komplexu s DNA. K tomu mohou být využity různé metody strukturní biologie, jako je například rentgenová (RTG) krystalografie nebo nukleární magnetická rezonance (NMR).

2.5 Metody a techniky strukturní biologie

2.5.1 Rentgenová krystalografie

Jednou z nejvýznamnějších metod, kterou se zjišťuje 3D struktura proteinů, nukleových kyselin a jejich komplexů na atomové úrovni, je rentgenová krystalografie (shrnutí v Rupp, 2009). Její princip je založen na rozptylu (difrakci) paprsků RTG záření na krystalové mřížce proteinového krystalu. Tato difrakce je snímána v podobě difrakčního obrazce, z něhož lze získat tzv. Fourierovou transformací obraz mapy elektronových hustot (shrnutí v Rupp, 2009). Pro tuto komplexní matematickou operaci je však nejprve nutné vyřešit tzv. fázový problém, který vzniká ztrátou informace o fázi při snímání difrakčních dat. Pro řešení fázového problému se u biologických makromolekul často používá tzv. metoda molekulového nahrazení, kdy se využije strukturní informace z již vyřešených příbuzných struktur (shrnutí v Evans a McCoy, 2008). Vyřešené struktury proteinů jsou pak ukládány do on-line databáze proteinových struktur – tzv. Protein Data Bank (PDB; Berman *et al.*, 2000; dostupné na adrese: <https://www.rcsb.org/>). K dnešnímu dni je v PDB cca 162 000 struktur vyřešených pomocí RTG krystalografie [cit. 28. 12. 2021], které jsou volně přístupné všem uživatelům.

Časově a experimentálně nejnáročnějším krokem z tohoto procesu však bývá samotná krystalizace proteinu. V první řadě je totiž potřeba získat pro krystalizační experimenty poměrně velké množství homogenního proteinu, jehož čistota je větší než 95 %. Samotná krystalizace pak spočívá v úvodním testování stovek různých krystalizačních roztoků, které obsahují často komplexní směsi sloučenin (např. polyethylenglykol (PEG) různé molekulové hmotnosti (MW, z angl. „molecular weight“), halogenidy jako NaCl, NaI, NaBr a MgCl₂ nebo třeba soli organických kyselin jako citrát sodný apod.). Obvykle je poté vybráno několik těchto výchozích roztoků pro další úpravy podmínek krystalizace. Cílem těchto následných optimalizací konkrétních parametrů krystalizace (např. teploty, pH roztoku, koncentrace proteinu či aditiv) je v ideálním případě dosažení růstu dostatečně velkých a dobře difraktujících monokrystalů (shrnutí například v Bergfors, 2021). Z těchto krystalů je poté nasnímána kompletní sada difrakčních dat pro další zpracování, které je stručně popsáno v předchozím odstavci. Celý tento pracovní postup, který vede k určení 3D struktury studovaného proteinu, je schematicky znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8: Schematické znázornění experimentálního postupu při určení 3D struktury proteinu pomocí RTG krystalografie

V prvním kroku strukturální studie pomocí RTG krystalografie je připraveno dostatečné množství čistého a homogenního proteinu. To zahrnuje získání DNA kódující daný protein, její zaklonování do příslušného vektoru a vložení tohoto vektoru do zvoleného expresního systému. Získaný protein je poté z tohoto organismu izolován a purifikován do vysoké čistoty. Dále následuje samotná krystalizace, která obnáší testování stovek různých krystalizačních roztoků a podmínek. Po úvodním testování různých komerčních sad roztoků se růst krystalů často ještě optimalizuje testováním různých parametrů krystalizace, jako jsou teplota, koncentrace proteinu, pH roztoku, koncentrace aditiv a další. Výsledné krystaly jsou uchyceny do nylonové smyčky, zamraženy v tekutém dusíku a otestovány na zdroji RTG záření. U nejlépe difraktujících krystalů pak probíhá sběr difrakčních dat nejčastěji na synchrotronu. Získaný difrakční obraz je pomocí řady matematických výpočtů počítačově zpracován. Je potřeba vyřešit fázový problém např. metodou molekulového nahrazení, do mapy elektronové hustoty namodelovat strukturálního model a teprve po upřesnění je získána 3D struktura studovaného proteinu.

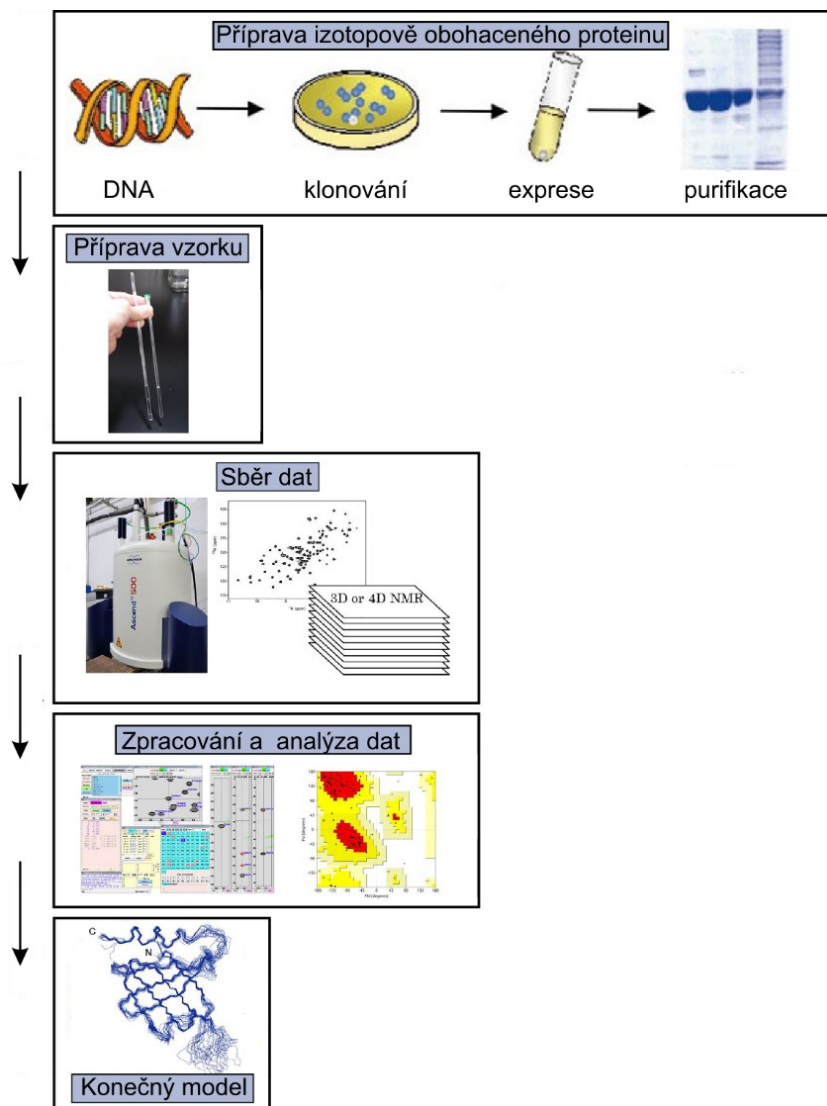
Obrázek byl převzat a upraven v programu Inkscape 1.1.1 podle Abola *et al.*, 2000.

2.5.2 Nukleární magnetická rezonance

Metoda NMR je spektroskopická a na rozdíl od RTG krystalografie přináší informaci o struktuře proteinů, nukleových kyselin či jejich komplexů nacházejících se v roztoku, tedy v jejich přirozeném prostředí. Princip této metody je založen na magnetických vlastnostech jader atomů některých izotopů. Tato jádra ve velmi silném magnetickém poli absorbují radiofrekvenční záření ve frekvencích desítek až stovek MHz, což závisí na řadě faktorů – mimo jiné také na vlastnostech chemického okolí atomů v molekulách. Sledováním jednotlivých typů signálů je pak možné získat informace o struktuře (shrnuto v Sugiki *et al.*, 2017). Pracovní postup, který vede k určení 3D struktury proteinu pomocí NMR spektroskopie, je schematicky znázorněn na Obrázku 9.

NMR se využívá především pro strukturní studie dynamicky se chovajících makromolekul, které nelze nebo se nedaří zkrystalizovat (shrnuto v Sugiki *et al.*, 2017). Své využití má také například ve studiích interakcí proteinů s ligandy a protein-proteinových komplexů (shrnuto v Orts a Gossert, 2018; a v Purslow *et al.*, 2020). V současnosti je v PDB uloženo 13500 struktur vyřešených pomocí NMR spektroskopie v roztoku (dostupné z: <https://www.rcsb.org/> [cit. 28. 12. 2021]).

Kromě výše popsanych metod jsou ve strukturní biologii využívány i další metody. Mezi ně patří například prudce se rozvíjející kryoelektronová mikroskopie (shrnuto v Bai *et al.*, 2015; nebo v Carroni a Saibil, 2016), která v posledních letech přispěla k vyřešení řady nejen proteinových struktur. V této diplomové práci tato metoda není používána, a proto nebude dále rozebírána.



Obrázek 9: Schematické znázornění experimentálního postupu při určení 3D struktury proteinu pomocí NMR spektroskopie

V prvním kroku strukturální studie pomocí NMR spektroskopie je potřeba připravit dostatečné množství izotopově obohaceného proteinu. To zahrnuje získání DNA kódující daný protein, její zaklonování do příslušného vektoru a vložení tohoto vektoru do zvoleného expresního systému. Kultivace pak probíhá tak, aby bylo co největší procento biomasy izotopově obohaceno. Získaný protein je poté z použitého organismu izolován a purifikován. Následně je k vzorku pro měření přidána deuterovaná („těžká“) voda a vzorek je v NMR kyvetě vložen do spektrometru. Poté probíhá měření dat, které se v konkrétních parametrech liší u jednotlivých typů experimentů. Naměřené signály jsou následně přiřazovány jednotlivým aminokyselinám a dalším počítačovým zpracováním a vyhodnocováním je v konečné fázi získán model 3D struktury studovaného proteinu.

Obrázek byl převzat a upraven v programu Inkscape 1.1.1 podle Abola *et al.*, 2000; a Sugiki *et al.*, 2017.

3 Cíle práce

Tato práce je součástí projektu dlouhodobě řešeného ve školící laboratoři, který je zaměřen na studium struktury transkripčních represorů genů podílejících se především na metabolismu alternativních zdrojů uhlíku u gram-pozitivní bakterie *B. subtilis*. Tato diplomová práce se konkrétně zabývá represorem využití L-laktátu LutR, který má odlišnou funkci u divokých a domestikovaných kmenů *B. subtilis*. U domestikovaných kmenů byla popsána kratší varianta tohoto proteinu, které chybí úvodních 21 aminokyselin v N-koncové DBD (LutR₂₂₋₂₄₀; İrigül-Sönmez *et al.*, 2014; Chiu *et al.*, 2014). Tato kratší varianta funguje u domestikovaných kmenů jako globální regulátor během přechodu z exponenciálního růstu do stacionární fáze (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014). Podrobný popis trojrozměrné struktury obou proteinů (či jejich DBD) v komplexu s příslušnými DNA operátory by měl pomoci objasnit mechanismus, jakým krátká delece v DBD LutR ovlivňuje rozpoznání sekvence operátorové DNA a její vazebnou specificitu. Tato práce se zaměřuje na první část problematiky, a to variantu LutR z divokých kmenů *B. subtilis*.

Konkrétní cíle této diplomové práce byly následující:

- Připravit N-koncovou doménu (DBD) LutR z divokých kmenů *B. subtilis* (LutR₁₋₇₈) rekombinantní expresí v *Escherichia coli*;
- Purifikovat LutR₁₋₇₈ v dostatečném množství a čistotě pro následné funkční a strukturní studie;
- Ověřit vazbu LutR₁₋₇₈ k DNA duplexu odvozenému od sekvence známých operátorů;
- Připravit krystaly LutR₁₋₇₈ v komplexu s DNA vhodné pro rentgenostrukturní analýzu.

4 Materiál a metody

4.1 Bakteriální kmeny

Studovaný protein LutR₂₋₇₈ byl připraven rekombinantní expresí v *Escherichia coli* BL21 (DE3). Jedná se o kmen s DE3 profágem λ , nesoucím gen T7 RNAP pod transkripční kontrolou promotoru p_{lacUV5} (Novagen, USA). Exprese T7 RNAP je indukována přidavkem isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) nebo jeho analogu ethyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidu (ETG) do média. T7 RNAP pak zajišťuje transkripci z T7 promotoru.

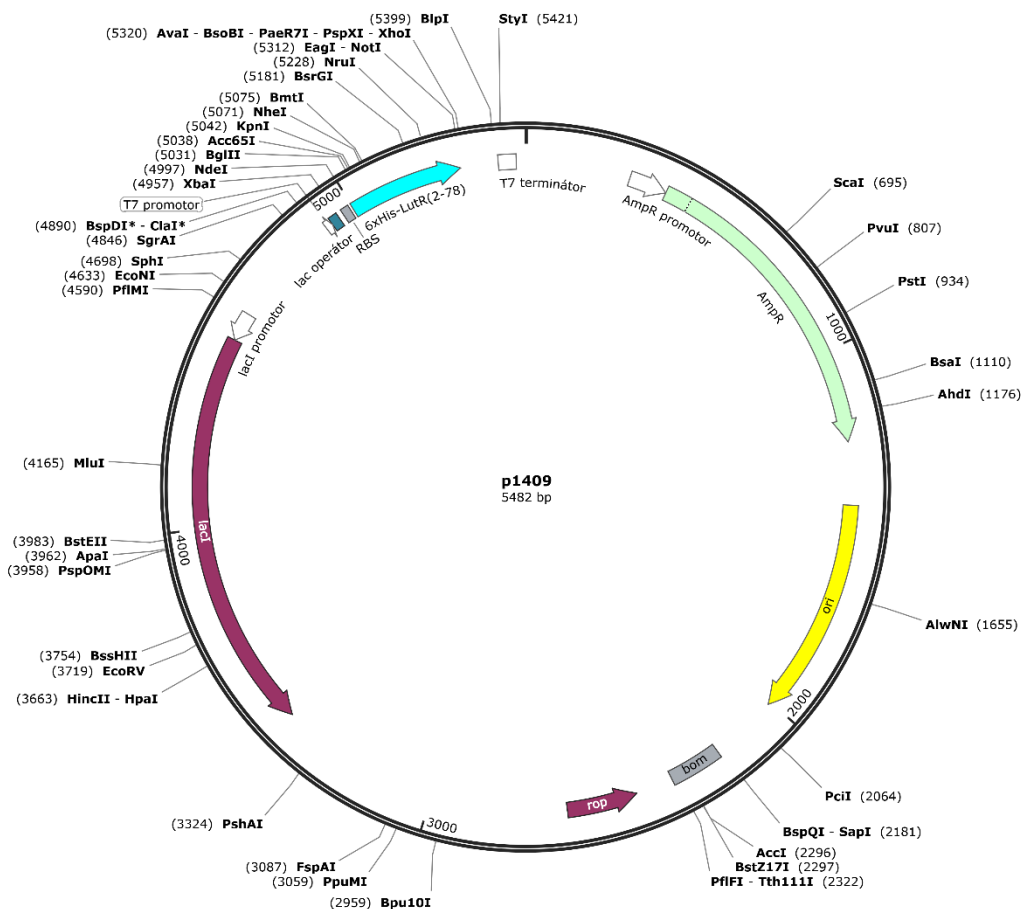
4.2 Plazmidy

Pro přípravu LutR₂₋₇₈ byl použit mnohokopiový expresní plazmid p1409 (Obrázek 10) odvozený od vektoru pMCSG7, který byl původně navržen pro klonování bez použití ligas (Stols *et al.*, 2002). V plazmidu je studovaný gen umístěn pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru (pocházejícího z fága T7). Tento plazmid byl nejprve modifikován tak, aby se za N-koncovou hexahistidinovou (His₆) sekvencí nacházelo štěpící místo pro TEV proteasu (z angl. „Tobacco Etch virus“). Toto štěpící místo následovala sekvence kódující aminokyselinovou sekvencí Ser-Asn-Ala-Ala-Ser, přičemž sekvence kódující Ala-Ser odpovídá místu rozpoznávanému restrikční endonukleasou NheI.

Kódující sekvence pro kratší variantu DBD LutR₂₂₋₇₈ byla získána pomocí PCR z genomové DNA *B. subtilis* kmen 168. Delší varianta kódující navíc 21 N-koncových aminokyselin byla získána tak, že odpovídající DNA fragment (syntetizovaný firmou Sigma-Aldrich, USA) byl předřazen před DNA kódující kratší variantu LutR₂₂₋₇₈. Tato DNA sekvence kódující aminokyselinové zbytky 2-78 delší varianty LutR (bez počátečního N-koncového Met) pak byla do plazmidu vložena pomocí restrikčních enzymů NheI a NotI.

Protein LutR₂₋₇₈ tak byl exprimován s His₆-kotvou na N-konci kódovaného proteinového produktu. Po odstranění His₆-kotvy v následujících purifikačních krocích zůstala na N-konci proteinu LutR₂₋₇₈ aminokyselinová sekvence Ser-Asn-Ala-Ala-Ser.

Plazmid p1409 k přípravě LutR₂₋₇₈ byl připraven a pomocí sekvenace ověřen ve školící laboratoři RNDr. Milanem Fábrym, CSc.



Obrázek 10: Mapa expresního plazmidu použitého pro heterologní expresi *LutR*₂₋₇₈ v *E. coli* BL21 (DE3)

Gen pro *LutR*₂₋₇₈ s fúzní hexahistidinovou kotvou se nachází pod kontrolou T7 promotoru indukovatelného pomocí IPTG nebo jeho analogu ETG. Ve vektoru se též nachází gen pro ampicilinovou rezistenci jako selekční marker.

Obrázek byl připraven v programu SnapGene 6.0.

4.3 DNA operátory

4.3.1 Příprava DNA duplexů

Jednořetězcové oligonukleotidy konkrétních sekvencí byly syntetizovány na objednávku firmou Sigma-Aldrich (USA) a následně rozpuštěny v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5); 100 mmol·l⁻¹ NaCl. Pro vytvoření DNA duplexů byly smíchány oligonukleotidy o komplementární sekvenci v ekvimolárním množství. Hybridizace byla prováděna v termocykléru (MJ Research PTC-200 Thermal Cycler, Bio-Rad, USA) zahřátím směsi na 95 °C po dobu 5 min a následným snižováním teploty na 5 °C v časovém intervalu 1 h. Konečná koncentrace takto připravených duplexů byla ověřena spektrofotometricky měřením absorbance při 260 nm (A_{260nm}) za pokojové teploty na přístroji NanoDrop™ ND-1000

(ThermoFisher Scientific, USA). Pro výpočet koncentrace byly použity teoretické absorpční koeficienty určené pro konkrétní sekvence nástrojem UV Calculator (dostupné na adrese: <http://biophysics.idtdna.com/cgi-bin/uvCalculator.cgi> [cit. 24. 5. 2018]).

4.3.2 Kontrola tvorby DNA duplexů pomocí NMR

Úspěšnost tvorby duplexu byla ověřena pomocí NMR. Jednorozměrná (1D) ^1H spektra byla naměřena při teplotě cca 25 °C (298 K) na spektrometru 850 MHz Bruker AVANCE III (Bruker, Německo) vybaveném kryosondou pro měření jader ^{15}N - ^{13}C - ^1H . Byly měřeny roztoky jednotlivých operátorů o koncentraci 100 – 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ s přídavkem 10% (v/v) deuterované („těžké“) vody (D_2O). Výsledný objem měřeného vzorku v 3 mm NMR kyvetě byl 160 μl . Pro naměření a zpracování všech spekter byl použit program Bruker's TopSpin™ verze 3.2 (Bruker, Německo). NMR byla provedena ve školící laboratoři ve spolupráci s Mgr. Pavlem Srbem, Ph.D.

4.4 Příprava rekombinantního proteinu LutR₂₋₇₈

4.4.1 Heterologní exprese LutR₂₋₇₈

4.4.1.1 Transformace kompetentních buněk

Kompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3) byly transformovány příslušným plazmidem metodou teplotního šoku. Bakteriální suspenze o objemu 100 μl a optické hustotě při 550 nm ($\text{OD}_{550\text{nm}}$) rovné přibližně 0,2 byla smíchána s 1 μl plazmidové DNA (cca 50 – 100 ng) a inkubována na ledu po dobu 30 min ve vodní lázni (42 °C) po dobu 90 s a následně opět na ledu 2 min. Takto ošetřenou bakteriální suspenzí bylo zaočkováno 900 μl Luria-Bertani (LB) média (20 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ LB bujón typu Lennox, Sigma-Aldrich, USA) a kultura byla inkubována 1 h při 37 °C za kontinuálního třepání (150 ot./min). Po inkubaci byla suspenze v objemu 300 μl rozetřena na agarové plotny (průměr 20 cm) s obsahem 150 ml živného agaru, D-glukosy (1 % (w/v)) a selekčního markeru ampicilinu (0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

4.4.1.2 Kultivace bakteriálních kultur

Pro expresi nativního LutR₂₋₇₈ byly narostlé buněčné kolonie z plotny smyty 10 ml LB média s přídavkem ampicilinu (0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* (Amersham Biosciences, Velká Británie) byla změřena $\text{OD}_{550\text{nm}}$ suspenze. Touto suspenzí pak bylo

zaočkováno 500 ml LB média s přidavkem glycerolu (0,4 % (v/v)) a ampicilinu (0,1 mg·ml⁻¹) tak, aby výsledná OD_{550nm} byla 0,1.

Pro expresi ¹⁵N izotopově značeného LutR₂₋₇₈ pro NMR experimenty byly bakteriální kolonie narostlé přes noc z plotny smyty přibližně 10 ml minimálního média (přesné složení uvedeno v Tabulce 1) obohaceného izotopem ¹⁵N (1 g·l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, ¹⁵N₂, 99%, Cambridge Isotope Laboratories, USA) s přidavkem ampicilinu (0,1 mg·ml⁻¹). Po změření OD_{550nm} na spektrofotometru Ultrospec 3100*pro* byla tato suspenze použita pro zaočkování 500 ml minimálního média ampicilinem (0,1 mg·ml⁻¹) tak, aby výsledná OD_{550nm} byla 0,05.

Tabulka 1: Složení minimálního média použitého pro přípravu ¹⁵N izotopově obohaceného LutR₂₋₇₈

Chemikálie	Koncentrace
glukosa	0,4 % (w/v)
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	17,16 g·l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	3 g·l ⁻¹
NaCl	0,5 g·l ⁻¹
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	96,5 mg·l ⁻¹
EDTA	50 mg·l ⁻¹
MnCl ₂	16 mg·l ⁻¹
FeCl ₂ ·6H ₂ O	8 mg·l ⁻¹
ZnCl ₂	0,5 mg·l ⁻¹
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,185 mg·l ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,1 mg·l ⁻¹
MgSO ₄	60,25 mg·l ⁻¹
CaCl ₂ ·2H ₂ O	22 mg·l ⁻¹
biotin	0,5 mg·l ⁻¹
thiamin	0,5 mg·l ⁻¹

Bakteriální kultury byly za kontinuálního třepání (200 ot./min) inkubovány při 37 °C. Růst kultury byl sledován měřením OD_{550nm} každou hodinu. Jakmile OD_{550nm} dosáhla hodnoty přibližně 1,0, byly kultury přesunuty do inkubátoru vychlazeného na 20 °C a za kontinuálního třepání (200 ot./min) ponechány temperovat. Po vychlazení byla přidavkem ETG (finální koncentrace 0,1 mmol·l⁻¹; laskavě poskytnut Janem Ježkem, ÚOCHB AV ČR, v. v. i.) indukována exprese rekombinantních genů. Kultivace dále pokračovala při 20 °C a 200 ot./min přes noc, tedy přibližně 14 h. Následující den byla ukončena centrifugací (4000 ot./min, 20 min,

4 °C, centrifuga Sorvall RC-3B, rotor H 4000, ThermoFisher Scientific, USA) a získaná biomasa byla zvážena a zamražena (-20 °C).

4.4.2 Izolace LutR₂₋₇₈

Po rozmražení byla biomasa resuspendována v lyzačním pufru (50 mmol·l⁻¹ Tris pH (7,5), 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 5 mmol·l⁻¹ imidazol, 5 % (v/v) glycerol; přibližně 10 ml pufru na 1 g biomasy) s přidáním inhibitory proteas bez obsahu EDTA (cOmplete™ EDTA free protein inhibitor cocktail tablets (Roche, Švýcarsko), 1 tableta na 50 ml pufru). Suspenze byla homogenizována a následně na ledu lyzována sonikací sonikátorem Sonic Dismembrator (Dynatech, Německo) při výkonu 60 %. Lyzát byl centrifugací (14000 ot./min, 30 min, 4 °C, centrifuga Avanti J-E, rotor JA-14, Beckman Coulter, USA) rozdělen na rozpustnou a nerozpustnou část. Peleta byla po odebrání kontrolního vzorku pro SDS-PAGE zamražena a supernatant byl dále použit pro izolaci a purifikaci proteinů.

4.4.3 Purifikace LutR₂₋₇₈

4.4.3.1 Chelatační chromatografie

Rekombinantní protein LutR₂₋₇₈ obsahoval na N-konci His₆-kotvu, a proto byla pro jeho purifikaci využita chelatační chromatografie na koloně s chromatografickým nosičem Ni-CAM™ HC Resin (Sigma-Aldrich, USA). Objem kolony byl 5 ml a kapacita použitého nosiče přibližně 15 mg purifikovaného proteinu na 1 ml nosiče, předpokládaná kapacita kolony tedy byla cca 75 mg proteinu. Kolona byla promyta destilovanou vodou a ekvilibrována ve vazebném pufru (50 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 5 mmol·l⁻¹ imidazol, 5 % (v/v) glycerol). Poté byl na ni nanesen vzorek, přičemž byla jímána proteklá frakce. Následovalo promytí vazebným pufrům, který má nízký obsah imidazolu (5 mmol·l⁻¹), a poté promývacím pufrům se středním obsahem imidazolu (50 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 30 mmol·l⁻¹ imidazol, 5 % (v/v) glycerol) za sběru frakcí. Eluce pak byla prováděna elučním pufrům s vysokým obsahem imidazolu (50 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 500 mmol·l⁻¹ NaCl, 250 mmol·l⁻¹ imidazol, 5 % (v/v) glycerol) do frakcí o objemu přibližně 10 ml. Všechny frakce byly uschovány a obsah proteinu v nich byl určen pomocí SDS-PAGE a spektrofotometrie.

Této metody bylo využito v prvním kroku purifikace, kdy byla na kolonu nanášena rozpustná část buněčného lyzátu a dále se pracovalo s eluátem, a v druhém kroku purifikace, kdy

na kolonu byla nanášena směs po štěpení TEV proteasou a dále se pracovalo s proteklou frakcí z této nanášky (viz kapitola 5.1.2).

4.4.3.2 Štěpení TEV proteasou

Pro odštěpení His₆-kotvy z N-konce LutR₂₋₇₈ byl protein inkubován společně s TEV proteasou (EC 3.4.22.44), která obsahuje na N-konci neodštěpitelnou His₆-kotvu (připravena na školícím pracovišti Ing. Irenou Sieglou). Frakce, u nichž byla pomocí SDS-PAGE ověřena přítomnost proteinu, byly spojeny a byla k nim přidána TEV proteasa (tak, aby byla k substrátu v molárním poměru přibližně 1:50). Tato směs byla společně dialyzována přes noc za pokojové teploty proti dialyzačnímu pufru (20 mmol·l⁻¹ Tris pH (7,5); 500 mmol·l⁻¹ NaCl; 5 % (v/v) glycerol). Poté byla míra štěpení zkontrolována pomocí SDS-PAGE analýzy. Pokud byl proteinový produkt dostatečně naštěpen, následovala druhá chelatační chromatografie pro oddělení konečného proteinu od TEV proteasy a od odštěpené His₆-kotvy.

4.4.3.3 Analýza obsahu proteinů pomocí SDS-PAGE

Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (z angl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE; Shapiro *et al.*, 1967) byla prováděna podle Laemmliho (Laemmli, 1970) na aparatuře Mighty Small II SE 250 (Hofer Scientific Instruments, USA) s rozměry deskových gelů 80×70×0,75 mm a zdrojem napětí EV243 (Consort, Belgie). Dělicí gel obsahoval 17,5% (w/v) akrylamid (AA) a N,N'-metylen-bis-akrylamid (BIS) v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; 375 mmol·l⁻¹ Tris (pH 8,8); 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný pro iniciaci polymerace. Zaostřovací gel obsahoval 5% (w/v) AA a BIS ve stejném poměru jako dělicí gel; 125 mmol·l⁻¹ Tris (pH 6,8); 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 0,5% (v/v) glycerol; 0,1% (w/v) SDS; 0,1% (v/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný. Elektrodový pufr obsahoval 20 mmol·l⁻¹ Tris pH 8,3; 200 mmol·l⁻¹ glycin a 0,1% (w/v) SDS.

Kapalné vzorky proteinu a proteinových směsí byly pro SDS-PAGE analýzy smíchány se vzorkovým pufrem (125 mmol·l⁻¹ Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol; 4% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) bromfenolová modř) v poměru 2:1, vzorky sedimentů (o váze několika µg) byly resuspendovány v 30 µl vzorkového pufru. Všechny vzorky byly poté povařeny přibližně 2 min v termobloku (Benchmark, USA) a krátce centrifugovány (12000×g, 30 s, lab. teplota; centrifuga MiniSpin, (Eppendorf, Německo)) Následně byly vzorky nanášeny do jamek zaostřovacího gelu. Objem nanášených vzorků byl přizpůsoben předpokládanému množství proteinu ve vzorku.

Elektroforéza byla prováděna za laboratorní teploty při napětí 95 V na zaostřovací gel a 180 V na dělicí gel. Jako standard MW byla používána směs proteinů Broad Range (Bio-Rad, USA), obsahující myosin (200 kDa), β -galaktosidasu (116,3 kDa), fosforylasu b (97,4 kDa), sérový albumin (66,2 kDa), ovalbumin (45 kDa), karbonickou anhydrasu (31 kDa), trypsinový inhibitor (21,5 kDa), lysozym (14,4 kDa) a aprotinin (6,5 kDa).

Barvení Coomassie Brilliant Blue

K vizualizaci proteinů z rozbitých buněk, u nichž se předpokládá vyšší koncentrace, bylo využito barvení gelu pomocí 0,05% (w/v) roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Německo) v 45% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyselině octové. Gel byl do roztoku ponořen na 20 min a následně byl odbarven v roztoku 25% (v/v) methanolu a 10% (v/v) kyseliny octové.

Barvení stříbrem

Pro detekci a vizualizaci separovaných proteinů o nižších koncentracích byly gely obarveny stříbrem. Nejprve byly proteiny v gelu fixovány máčením v roztoku 12% (v/v) kyseliny octové, 50% (v/v) methanolu a 0,05% (v/v) formaldehydu 1 hod při pokojové teplotě za stálého míchání. Následně byl gel omýván 50% (v/v) methanolem třikrát po dobu 10 min, poté 20 s roztokem thiosíranu sodného ($0,8 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a pak byl opláchnut destilovanou vodou třikrát po dobu asi 20 s. Po inkubaci v impregnačním roztoku (12 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dusičnan stříbrný; 0,075% (v/v) formaldehyd; 20 min) byl gel několikrát důkladně opláchnut destilovanou vodou. Vizualizace byla provedena pomocí vyvolávacího roztoku (570 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ uhličitan sodný; 0,05% (v/v) formaldehyd; 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ thiosíran sodný). Po vybarvení gelu byl proces zastaven roztokem 12% (v/v) kyseliny octové a 50% (v/v) methanolu. Před sušením byl gel uchováván v 50% (v/v) methanolu ve 4 °C.

Sušení gelů

Pro dokumentační účely byly gely spolu s přírodním celofánem 20 min máčeny v sušicím roztoku 20% (v/v) ethanolu a 3% (v/v) glycerolu a sušeny v celofánu napnutém v sušicím rámečku.

4.4.3.4 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinových roztoků byla určována pomocí měření absorbance při vlnové délce 280 nm ($A_{280\text{nm}}$) za pokojové teploty na přístroji NanoDrop™ ND-1000 (ThermoFisher Scientific, USA). Extinkční koeficient pro určení koncentrace proteinu byl stanoven empiricky – výpočtem ze známé absorbance pro vzorek, jehož přesná koncentrace byla stanovena pomocí aminokyselinové analýzy založené na iontoměničové kapalinové chromatografii (Spackman *et al.*, 1958) provedené Ing. Radko Součkem v servisní laboratoři školícího pracoviště. Hodnota absorpčního koeficientu LutR_{2-78} při 280 nm je pro výpočet koncentrace $0,411 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4.4.3.5 Dialýza a ultrafiltrace

Dialyzační kroky probíhaly v dialyzační membráně o mezní velikosti pórů 3500 Da pro globulární proteiny (Sigma-Aldrich, USA) proti příslušným pufrům za stálého míchání magnetickým míchadlem při 4 °C. Po ukončení dialýzy byly vždy proteinové roztoky centrifugovány ($21000 \times g$, 4 °C; pro větší objemy centrifuga Hermle Z 323 K (Hermle LaborTechnik, Německo) a centrifuga Hettich EBA 12R (Hettich, Německo) pro menší objemy) pro odstranění případných agregátů.

Po rozdělení produktů štěpení TEV proteasou byl protein dialyzován proti skladovacímu pufru ($20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5), $250 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl, $5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ β -merkapt ethanol) při 4 °C. Následně byl proteinový roztok zahušťován ultrafiltrací za použití membrány o mezní velikosti pórů 3000 Da pro globulární proteiny (Millipore, USA). Roztoky o větším objemu byly zahušťovány v celách Amicon Ultra ($5000 \times g$, 4 °C; centrifuga Hermle Z 323 K), roztoky o menším objemu v celách Microcon ($12000 \times g$, 4 °C; centrifuga Hettich EBA 12 R). Takto zahuštěný roztok purifikovaného proteinu byl rozdělen na menší alikvoty a skladován v -80 °C.

4.5 Biochemická charakterizace LutR_{2-78} a testování vazby DNA

4.5.1 Gelová retardační analýza (EMSA)

Pro ověření vazby LutR_{2-78} a prvního navrženého DNA duplexu byla použita gelová retardační analýza neboli EMSA (Hellman a Fried, 2007). Ta byla prováděna na elektroforetické aparatuře Mighty Small II SE 250 s rozměry deskových gelů $80 \times 70 \times 0,75$ mm za nativních podmínek při napětí 85 V při teplotě 4 °C. Gely byly připraveny z 15% nebo 17% (w/v) směsi AA a BIS v hmotnostním poměru BIS:AA 1:29; TBE pufru ($44,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Tris, (pH 7,8); $44,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselina boritá; $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA); 0,1% (w/v) TEMED a 0,1% (w/v) persíran amonný. Na gel

byly naneseny vzorky směsi příslušné DNA a LutR₂₋₇₈ v různém molárním poměru, kdy finální koncentrace DNA byla vždy 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, spolu s vazebným pufrům (10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5); 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA; 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl; 0,01 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ BSA) a bromfenolovou modří v 5% (v/v) glycerolu. Elektroforéza byla ukončena po přibližně 2,5 h. Gely byly následně 10 min barveny ve fluorescenčním barvivu GelRed[™] a poté byla pod UV lampou pozorována obarvená DNA. Pro delší vizuální sledování výsledných gelů bylo využito excitace zářením o vlnové délce 365 nm, při které dochází k pomalejšímu vysvěcování fluorescenčního barviva, ale intenzita fluorescence je nižší. Poté byla vlnová délka změněna na 312 nm, při které je intenzita fluorescence barviva vyšší, zároveň však výrazně rychleji vyhasíná. Proto bylo této vlnové délky využito pouze pro účely pořízení fotografie gelů. Další analýza a vyhodnocování pak probíhalo z pořízených snímků.

4.5.2 Analytická gelová permeační chromatografie (SEC)

Pro zjištění kvartérní struktury LutR₂₋₇₈ a jako další způsob ověření vazby LutR₂₋₇₈ a prvního navrženého DNA duplexu byla provedena analytická gelová permeační chromatografie (SEC, z angl. „Size Exclusion Chromatography“). Pro analýzu byla použita kolona vhodná k dělení globulárních proteinů o rozmezí MW 10-600 kDa (Superdex 200 10/300 GL Tricorn o objemu 23 ml, Amersham Biosciences, Velká Británie) na FPLC aparatuře Äkta Basic (Amersham Biosciences, Velká Británie). Kolona byla dle pokynů výrobce nejprve kalibrována roztokem standardů MW (Sigma-Aldrich, USA) obsahujícím tyto proteiny: aprotinin (6,5 kDa), cytochrom C (12,4 kDa), karbonická anhydrasa (29 kDa), hovězí sérový albumin (66 kDa) a dextran blue (2 MDa). Jako mobilní fáze pro kalibraci kolony byl použit filtrovaný a odvzdušněný pufr o složení: 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5); 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl. Na základě této kalibrační křivky byla z elučního objemu příslušných frakcí určena přibližná MW dané formy proteinu a jeho komplexu s DNA. Jako mobilní fáze byl použit filtrovaný a odvzdušněný pufr PBS (pH 7,4). Dle doporučení výrobce kolony byl průtok nastaven na 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (maximální povolený tlak 1,5 MPa). Eluční profil vzorku byl sledován spektrofotomericky při vlnových délkách 220 nm, 260 nm a 280 nm.

4.6 Strukturní charakterizace LutR₂₋₇₈ a jeho vazby DNA

4.6.1 NMR spektroskopie

Pro rychlé a materiálově nenáročné ověření kvality vazby LutR₂₋₇₈ a různých DNA duplexů bylo prováděno NMR spektroskopické měření s použitím ¹⁵N izotopově obohaceného proteinu. Všechna NMR spektra (1D ¹H i dvojrozměrných (2D) ¹⁵N-¹H) byla naměřena při teplotě cca 25 °C (298 K) na přístroji 850 MHz Bruker AVANCE III spektrometr (Bruker, Německo), který je vybavený kryosondou na měření jader ¹⁵N-¹³C-¹H. Byly měřeny roztoky LutR₂₋₇₈ a jednotlivých DNA duplexů v molárním poměru 2:1,2, kdy koncentrace proteinu byla nejčastěji 200 μmol·l⁻¹ a koncentrace DNA duplexu 120 μmol·l⁻¹. Výsledný objem měřeného vzorku s přídavkem 10% (v/v) D₂O v 3 mm NMR kyvetě byl 160 μl. Pro naměření a zpracování všech spekter byl použit program Bruker's TopSpin™ verze 3.2 (Bruker, Německo). Data byla snímána ve spolupráci s Mgr. Pavlem Srbem, Ph.D.

4.6.2 Krystalizace a rentgenová krystalografie

4.6.2.1 Příprava krystalů vhodných pro rentgenostrukturní analýzu

Pro krystalizaci LutR₂₋₇₈ v komplexu s DNA duplexem byla použita metoda difúze par v provedení sedící nebo visící kapky (shrnuo v Dessau a Modis, 2011). Krystalizační pokusy probíhaly při teplotě 18 °C nebo 4 °C. Průběh krystalizace byl sledován pomocí optických mikroskopů Nikon SMZ660 (Nikon, Japonsko) a Olympus SZX10 (Olympus, Japonsko), krystalizační kapky byly fotografovány pomocí fotoaparátů Nikon Coolpix P6000 (Nikon, Japonsko) a Olympus E620 (Olympus, Japonsko; software QuickPHOTO CAMERA 2.3, PROMICRA, Česká republika). Sledování úvodních krystalizačních experimentů probíhalo automaticky v zařízení pro automatické monitorování krystalizačních experimentů CrystalMation™ (Minstrel Desktop Crystal Imaging System; Rigaku, Japonsko), které zaznamenávalo průběh krystalizace v jednotlivých kapkách v pravidelných časových intervalech ve viditelném a UV světle.

Metoda sedící kapky

K nalezení vhodných výchozích podmínek pro krystalizaci LutR₂₋₇₈ v komplexu s DNA byla použita metoda sedící kapky. Směs proteinu a DNA duplexu byla připravena v molárním poměru 2:1,2 a krátce před nasazením inkubována na ledu. Výsledná hmotnostní koncentrace proteinu v takovéto směsi byla obvykle 11,3 až 14,4 mg·ml⁻¹. Kapky o celkovém objemu 300 nl

byly nasazeny na 3x96-jamkovou destičku Intelli-plate (Art Robbins Instruments, USA) pomocí krystalizačního robota Oryx (Douglas Instruments, Velká Británie). Precipitační roztoky byly nanášeny do rezervoáru pomocí krystalizačního robota Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments, USA), objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 30 μl . Roztok proteinu byl v jednotlivých kapkách smíchán s různými precipitačními roztoky v poměrech 1:2, 1:1 nebo 2:1 (v/v). Pro krystalizaci byly použity komerční sady precipitačních roztoků Nucleix Suite (Qiagen, USA) a Morpheus[®] (Molecular Dimensions, USA). Po nasazení kapek byla destička překryta fólií Greiner VIEWseal (Jena Bioscience, Německo) a uložena do zařízení pro automatické monitorování krystalizačních experimentů CrystalMation[™].

Metoda visící kapky

Vybrané krystalizační podmínky z komerčního kitu Morpheus[®] byly dále optimalizovány za použití metody visící kapky. Kapky byly ručně nasazovány na 15jamkové destičky EasyXtal Tool (Qiagen, USA) nebo 48jamkové destičky VDX (Hampton Research, USA). Komplex proteinu s DNA (připravený v molárním poměru 2:1,2) byl smíchán s krystalizačními podmínkami v poměrech 1:2, 1:1 nebo 2:1 (v/v). Celkové objemy kapek se pohybovaly od 1 μl do 1,5 μl . Objem krystalizačního roztoku v rezervoáru destiček EasyXtal Tool byl 200 μl , u destiček VDX48 50 – 150 μl . V některých případech byl precipitační roztok v rezervoáru destičky EasyXtal Tool překryt 150 μl tzv. Alova oleje (směsí parafinového a silikonového oleje v poměru 1:1 (v/v); D'Arcy *et al.*, 1996) pro zpomalení difúze par (Chayen, 1997). Pro dosažení optimálního růstu krystalů se měnily různé parametry krystalizace. Jedním ze způsobů optimalizace bylo krokové snižování koncentrace proteinu a DNA v jednotlivých kapkách se zachováním jejich molárního poměru 2:1,2, kdy se hmotnostní koncentrace proteinu pohybovala od 11,3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ do 7,9 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. V některých případech byla naopak ředěna MilliQ vodou krystalizační podmínka, která byla použita v koncentraci 100-70 % (v/v) oproti původnímu roztoku. Další krystalizační experimenty byly uskutečněny s roztoky připravenými na základě úspěšných podmínek z komerčního kitu Morpheus[®] tak, že složením precipitantů a pufrčních systémů byly shodné, ale byla vynechána směs aditiv. Pro řešení fázového problému byly některé krystaly kokrystalizovány s přísadkou 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaI nebo máčeny spolu s krystaly Ta₂Br₁₀ před jejich vylovením.

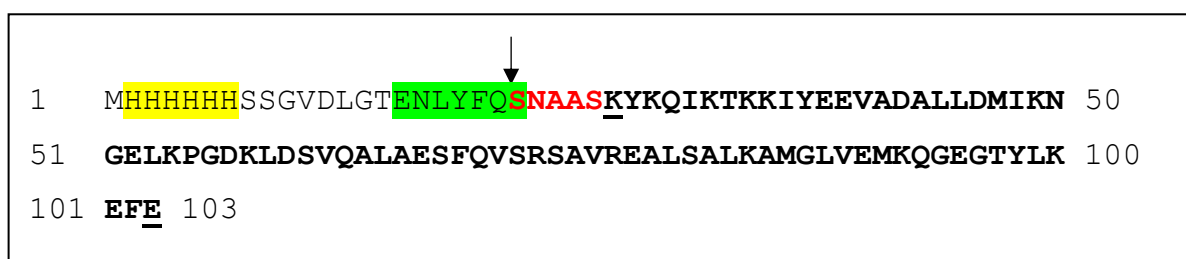
4.6.2.2 Difrakční analýza krystalů

Vybrané krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzu byly uchyceny do nylonové smyčky, v případě potřeby krátce ponořeny do vhodného roztoku obsahující kryoprotektant, jehož složení se odvíjelo od složení krystalizační podmínky, a následně byly zamraženy v tekutém dusíku. Difrakční měření krystalů bylo prováděno za teploty $-173,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ (100 K) na domácím zdroji rentgenového (RTG) záření Rigaku HF007 (Rigaku, Japonsko) nebo na synchrotronu (BL 14.1, BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), Německo; Mueller *et al.*, 2015), kde také probíhal sběr kompletní sady difrakčních dat. Sběr a zpracování difrakčních dat byly provedeny školitelkou diplomové práce doc. RNDr. Pavlínou Malou Řezáčovou, Ph.D.

5 Výsledky

5.1 Příprava LutR₂₋₇₈ heterologní exprese v *E. coli*

Gen pro heterologní expresi N-koncové domény LutR z divokých kmenů *B. subtilis* kódoval protein, jenž byl dlouhý celkem 103 aminokyselin a před sekvencí rozpoznávanou TEV proteasou se na jejím N-konci nacházela His₆-kotva pro purifikaci afinitní chromatografií. Po odštěpení této části TEV proteasou zůstala sekvence o délce 82 aminokyselin a kromě 77 aminokyselin kódujících samotný LutR₂₋₇₈, obsahovala sekvenci o délce 5 aminokyselin (Ser-Asn-Ala-Ala-Ser) na jeho N-konci (Obrázek 11). Hranice této N-koncové domény na C-konci byla v rámci celého proteinu určena na základě sekvenční homologie a následné predikce výskytu konzervované DBD.



Obrázek 11: Primární sekvence použitého konstruktů pro heterologní expresi LutR₂₋₇₈. Žlutě je označena His₆-kotva, zeleně sekvence rozpoznávaná TEV proteasou a šipkou pak přesné místo štěpení. Tučně je zvýrazněn konečný produkt používaný v dalších experimentech – vlastní primární sekvence LutR₂₋₇₈ dlouhá 77 aminokyselin s podtrženým začátkem a koncem (černý text) a sekvence Ser-Asn-Ala-Ala-Ser na N-konci proteinu dlouhá 5 aminokyselin (červený text).

5.1.1 Heterologní exprese LutR₂₋₇₈

Pro přípravu rekombinantního LutR₂₋₇₈ byl využit heterologní expresní systém *E. coli*, kmen BL21 (DE3). Protein byl exprimován z mnohokopiového expresního plazmidu, v němž byl gen pod kontrolou indukovatelného T7 promotoru pocházejícího z fága T7. Hostitelský kmen pak obsahoval gen pro T7 RNA polymerasu, jejíž exprese byla indukována přidávkem ETG do média v exponenciální fázi růstu bakteriální kultury. Tato polymeráza následně zajistila transkripci z T7 promotoru. Pro expresi LutR₂₋₇₈ byly použity dva typy médií – LB médium pro přípravu nativního proteinu a izotopově obohacené minimální médium pro přípravu proteinu značeného ¹⁵N. Přesné podmínky kultivace bakterií a indukce exprese jsou popsány v kapitole 4.4.1. Výtěžek vlhké biomasy byl 12,5 g na 1 l bakteriální kultury pěstované v LB médiu a 7,6 g na 1 l bakteriální kultury pěstované v minimálním médiu s izotopově značeným ¹⁵N.

5.1.2 Izolace a purifikace LutR₂₋₇₈

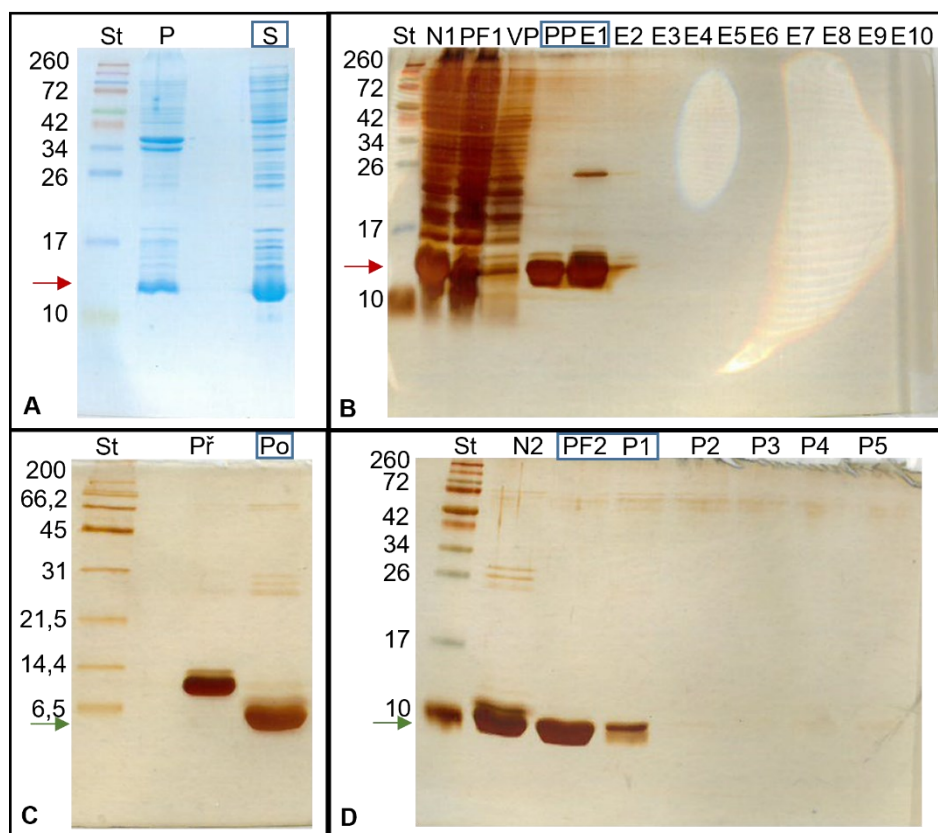
Postup izolace a purifikace proteinu vycházel ze standardní procedury, která se ve školící laboratoři používá pro přípravu proteinů, a byl stejný pro LutR₂₋₇₈ neznačený i ¹⁵N-značený. Tento postup je podrobně popsán v kapitolách 4.4.2 a 4.4.3. Proces izolace a purifikace proteinu byl sledován po každém jednotlivém kroku pomocí SDS-PAGE (kapitola 4.4.3.3). Typický průběh tohoto procesu je znázorněn na Obrázku 12, který ukazuje gely dokumentující izolaci a purifikaci nativního LutR₂₋₇₈.

Protein k purifikaci byl z bakteriální kultury získán dezintegrací buněk a oddělením rozpustné a nerozpustné složky buněčného lyzátu pomocí centrifugace. Tyto složky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 12A; postup přípravy vzorků uveden v kapitole 4.4.3.3). Ta ukázala, že se rekombinantní LutR₂₋₇₈ ve fúzi s His₆-kotvou o celkové MW přibližně 11,5 kDa nacházel v obou těchto frakcích. V solubilní části lyzátu se ho však nacházelo více (na Obrázku 12A poloha v gelu označena červenou šipkou), a proto byla tato frakce dále použita pro purifikaci proteinu.

Jako první purifikační krok byla použita chelatační chromatografie na nosiči Ni-CAMTM HC Resin. Protein se díky přítomnosti His₆-kotvy na N-konci proteinu zachytil na koloně a byl následně z kolony eluován pufrý s vysokou koncentrací imidazolu (50 a 250 mmol·l⁻¹). Obsah proteinu v jednotlivých frakcích byl vizualizován pomocí SDS-PAGE (Obrázek 12B, příprava vzorků popsána v kapitole 4.4.3.3). Ukázalo se, že protein byl přítomen ve velkém množství ve frakci z promytí kolony pufrým se středním obsahem imidazolu (50 mmol·l⁻¹) a v první frakci eluce pufrým s vysokým obsahem imidazolu (250 mmol·l⁻¹). Tyto dvě frakce byly použity pro další kroky purifikace (na Obrázku 12B označeny modrým obdélníkem).

Pro odštěpení His₆-kotvy byly frakce proteinu inkubovány s TEV proteasou. Následná SDS-PAGE analýza potvrdila úspěšnost štěpení (Obrázek 12C; příprava vzorků popsána v kapitole 4.4.3.3). Výsledný protein o MW přibližně 9 kDa (na obrázku 12C označeno zelenou šipkou) byl purifikován v závěrečném kroku purifikace. Tím byla druhá chelatační chromatografie na nosiči Ni-CAMTM HC Resin, při které se na koloně zachytila odštěpená His₆-kotva, TEV proteasa s neodštěpitelnou His₆-kotvou a případné další znečišťující proteiny, které nebyly odděleny v prvním kroku purifikace. SDS-PAGE analýza tohoto kroku ukázala, že LutR₂₋₇₈ se nacházel v proteklé frakci a v první frakci z promytí kolony vazebným pufrým s velmi nízkým obsahem imidazolu (5 mmol·l⁻¹; Obrázek 12D; příprava vzorků popsána

v kapitole 4.4.3.3). Obě frakce obsahovaly protein v dostatečném množství a čistotě, byly proto spojeny a převedeny do skladovacího pufru pro další použití.



Obrázek 12: Typický průběh izolace a purifikace *LutR₂₋₇₈* monitorovaný pomocí 17,5% (w/v) polyakrylamidových gelů z SDS-PAGE analýz

(A) Izolace proteinu z rozbitých buněk *E. coli* BL21 (DE3) – sledování obsahu proteinu v rozpustné (S) a nerozpustné (P) frakci (barveno pomocí Coomassie Blue); (B) první purifikační krok – chelatační chromatografie na Ni-CAM™ HC Resin a sledování obsahu a čistoty proteinu v jednotlivých frakcích (barveno stříbrem); (C) odštěpení hexahistidinové kotvy pomocí TEV proteasy – sledování úspěšnosti štěpení (barveno stříbrem); (D) finální purifikační krok – druhá chelatační chromatografie na Ni-CAM™ HC Resin, sledování obsahu proteinu v jednotlivých frakcích a ověření konečné čistoty proteinu (barveno stříbrem). Červenými šipkami je označena poloha v gelu pro *LutR₂₋₇₈* před štěpením TEV proteasou, zelenými šipkami pro *LutR₂₋₇₈* po štěpení TEV proteasou. Modře jsou ohraničeny frakce, které byly použity v dalších krocích purifikace. Vysvětlivky zkratk (seřazeno podle výskytu): St (8 μ l) – standard molekulových hmotností [kDa]; P (3 μ l) – peleta z rozbitých buněk (nerozpustná frakce izolace); S (3 μ l) – supernatant z rozbitých buněk (rozpustná frakce izolace); N1 (3 μ l) – nanáška na kolonu 1; PF1 (3 μ l) – proteklá frakce z nanášky na kolonu 1; VP (6 μ l) – frakce (40 ml) z promytí kolony vazebným pufrem s nízkým obsahem imidazolu (5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$); PP (6 μ l) – frakce (50 ml) z promytí kolony pufrem se středním obsahem imidazolu (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$); E1-E10 (6 μ l) – frakce (po 10 ml) eluované z kolony pufrem s vysokým obsahem imidazolu (250 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$); P \check{r} (6 μ l) – vzorek proteinu před štěpením TEV proteasou; P o (6 μ l) – vzorek proteinu po štěpení TEV proteasou; N2 (6 μ l) – nanáška na kolonu 2; PF2 (6 μ l) – proteklá frakce z nanášky na kolonu 2; P1-P5 (6 μ l) – frakce (10 ml) z promývání kolony pufrem s nízkým obsahem imidazolu (5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Takto purifikovaný protein byl využit pro určení empirického absorpčního koeficientu, který byl dále používán pro určení koncentrace. Koncentrace proteinu byla s použitím tohoto absorpčního koeficientu stanovována podle měření hodnoty $A_{280\text{nm}}$. V proteinech je za absorpci při této vlnové délce zodpovědná především aromatická aminokyselina tryptofan. Primární sekvence LutR₂₋₇₈ však tuto aminokyselinu neobsahuje (viz Obrázek 11), což může mít za následek nepřesnost při určování koncentrace za použití teoretického absorpčního koeficientu podle aminokyselinového složení nástrojem ProtParam (dostupné z: <http://web.expasy.org/protparam/> [cit. 20. 5. 2017]). Z tohoto důvodu byl absorpční koeficient pro LutR₂₋₇₈ stanoven experimentálně výpočtem z absorbance vzorku o známé koncentraci. Přesná koncentrace proteinu ve vzorku byla zjištěna pomocí aminokyselinové analýzy (podrobnosti popsány v kapitole 4.4.3.4) v servisní laboratoři školícího pracoviště. Výsledná hodnota empirického absorpčního koeficientu byla $0,411 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, což je přibližně o 17 % méně než absorpční koeficient určený nástrojem ProtParam ($0,495 \text{ ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Výtěžek proteinu po purifikaci byl 53,9 mg na 1 l bakteriální kultury (4,3 mg na 1 g vlhké biomasy) pro nativní protein a 22,3 mg na 1 l bakteriální kultury (2,9 mg na 1 g vlhké biomasy) pro ¹⁵N izotopově značený protein. Čistota dle analýzy vzorku na SDS PAGE barvené stříbrem byla > 95 % (Obrázek 12D).

Výtěžek i čistota proteinu byly dostačující pro následnou funkční a strukturní analýzu. Protein byl skladován v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 250 mmol·l⁻¹ NaCl a 5 mmol·l⁻¹ β-merkapt ethanol při teplotě -70 °C v koncentracích 0,74 – 31,4 mg·ml⁻¹.

5.2 Návrh a příprava DNA duplexů

5.2.1 Návrh DNA sekvencí pro studium vazby a krystalizaci s LutR₂₋₇₈

Pro testování vazby LutR₂₋₇₈ na DNA byl navržen prvotní DNA duplex O₁₅ o délce 15 párů bazí a sekvenci 5'-GGTCATCAGATGACC-3'. Ta vycházela ze zjištěné sekvence DNA operátoru pro LutR z divokých kmenů *B. subtilis* podle Chiu *et al.* (2014).

Pro krystalizaci komplexu LutR₂₋₇₈ a DNA byla navržena řada dalších DNA duplexů. První návrhy OA₂₁ (5'-TCCAGTCATCAGATGATCATA-3') a ON₁₆ (5'-TAGTCATCAGATGATA-3') byly inspirovány úspěšně zkrystalizovanými protein-DNA komplexy příbuzných proteinů AraR (repressor genů pro využití L-arabiny; Jain a Nair, 2013) a NagR (repressor genů pro využití N-acetyl-D-glukosaminu; Fillenberg *et al.*, 2015), přičemž

přesný postup návrhu je popsán v kapitole 5.4.1. Následný návrh DNA duplexů pak vycházel z průběžných výsledků krystalizačních a difrakčních experimentů. Tento proces je detailně popsán v kapitolách 5.4.2 a 5.4.3.

Sekvence všech DNA duplexů používaných v této práci jsou zobrazeny v Tabulce 2 zarovnané se sekvencí publikovaného operátoru (Chiu *et al.*, 2014). V Tabulce je uvedena sekvence jednoho vlákna, druhé vlákno je vždy komplementární. Označení jednotlivých DNA duplexů bylo v této práci vytvořeno z prvního písmene slova operátor (O), počtu párů bazí v daném duplexu a případně také počátečního písmene proteinu, jehož vyřešenou krystalovou strukturou s DNA byl návrh konkrétního duplexu inspirován (A pro AraR a N pro NagR), popřípadě dále modifikován.

Tabulka 2: Sekvence studovaných DNA duplexů odvozených od sekvence vazebného místa pro *LutR*₁₋₂₄₀

		Sekvence operátoru použitá k návrhu DNA duplexů																									
O*	5'-	T	C	A	T	C	N	G	A	T	G	A	-3'														
		Navržené DNA duplexy																									
O ₁₅	5'-	G	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	C	C	-3'										
OA ₂₁	5'-	T	C	C	A	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	C	A	T	A	-3'				
OA ₂₅	5'-	G	C	T	C	C	A	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	C	A	T	A	C	G	-3'
ON ₁₆	5'-	T	A	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	A								-3'		
ON ₂₀	5'-	G	C	T	A	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	A	C	G				-3'		
ON ₂₁	5'-	T	G	C	T	A	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	A	C	G			-3'		
ON ₁₉	5'-	G	C	T	-	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	A	C	G				-3'		
ON ₁₈	5'-	G	C	T	-	G	T	C	A	T	C	A	G	A	T	G	A	T	-	C	G				-3'		

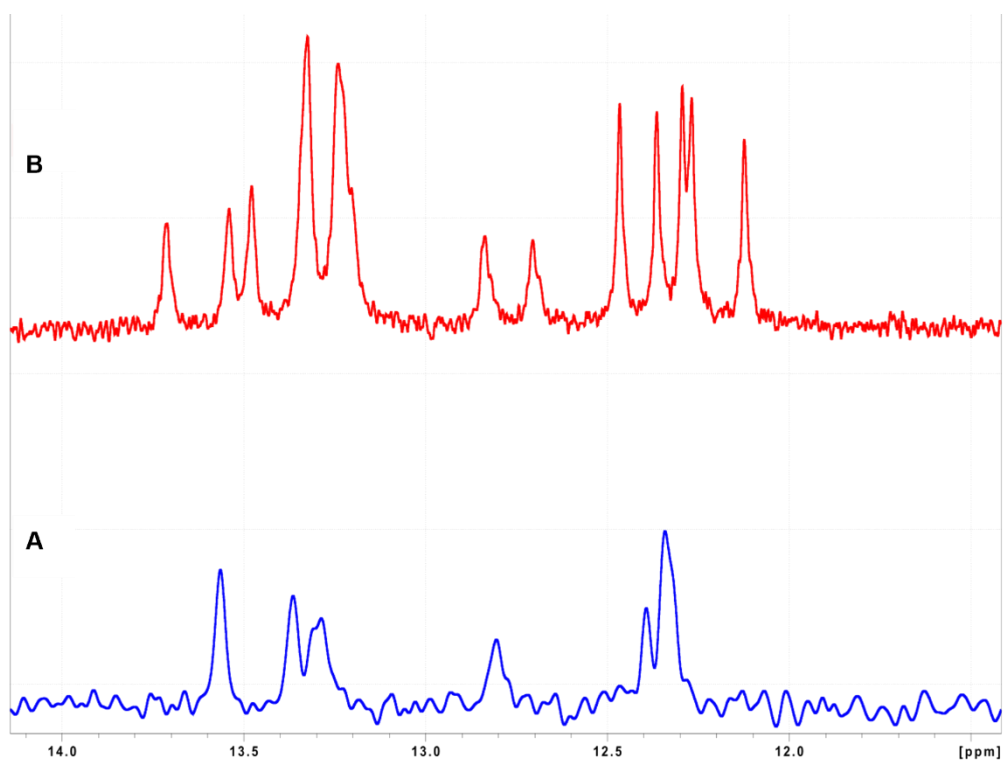
* sekvence operátoru nacházející se v oblasti promotoru genu *lutP* a *lutABC* operonu (Chiu *et al.*, 2014); N značí libovolný nukleotid

5.2.2 *Ověření tvorby DNA duplexů pomocí NMR spektroskopie*

K ověření tvorby DNA duplexů byly využívány experimenty NMR spektroskopie. Data byla snímána na spektrometru Bruker Avance III s pracovní ^1H frekvencí 850 MHz vybaveném tříjadernou kryosondou. Přesné parametry měření jsou uvedeny v kapitole 4.3.2.

Na naměřených 1D ^1H NMR spektrech byla sledována především oblast signálů imino protonů vodíkových můstků mezi 12 až 15 ppm. Poměr počtu vrcholů signálů a počtu párů bazí v duplexu a celkový tvar vrcholů signálů pak ukazoval, zda daná dvojice komplementárních DNA oligonukleotidů vytvořila duplex a jestli je tento duplex dostatečně stabilní pro použití v krystalizačních experimentech.

Obrázek 13 ukazuje příklad takových 1D ^1H NMR spekter pro DNA duplexy O₁₅ (Obrázek 13A) a ON₁₉ (Obrázek 13B). DNA duplex O₁₅ o sekvenci 5'-GGTCATCAGATGACC-3' (viz Tabulka 2) a MW přibližně 9,1 kDa byl použit pro první pokusy pro ověření vazby LutR₂₋₇₈ a DNA operátoru. Signály tohoto DNA duplexu jsou širší a méně rozlišitelné, což značí, že daná molekula je dynamická a pravděpodobně v roztoku přechází mezi několika formami (například duplex a vlásenka), a nehodí se tedy pro krystalizační experimenty (Obrázek 13A). Druhý příklad 1D ^1H NMR spektra patří DNA duplexu ON₁₉ o sekvenci 5'-GCTGTCATCAGATGATACG-3', který byl navržen ve třetím kroku optimalizace DNA duplexů pro krystalizaci (viz Tabulka 2 a kapitola 5.4.3). Na tomto spektru jsou signály oproti signálům prvotního duplexu O₁₅ viditelně ostřejší, ačkoliv patří molekule o větší MW (cca 11,6 kDa; Obrázek 13B). Na základě toho lze usuzovat, že DNA duplex ON₁₉ je stabilnější, a proto vhodnější pro krystalizaci.



Obrázek 13: Využití NMR spektroskopie pro ověření tvorby DNA duplexu – srovnání 1D ^1H NMR spekter dvou různých DNA duplexů

Spektra jsou zaměřena na oblast signálů imino protonů Watson-Crickových párů bází, které se objevují mezi 12 až 15 ppm. Spektra byla generována programem TopSpin™ 3.2 (Bruker, Německo) a upravena v programu Inkscape 1.1.1.

(A) 1D ^1H NMR spektrum prvotního DNA duplexu O₁₅ měřené při teplotě přibližně 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 250 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O.

(B) 1D ^1H NMR spektrum DNA duplexu ON₁₉ měřené při teplotě přibližně 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 100 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O.

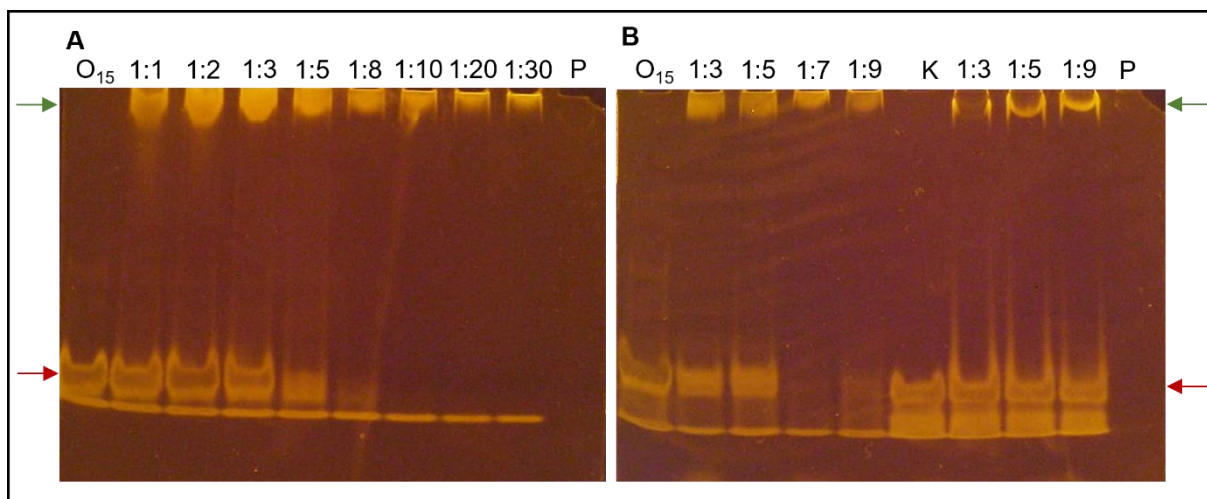
5.3 Analýza vazby LutR₂₋₇₈ a DNA

5.3.1 Studium vazby DNA pomocí gelové retardační analýzy (EMSA)

Pro ověření vazby LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅ byla provedena EMSA. Přesný postup provedení je popsán v kapitole 4.5.1.

Byly testovány různé molární poměry monomeru proteinu k DNA. Jako negativní kontrola byla použita DNA sekvence 5'-GTTGTATATACAAG-3', což je operátor pro příbuzný transkripční represor genů pro využití D-trehalosy TreR (Schöck a Dahl, 1996; Bürklen *et al.*, 1998), který je ve školící laboratoři rovněž studován (Řezáčová *et al.*, 2007). K tomuto DNA duplexu se LutR neváže a neměl by tedy být v gelu pro jejich směs pozorován žádný posun.

Z výsledků analýzy na Obrázku 14 je patrné, že k vazbě LutR₂₋₇₈ na O₁₅ dochází. Ve vzorcích s nižším poměrem molárního přebytku proteinu vůči DNA (na Obrázku 14 dráhy O₁₅ 1:1 až 1:3) nedošlo k výraznému snížení intenzity fluorescence v oblasti mobility DNA ve spodní části gelů (na Obrázku 14 označena červenými šipkami), ale zato je viditelný nárůst fluorescence v horní části gelů, kde je možné předpokládat výskyt komplexu proteinu a DNA (na Obrázku 14 oblast vyznačena zelenými šipkami). Naopak v případě zvyšujícího se molárního přebytku proteinu (na Obrázku 14 dráhy od O₁₅ 1:5 výše) lze pozorovat nižší intenzitu fluorescence až její úplné vymizení v oblasti mobility, což se dá považovat za důkaz toho, že došlo k vyvázání veškeré DNA proteinem. Pro negativní kontrolu (na Obrázku 14B dráhy K 1:3 až 1:9) je pak pozorovatelná mírná fluorescence pozadí, ale žádný posun ani změna v intenzitě fluorescence tak, aby je bylo možné interpretovat jako důkaz vazby.



Obrázek 14: Gelová retardační analýza vazby LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅ s negativní kontrolou

(A) Gelová retardační analýza v 15% (w/v) polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek – byla testována vazba DNA O₁₅ k LutR₂₋₇₈ v různých poměrech molárního přebytku proteinu vůči DNA; (B) gelová retardační analýza v 17% (w/v) polyakrylamidovém gelu za nativních podmínek s negativní kontrolou – byla testována vazba DNA O₁₅ k LutR₂₋₇₈ v různých poměrech přebytku proteinu vůči DNA, jako negativní kontrola byla využita operátorová DNA pro příbuzný transkripční represor TreR (5'-GTTGTATATACAAG-3'). Zelené šipky označují oblast výskytu komplexů protein-DNA a červené šipky oblast, kde se v gelu nachází samotná DNA.

Vysvětlivky zkratk (seřazeno podle výskytu): O₁₅ – samotná operátorová DNA dlouhá 15 párů bází (viz Tabulka 2); 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:20 a 1:30 – molární poměry příslušné DNA k LutR₂₋₇₈ v daném vzorku; P – protein (LutR₂₋₇₈); K – negativní kontrola = samotný DNA duplex vázající se k příbuznému transkripčnímu represoru TreR.

5.3.2 Studium vazby DNA pomocí analytické gelové permeační chromatografie (SEC)

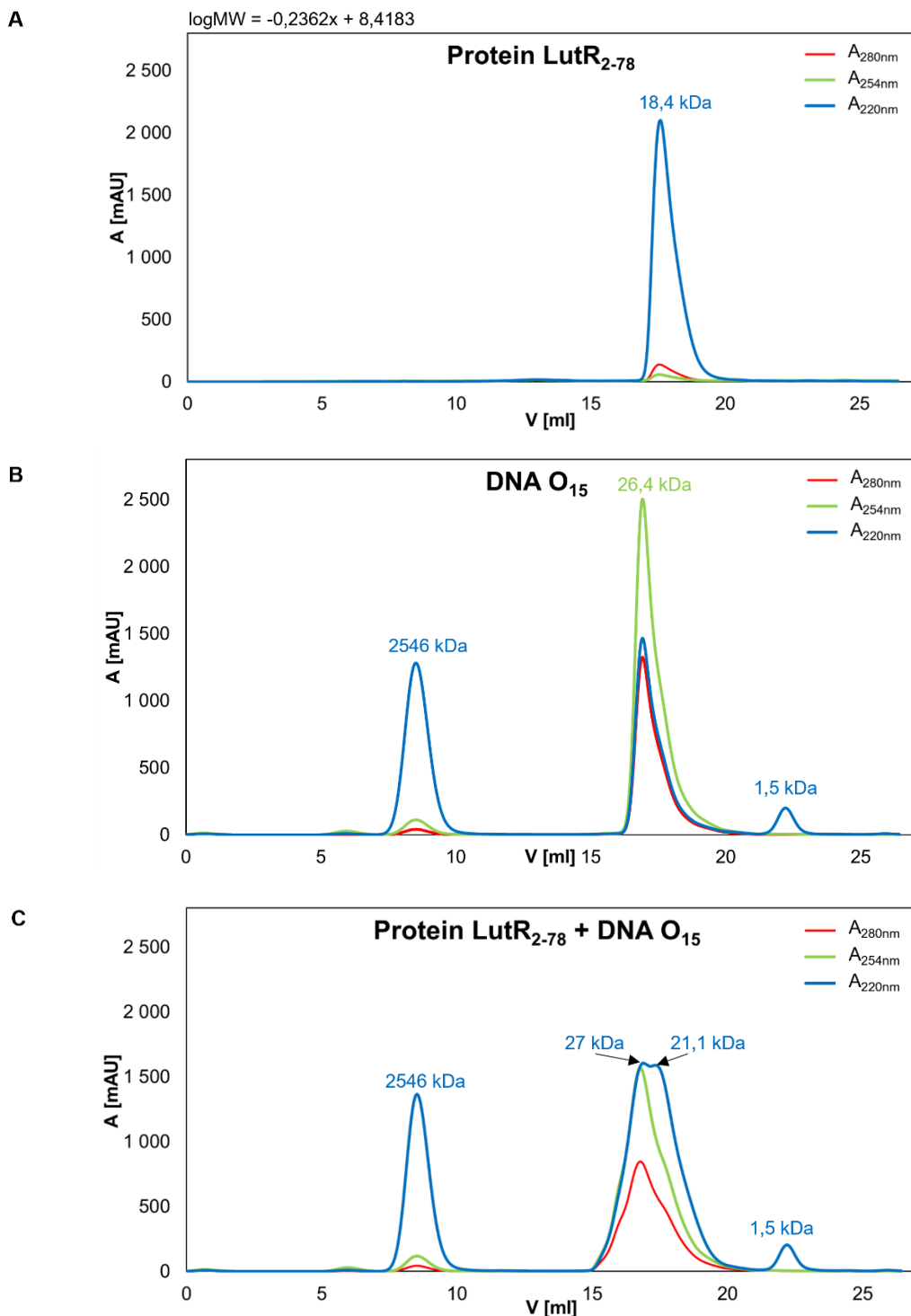
Další metodou, kterou byla ověřována vazba LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu, byla analytická SEC na koloně Superdex 200 10/300 GL, kdy jako mobilní fáze byl použit pufr PBS (pH 7,4). K této analýze byl použit první navržený duplex O₁₅, jehož sekvence vycházela ze zjištěné sekvence DNA operátoru dle Chiu *et al.* (2014) – (viz Tabulka 2). Kromě zkoumání vazby byla analytická SEC využita pro určení oligomerního stavu LutR₂₋₇₈ v roztoku. Přesné provedení experimentu je popsáno v kapitole 4.5.2. Obrázek 15 ukazuje výsledné chromatogramy pro samostatný protein LutR₂₋₇₈, samostatný DNA duplex O₁₅ a jejich směs. Jelikož LutR₂₋₇₈ nemá ve své primární struktuře tryptofan typicky absorbující při 280 nm, byla během eluce sledována absorbance tří vlnových délek: 220 nm, 254 nm a 280 nm.

Z chromatogramu pro samostatný protein (Obrázek 15A) bylo určeno, že se v roztoku nachází v jedné formě o zdánlivé MW přibližně 18,4 kDa, což by při MW LutR₂₋₇₈ cca 9 kDa mohlo odpovídat dimeru.

Chromatogram pro samostatnou DNA O₁₅ (Obrázek 15B), jejíž MW je 9,1 kDa, ukazuje přítomnost více různých forem v roztoku. Vzhledem k tomu, že použitá kolona je kalibrována na separaci globulárních proteinů, výpočet zdánlivé MW je pouze orientační, protože lineární DNA se v daném nosiči může pohybovat s jinou rychlostí.

Obrázek 15C pak vyobrazuje chromatogram směsi LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅ v molárním poměru 2:1. Z něj je patrné, že ve vzorku zůstaly nezměněny některé formy DNA (první vrchol absorbance odpovídající zdánlivé MW cca 2500 kDa a poslední vrchol absorbance odpovídající zdánlivé MW 1,5 kDa). Prostřední vrchol absorbance, který by mohl odpovídat eluci vzniklého komplexu protein-DNA, navíc není jednotný a má dvě maxima umístěná blízko sebe. Tato maxima náleží zdánlivým MW 27 kDa a 21,1 kDa, jsou však jasně viditelná pouze pro A_{220nm}. Bylo prokázáno, že příbuzné represory z rodiny GntR se na DNA vážou jako dimer (Jain a Nair, 2013). Celková teoretická MW takového komplexu skládajícího se ze dvou jednotek proteinu a jedné molekuly DNA by byla pro LutR₂₋₇₈ a DNA duplex O₁₅ přibližně 27,1 kDa. To by mohlo odpovídat jednomu z těchto maxim absorbance v chromatogramu, a to pro zdánlivou MW 27 kDa. Tuto interpretaci také podporuje fakt, že v tomto maximu je i nejvyšší A_{254nm} a ukazuje tedy na přítomnost DNA. Je však možné, že za daných podmínek při dané koncentraci proteinu vůči DNA vzniklo více forem vazby – např. ještě jedna molekula proteinu na jednu molekulu DNA, což se v chromatogramu mohlo projevit právě vznikem dvou maxim absorbance blízko sebe. Dalo by se předpokládat, že takovýto komplex by byl volnější, mohla se u něj více projevit jiná mobilita lineární DNA v chromatografickém nosiči, a proto by jeho zdánlivá MW nemusela odpovídat jeho MW skutečné (přibližně 18,1 kDa). Z chromatogramu samostatné DNA (Obrázek 15B) je patrné, že se oproti proteinu kolonou pohybuje rychleji, tudíž i eluční objem volnějšího komplexu jedné molekuly DNA a jedné molekuly proteinu by měl být menší. Tomuto předpokladu odpovídá druhé maximum vrcholu absorbance, které ukazuje eluci sloučenin o zdánlivé MW 21,1 kDa. Toto však není možné s jistotou potvrdit.

Výsledky analytické SEC nelze jednoznačně interpretovat, a ačkoli ukazují na vazbu LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅, není z nich možné vazbu ani oligomerizaci LutR₂₋₇₈ při této vazbě jasně prokázat.



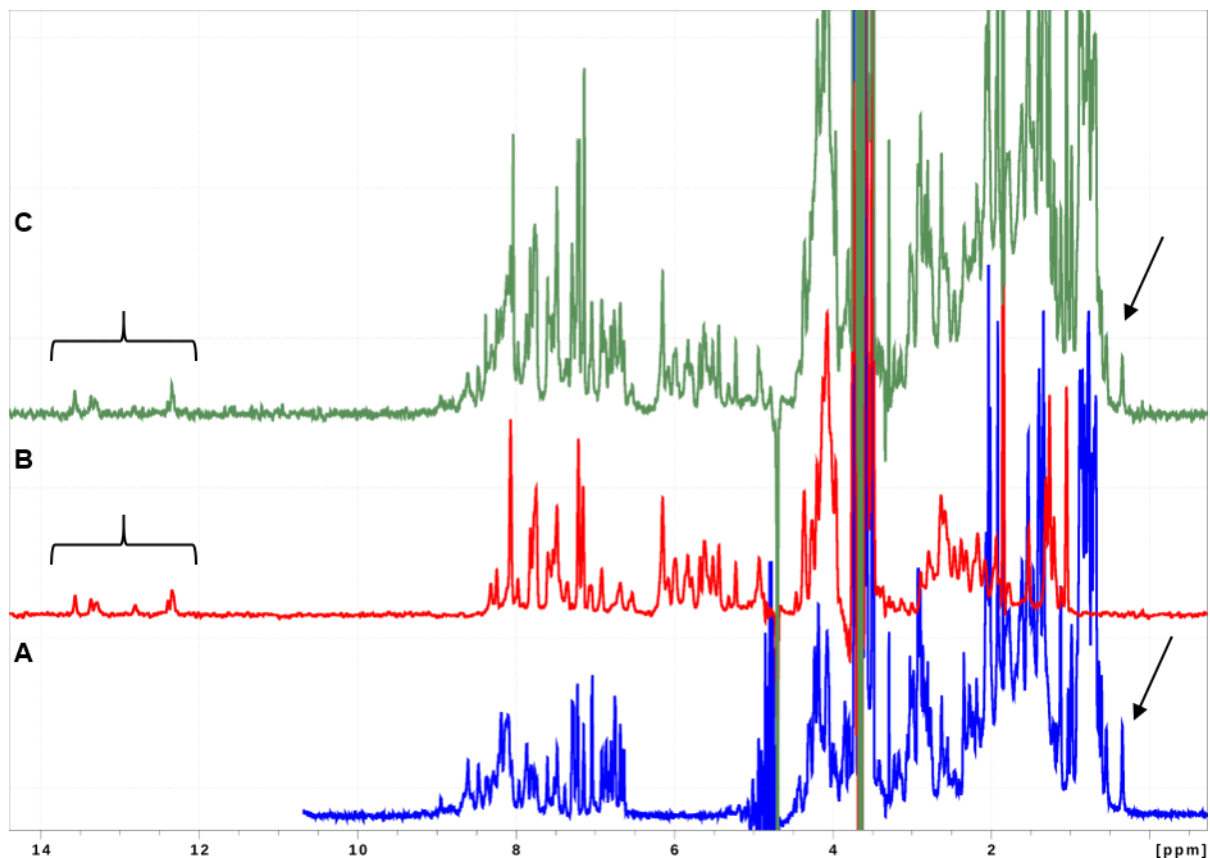
Obrázek 15: Analytická gelová permeační chromatografie LutR₂₋₇₈, DNA duplexu O₁₅ a jejich směsi na nosiči Superdex 200 10/300 GL

(A) Chromatogram znázorňující eluční křivku samostatného LutR₂₋₇₈; (B) chromatogram znázorňující eluční křivku samostatného DNA duplexu O₁₅; (C) chromatogram znázorňující eluční křivku komplexu LutR₂₋₇₈ a DNA O₁₅. Červené křivky představují absorbanci při 280 nm, zelené absorbanci při 254 nm a modré absorbanci při 220 nm. Kalibrační rovnice pro výpočet zdánlivé molekulové hmotnosti příslušných vrcholů absorbance byla pro danou chromatografickou kolonu $\log MW = -0,2362x + 8,4183$.

5.3.3 Studium vazby DNA pomocí NMR spektroskopie

Další metodou, kterou byla ověřována vazba LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅, byla NMR spektroskopie. Data byla snímána na spektrometru Bruker Avance III s pracovní ¹H frekvencí 850 MHz vybaveném tříjadernou kryosondou. Přesné parametry měření jsou uvedeny v kapitole 4.6.1.

Byla měřena a srovnávána 1D ¹H NMR spektra samostatného LutR₂₋₇₈, samostatného DNA duplexu O₁₅ a jejich směsi (Obrázek 16). Ze vzhledu signálů methylových vodíků v oblasti okolo 1 – 0 ppm je patrné, že protein tvoří hydrofobní jádro (Obrázek 16A a 16C, označeno šipkou). Ve vzorcích s DNA jsou v oblasti mezi 12 až 15 ppm patrné signály párů bazí; jejich počet a vzhled však naznačuje, že je ve vzorku přítomno více forem párování (například duplex a vlásenka) a tyto formy mezi sebou přechází (Obrázek 16B a 16C, označeno svorkou). Celkový vzhled spektra vzorku směsi proteinu a DNA naznačuje, že mezi nimi došlo k určité interakci, nicméně se pravděpodobně nejedná o stabilní vazbu (Obrázek 16C).



Obrázek 16: Ověření vazby LutR₂₋₇₈ a prvotního DNA duplexu O₁₅ pomocí NMR spektroskopie: srovnání 1D ¹H NMR spekter

Spektra byla generována programem TopSpin™ 3.2 (Bruker, Německo) a upravena v programu Inkscape 1.1.1. Šipky ukazují na signály v okolí 1 – 0 ppm, které patří vodíkům methylových skupin v hydrofobním jádře proteinu; svorky označují signály vodíků z imino skupin párů bazí nacházející se v oblasti 12 až 15 ppm.

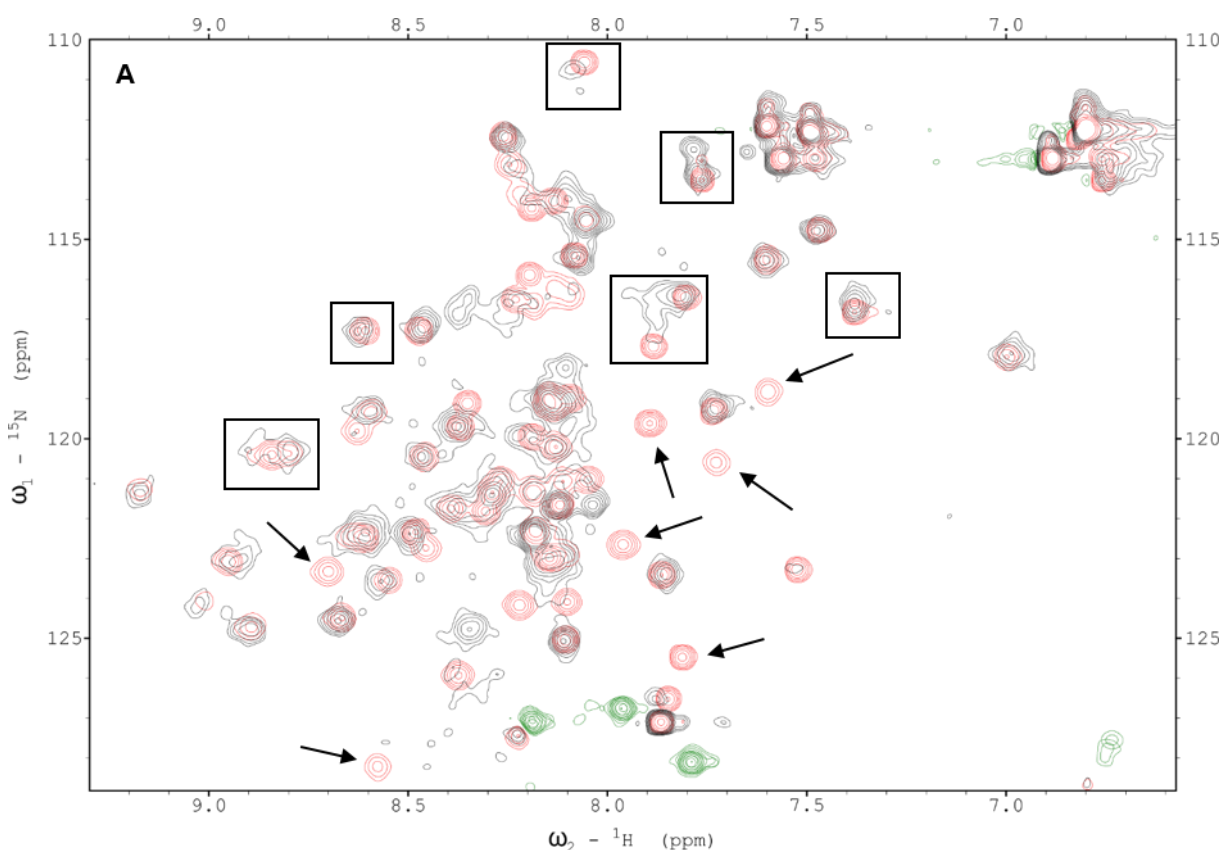
(A) 1D ¹H NMR spektrum LutR₂₋₇₈ (modře) měřené při teplotě přibližně 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 250 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O.

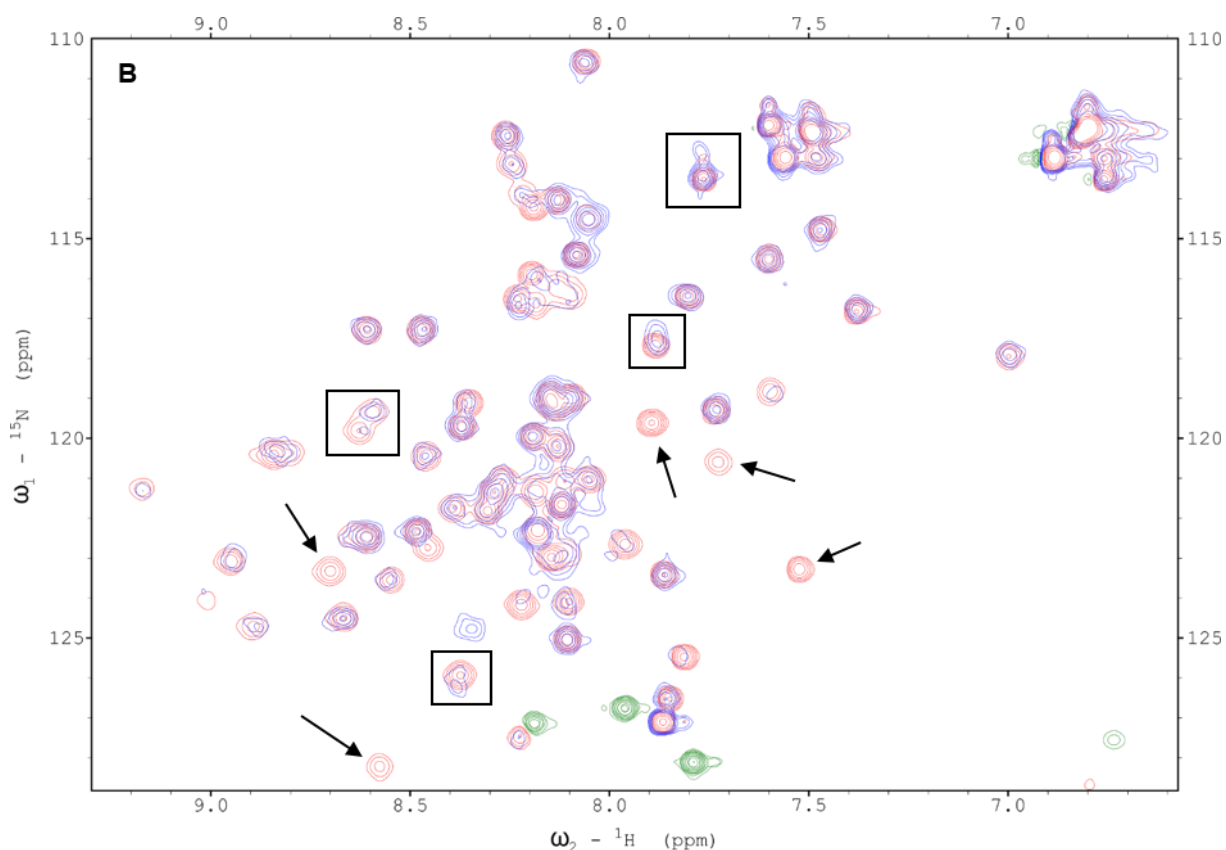
(B) 1D ¹H NMR spektrum prvotního DNA duplexu O₁₅ (červeně) měřené při teplotě přibližně 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 250 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O.

(C) 1D ¹H NMR spektrum komplexu LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅ (zeleně) měřené při teplotě přibližně 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 250 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O.

Pro další vazebné experimenty byla zvolena metoda 2D NMR spektroskopie. Pro tyto účely byl připraven ^{15}N izotopově obohacený LutR₂₋₇₈ (viz kapitola 5.1). Data byla měřena na spektrometru Bruker Avance III s pracovní ^1H frekvencí 850 MHz vybaveném tříjadernou kryosondou. Podrobnosti měření jsou uvedeny v kapitole 4.6.1. Mezitím byla také optimalizována sekvence DNA duplexu, aby byl stabilnější a především homogenní a tím pádem vhodný pro krystalizační experimenty (viz Tabulka 2 a kapitoly 5.4.1 – 5.4.3). Během těchto experimentů bylo také zjištěno, že snížení koncentrace NaCl v pufru z $250 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ pravděpodobně může přispět lepší vazbě DNA na protein a tím ke tvorbě stabilnějšího komplexu (data neuvedena). Pro další vazebné a následné krystalizační pokusy tedy byl používán pufr o složení $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris (pH 7,5) a $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl.

Na Obrázku 17 jsou ukázány příklady naměřených 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC NMR spekter pro vazbu ^{15}N -LutR₂₋₇₈ na DNA duplexy OA₂₁ (5'-TCCAGTCATCAGATGATCATA-3'; Obrázek 17A) a ON₁₆ (5'-TAGTCATCAGATGATA-3'; Obrázek 17B), které byly navrženy jako optimalizované pro krystalizaci (viz kapitola 5.4.1). V obou případech je z překryvu spekter patrné, že po přidání DNA došlo u některých signálů k posunu (několik příkladů označeno černými obdélníky) a některé naopak úplně vymizely (označeno šípkami), což značí, že došlo ke zvětšení MW tvorbou komplexu. Tento komplex je však dle celkového vzhledu spekter stále poměrně dynamický.





Obrázek 17: Překryv 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ NMR spekter samostatného LutR₂₋₇₈ a jeho komplexu s DNA duplexy OA₂₁ a ON₁₆

Spektra byla generována programem TopSpin™ 3.2 (Bruker, Německo) a upravena v programu Inkscape 1.1.1. Černé obdélníky označují příklady posunů signálů a šipky jejich mizení ve srovnání spekter samostatného proteinu a směsi proteinu a DNA.

(A) Překryv 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC NMR spekter samostatného LutR₂₋₇₈ (červeně) a jeho komplexu s DNA duplexem OA₂₁ (černě) měřených při teplotě cca 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 100 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O. Zelenou konturou jsou vykresleny signály se zápornou intenzitou.

(B) Překryv 2D $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC NMR spekter samostatného LutR₂₋₇₈ (červeně) a jeho komplexu s DNA duplexem ON₁₆ (modře) měřených při teplotě cca 25 °C (298 K) v pufru o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 100 mmol·l⁻¹ NaCl s 10% (v/v) přidavkem D₂O. Zelenou konturou jsou vykresleny signály se zápornou intenzitou.

5.4 Krystalizace komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA metodou difúze par

Jedním z hlavních cílů této diplomové práce bylo získat krystaly komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Za tímto účelem byly prováděny krystalizační experimenty s různými DNA duplexy odvozenými ze známé sekvence operátoru LutR, ke kterému byla v předchozích studiích prokázána vazba (Chiu *et al.*, 2014). První navržený DNA duplex O₁₅ byl testován ve vazebných experimentech, ve kterých se však ukázalo, že není dostatečně stabilní a pravděpodobně tvoří heterogenní populaci složenou z více forem, a není tedy vhodný pro přípravu krystalů (viz kapitola 5.3). Pro krystalizační pokusy tak byly navrženy nové DNA duplexy, jejichž délka byla modifikována podle sekvencí použitých pro úspěšnou krystalizaci příbuzných proteinů. Návrh dalších DNA duplexů se poté odvíjel od průběžných výsledků krystalizačních experimentů. V následujících částech bude tento proces popsán společně s prezentací dílčích výsledků krystalizace.

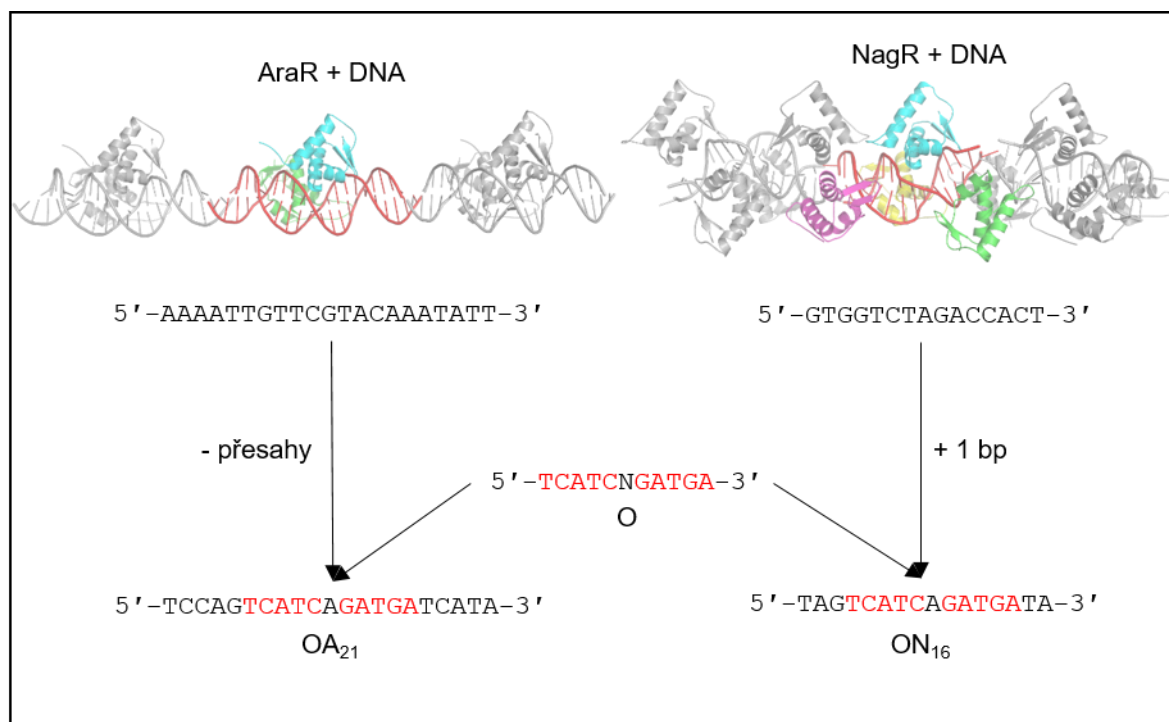
5.4.1 Krystalizace LutR₂₋₇₈ v komplexu s prvními duplexy upravenými pro krystalizaci

V době provádění experimentů byly na základě sekvenční homologie v databázi proteinových struktur PDB (Berman *et al.*, 2000; dostupné z: <https://www.rcsb.org/> [cit. 20. 1. 2017]) nalezeny dva úspěšně zkrystalizované proteiny v komplexu s DNA, a to NagR (PDB kódy 4U0Y, 4WWC; Fillenberg *et al.*, 2015) a AraR (PDB kódy 4EGY, 4EGZ, 5D4R, 5D4S; Jain a Nair, 2013; Jain *et al.*, 2016).

Procentuální vyčíslení sekvenční homologie s LutR₂₋₇₈ je pro NagR 44 % a pro AraR 32 %. Ačkoli tyto proteiny mají jinou sekvenční specifitu a každý rozpoznává odlišnou sekvenci DNA, tak při návrhu DNA duplexů pro krystalizaci s LutR₂₋₇₈ bylo možné se z těchto struktur inspirovat délkou DNA sekvence pro tvorbu výhodných krystalových kontaktů. Analýzou těchto komplexů bylo zjištěno, že délka DNA pro NagR je 15 bp a pro AraR 21 bp a v obou případech tyto duplexy tvoří v rámci krystalu pseudohelix (Obrázek 18).

Byly navrženy dva různé duplexy inspirované tímto zjištěním. Oba byly odvozené od základní operátorové sekvence DNA, pro kterou byla potvrzena vazba LutR (Chiu *et al.*, 2014) a byly prodloužené na obou koncích: OA₂₁ (5'-TCCAGTCATCAGATGATCATA-3') a ON₁₆ (5'-TAGTCATCAGATGATA-3'). Podle vizuálního posouzení vyřešeného komplexu NagR bylo vyhodnoceno, že DNA v krystalu netvoří nejvýhodnější krystalové kontakty, a proto byla délka prodloužena o jeden nukleotid (z 15 na 16). Sekvence DNA konců nových duplexů byla převzata ze sousedícího okolí operátoru v *B. subtilis*. Pro možné budoucí použití přesahujících

konců, podobně jako dělali ve své studii i Jain a Nair (2013), byly na 5' a 3' koncích navrženy nukleotidy A a T, které se pro tento účel hodí více. V prvním kole krystalizací a celé této práci však byly používány duplexy s tupými konci. Schéma postupu při návrhu prvních DNA duplexů pro krystalizaci je znázorněno na Obrázku 18.



Obrázek 18: Schéma designu DNA duplexů vhodných pro krystalizaci komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA operátorem

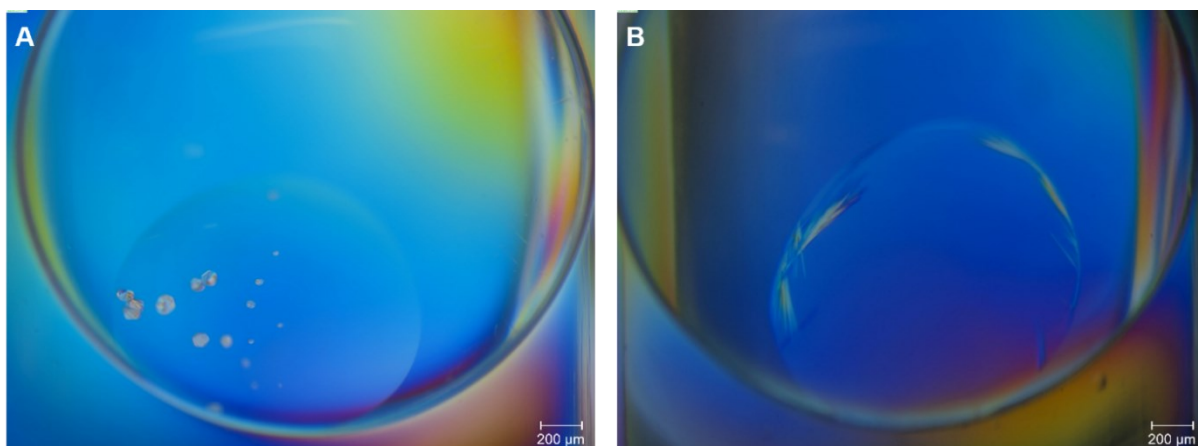
DNA duplexy vhodné pro krystalizaci byly navrženy na základě analýzy vyřešených struktur příbuzných transkripčních represorů AraR (Jain a Nair, 2013) a NagR (Fillenberg *et al.*, 2015). Tyrkysovou, zelenou, žlutou a purpurovou barvou jsou ve stuhovém zobrazení proteinů vyznačeny jednotlivé molekuly proteinu v asymetrické jednotce, červeně je obarvena vždy jedna molekula DNA. Symetricky závislé molekuly v krystalu jsou znázorněny šedou barvou. Tyto struktury byly vizuálně posouzeny a podle délky DNA duplexů, byly ze známé vazebné sekvence (operátoru O) pro LutR (červený text, N je libovolný nukleotid; Chiu *et al.*, 2014) odvozeny DNA duplexy optimalizované pro krystalizační experimenty dlouhé 21 (OA₂₁) a 16 párů bazí (ON₁₆). Obrázky struktur byly připraveny v programu PyMOL verze 2.5.2 (Schrödinger, USA) za použití souborů uložených v PDB pod kódy 4EGY a 4U0Y (Jain a Nair, 2013; Fillenberg *et al.*, 2015).

Určení krystalizačních podmínek pro konkrétní protein, jeho formu, či komplex s dalšími sloučeninami (včetně DNA) spočívá v tom, že se testuje velké množství krystalizačních roztoků komerčních sad od různých výrobců (tzv. screening). Vybrané nejlepší krystalizační podmínky se poté obvykle optimalizují tak, aby byly připraveny co nejkvalitnější krystaly, které dobře difraktují RTG záření. Pro hledání podmínek pro LutR₂₋₇₈ v komplexu s OA₂₁ a ON₁₆ byla využita sada Nucleix Suite (Quiagen, USA), což je komerční sada navržená speciálně pro krystalizaci komplexů proteinů a nukleových kyselin. Dále byla testována komerční sada roztoků Morpheus[®] (Molecular Dimensions, USA). Tato sada byla vytvořena na základě analýzy PDB databáze a obsahuje chemické sloučeniny a jejich směsi využitě k úspěšné krystalizaci. Tyto molekuly pak byly seskupeny podle podobnosti chemických vlastností a v rámci celé sady Morpheus[®] různě zkombinovány (Gorrec, 2009).

Pro hledání krystalizačních podmínek byla použita metoda sedící kapky. Ty byly nasazovány s pomocí krystalizačního robota, který umožňuje provádět experimenty s použitím velmi malých objemů proteinového vzorku (100 – 200 nl). Výchozím pufr pro krystalizaci byl skladovací pufr pro LutR₂₋₇₈ o složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5), 250 mmol·l⁻¹ NaCl a 5 mmol·l⁻¹ β-merkaptoethanol. Detaily k provedení krystalizačních pokusů jsou popsány v kapitole 4.6.2.

Testování 96 různých roztoků ze sady Nucleix Suite přineslo pro LutR₂₋₇₈ s OA₂₁ minimum krystalů s dostatečnou velikostí pro rentgenostrukturní analýzu. Objevily se například tyčinky o rozměrech cca 100×10×10 μm nebo destičky nepravidelného tvaru o velikosti přibližně 50×50×5 μm v průměru (Obrázek 19A). Několik vybraných krystalů bylo uchyceno do nylonové smyčky, ponořeno do krystalizačního roztoku (20% (w/v) PEG 300) a schlazeno v tekutém dusíku. Testování na domácím zdroji RTG záření pak pro několik krystalů potvrdilo, že se jedná o krystaly proteinu, difraktující do nízkého rozlišení maximálně 10 Å. V ostatních případech se nejspíše jednalo o krystal anorganického původu.

Nucleix Suite pro LutR₂₋₇₈ s ON₁₆ poskytl několik podmínek vhodných pro růst krystalů jehlicovitého typu o délce až přibližně 300 μm, často však ve formě multikrystalů (jehlic spojených do klastrů), a tedy nevhodných pro difrakční analýzu (Obrázek 19B).



Obrázek 19: Příklady krystalů získaných při prvních krystalizačních pokusech s duplexy OA₂₁ a ON₁₆ v krystalizačních roztocích komerčního kitu Nucleix Suite

Krystaly byly fotografovány v polarizovaném světle.

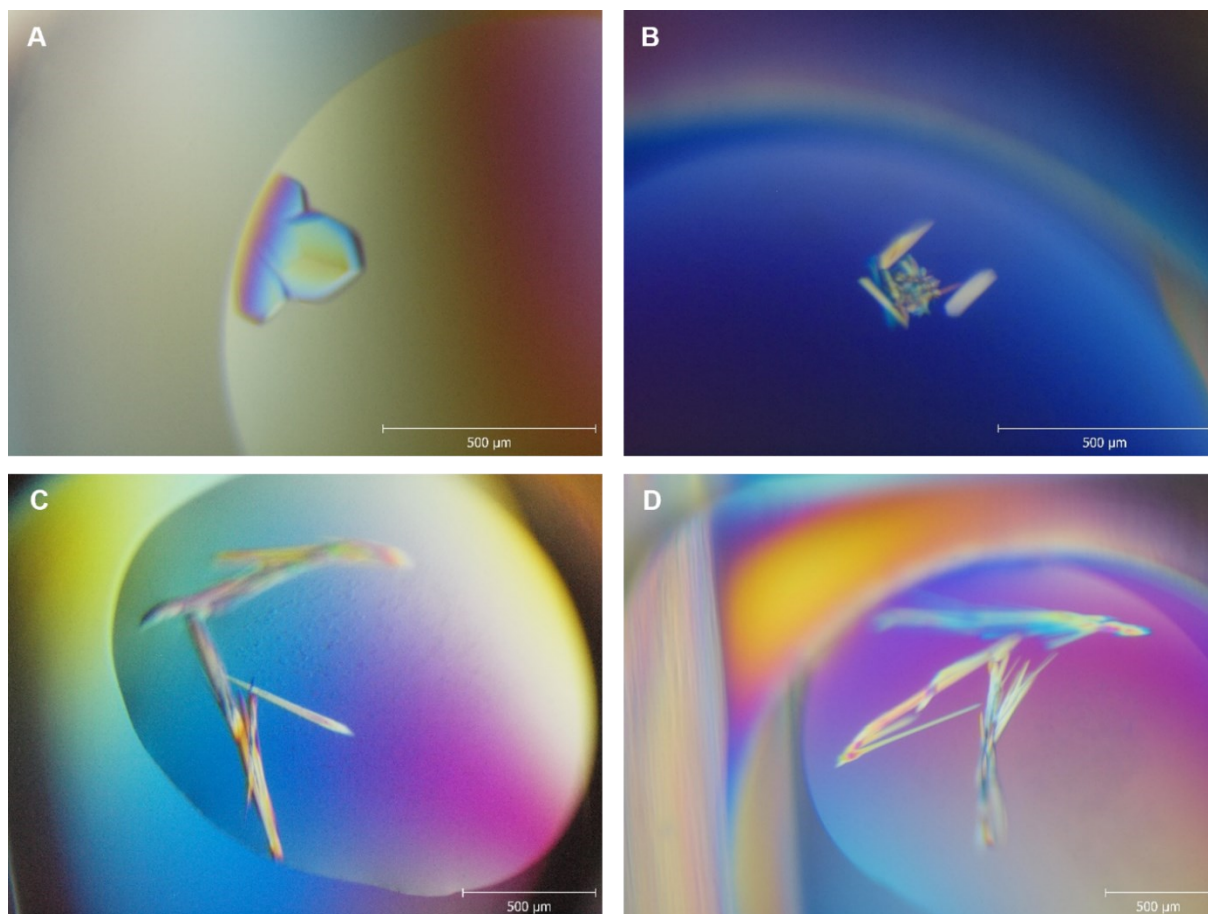
(A) Komplex LutR₂₋₇₈ s OA₂₁; krystalizační roztok: 50 mmol·l⁻¹ kakodylát sodný (pH 6,5), 100 mmol·l⁻¹ NaCl, 200 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 20% (w/v) PEG 1000; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 10 Å;

(B) Komplex LutR₂₋₇₈ s ON₁₆; krystalizační roztok: 50 mmol·l⁻¹ kakodylát sodný (pH 6,0), 1 mmol·l⁻¹ spermin, 20 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 2 mmol·l⁻¹ CaCl₂, 10% (v/v) 1,5-hexandiol.

Naopak v roztocích kitu Morpheus[®] vyrostly 3D krystaly různého tvaru většího objemu (Obrázek 20), a to pro komplexy LutR₂₋₇₈ s oběma DNA duplexy. Mezi krystaly se objevovaly například destičky hexagonálního tvaru o velikosti přibližně 250×250×5 μm (Obrázek 20A), tlustší hranolky o délce cca 100×30×30 μm (Obrázek 20B) a zejména velice tenké jehlice dlouhé až 500 μm (Obrázek 20C a 20D), jež se vyskytovaly často jako srostlice.

Některé krystaly byly dostatečné velké pro testování difrakce na domácím zdroji RTG záření (Obrázek 20). Krystaly byly uchyceny do nylonové smyčky a zmraženy v tekutém dusíku. Bylo potvrzeno, že se jedná o krystaly proteinu s difrakcí na nízkém rozlišení (maximálně 6 Å).

Výsledky krystalizačních experimentů s DNA duplexy OA₂₁ a ON₁₆ ukázaly, že LutR₂₋₇₈ je v komplexu s nimi schopen krystalizace, nicméně získané krystaly neposkytovaly difrakci do vysokého rozlišení, což poukazuje na neuspořádanost nebo nestabilitu v krystalu. Tuto úvahu podpořily i paralelní 2D NMR experimenty s LutR₂₋₇₈ obohaceným izotopem ¹⁵N (viz kapitola 5.3.3). Proto byla jako následující krok zvolena další optimalizace DNA duplexů, a to přidáním stabilizujících CG párů na oba jejich konce.



Obrázek 20: Příklady krystalů získaných při prvních krystalizačních pokusech s duplexy OA_{21} a ON_{16} v krystalizačních roztocích komerčního kytu *Morpheus*

Krystaly byly fotografovány v polarizovaném světle.

(A) Komplex LutR₂₋₇₈ s OA_{21} ; krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 30 mmol·l⁻¹ MgCl₂, 30 mmol·l⁻¹ CaCl₂; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 6 Å;

(B) Komplex LutR₂₋₇₈ s OA_{21} ; krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ bicin/Tris báze (pH 8,5), 12,5% (w/v) PEG 1000, 12,5% (w/v) PEG 3350, 12,5% (v/v) MPD, 20 mmol·l⁻¹ L-glutamát sodný, 20 mmol·l⁻¹ DL-alanin, 20 mmol·l⁻¹ glycin, 20 mmol·l⁻¹ DL-lysin HCl, 20 mmol·l⁻¹ DL-serin; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 30 Å;

(C) Komplex LutR₂₋₇₈ s ON_{16} ; krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ bicin/Tris báze (pH 8,5), 12,5% (w/v) PEG 1000, 12,5% (w/v) PEG 3350, 12,5% (v/v) MPD, 30 mmol·l⁻¹ diethylenglykol, 30 mmol·l⁻¹ triethylenglykol, 30 mmol·l⁻¹ tetraethylenglykol, 30 mmol·l⁻¹ pentaethylenglykol; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 8 Å;

(D) Komplex LutR₂₋₇₈ s ON_{16} ; krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ bicin/Tris báze (pH 8,5), 12,5% (w/v) PEG 1000, 12,5% (w/v) PEG 3350, 12,5% (v/v) MPD, 20 mmol·l⁻¹ L-glutamát sodný, 20 mmol·l⁻¹ DL-alanin, 20 mmol·l⁻¹ glycin, 20 mmol·l⁻¹ DL-lysin HCl, 20 mmol·l⁻¹ DL-serin; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 10 Å.

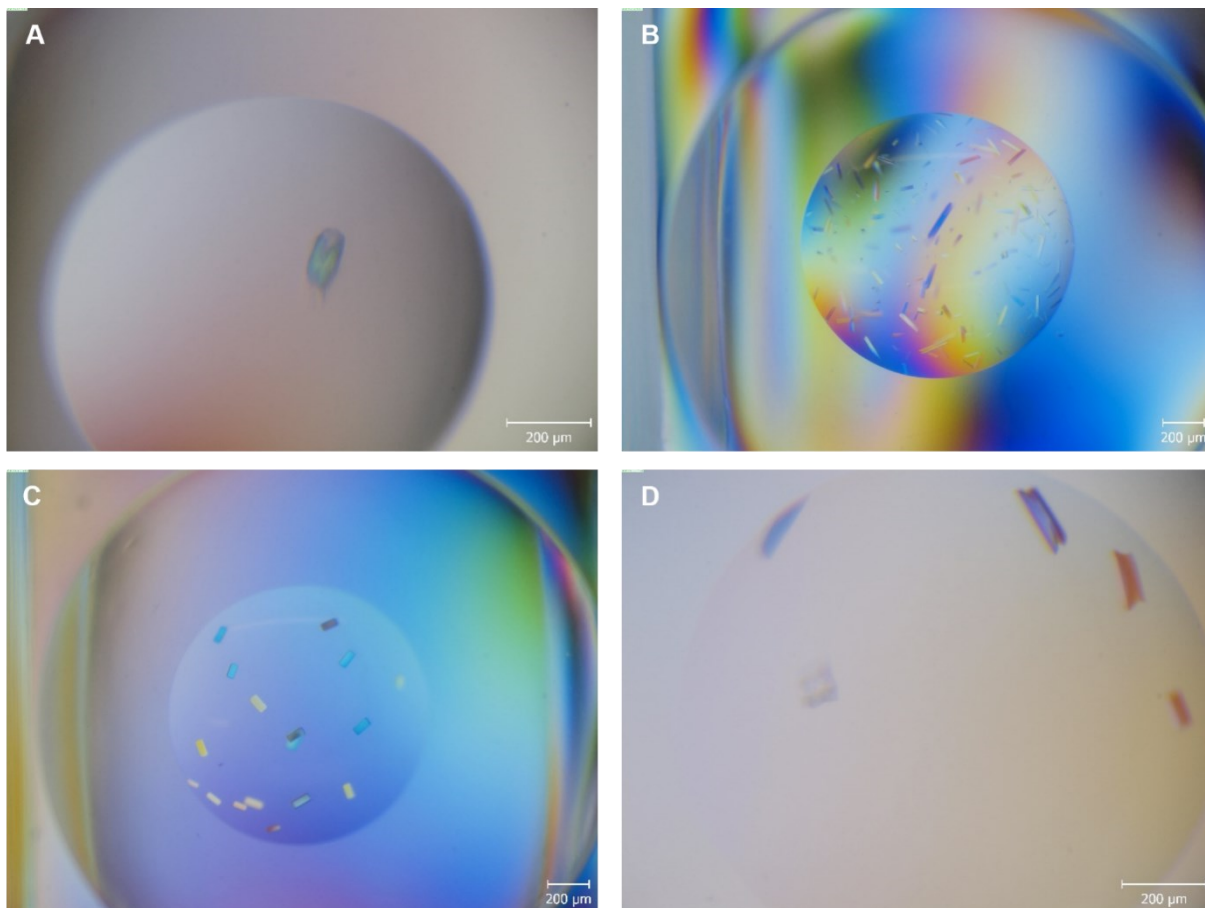
5.4.2 Krystalizace LutR₂₋₇₈ v komplexu s optimalizovanými prodlouženými stabilizovanými duplexy

V druhém kole optimalizace sekvence DNA duplexů pro krystalizaci byly na jejich 5' a 3' konce přidány GC páry pro zvýšení jejich stability. Výsledné sekvence byly 5'-GCTCCAGTCATCAGATGATCATAACG-3' pro OA₂₅ a pro ON₂₀ 5'-GCTAGTCATCAGATGATAACG-3' (viz Tabulka 2).

V prvních krystalizačních pokusech v roztocích z komerčního kitu Morpheus[®] narostly větší a kvalitnější krystaly, a proto byl tento kit zvolen i pro hledání podmínek pro krystalizaci LutR₂₋₇₈ s DNA duplexy OA₂₅ a ON₂₀ metodou sedící kapky. Podrobnosti o provedení krystalizačních experimentů jsou uvedeny v kapitole 4.6.2. Na základě výsledků NMR experimentů, které byly prováděny paralelně s krystalizačními experimenty, byl jako výchozí pufr pro další krystalizaci zvolen pufr s nižším obsahem soli o konečném složení 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 100 mmol·l⁻¹ NaCl.

Hledání krystalizačních podmínek pro komplex LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem OA₂₅ s použitím kitu Morpheus[®] neposkytlo žádné krystaly. V některých podmínkách se objevilo fázové rozdělení či precipitát.

Naopak úvodní hledání krystalizačních podmínek pro komplex LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem ON₂₀ bylo úspěšnější. Krystaly různého tvaru a velikosti narostly celkem ve 25 krystalizačních roztocích z 96 testovaných. Opakovaly se především tvary hranolků, destiček, sloupků a kvádrů (Obrázek 21), popřípadě mikrokrytalů ve tvaru krychliček. Některé z krystalů, především ty největší až o velikosti přibližně 200×50×50 μm, se však během pozorování pod mikroskopem rychle rozpouštěly (viditelné na Obrázku 21A). Také bylo možné pozorovat u některých krystalů duté konce, které značí rychlý růst krystalu (Obrázek 21D).



Obrázek 21: Příklady krystalů komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem ON₂₀

Krystaly byly fotografovány v polarizovaném světle.

(A) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 10% (w/v) PEG 20000, 20% (v/v) PEG MME, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol; krystal při zahřívání světlem mikroskopu rychle degradoval;

(B) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 10% (w/v) PEG 20000, 20% (v/v) PEG MME, 30 mmol·l⁻¹ NaF, 30 mmol·l⁻¹ NaBr, 30 mmol·l⁻¹ NaI;

(C) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 12,5% (w/v) PEG 1000, 12,5% (w/v) PEG 3350, 12,5% (v/v) MPD, 20 mmol·l⁻¹ mravenčan sodný, 20 mmol·l⁻¹ octan amonný, 20 mmol·l⁻¹ citrát trisodný, 20 mmol·l⁻¹ L-tartrát sodnodraselný, 20 mmol·l⁻¹ oxamát sodný;

(D) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ bicin/Tris báze (pH 8,5), PEG 20000, 20% (v/v) PEG MME, 20 mmol·l⁻¹ L-glutamát sodný, 20 mmol·l⁻¹ DL-alanin, 20 mmol·l⁻¹ glycin, 20 mmol·l⁻¹ DL-lysin HCl, 20 mmol·l⁻¹ DL-serin; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 5,7 Å.

Pro další optimalizaci krystalizačních experimentů bylo vybráno celkem 12 různých roztoků. V rámci optimalizace byla měněna výchozí koncentrace komplexu LutR₂₋₇₈ s ON₂₀, ředěn výchozí krystalizační roztok, či přidáváno aditivum 100 mmol·l⁻¹ NaI. Byla použita metoda sedící kapky s ručním nasazováním s větším objemem kapek 1 – 1,5 μl. Další informace k provedení optimalizace krystalizace jsou popsány v kapitole 4.6.2. Jelikož byly krystaly připravené v původních podmínkách v mnoha případech nestabilní a rychle se při pozorování rozkládaly, nebyly krystaly připravené v rámci optimalizačních experimentů fotograficky dokumentovány. Jejich vizuální kontrola byla prováděna co nejrychleji a krystaly vhodné k difrakční analýze byly ihned uchyceny do nylonové smyčky a zmrazeny v tekutém dusíku. Krystaly narostlé v ředěných krystalizačních roztocích byly před zamražením ponořeny do původního neředěného roztoku, který tak sloužil jako kryoprotektant. Krystaly měly většinou podobný tvar a velikost jako ve výchozích experimentech (viz Obrázek 21). Objevovaly se hranolky, kvádrčky a sloupky dlouhé přibližně 100 – 200 μm. Všechny tyto krystaly z důvodu své křehkosti nebyly testovány na domácím zdroji, ale přímo na zdroji synchrotronového záření (BL 14.1, BESSY II, HZB, Německo; Mueller *et al.*, 2015), kde proběhl sběr difrakčních dat. Bylo otestováno několik desítek krystalů, které difraktovaly RTG záření do maximálního rozlišení v rozmezí 8 – 4 Å.

Nejlepší difrakční vlastnosti (s maximálním rozlišením 3,99 Å) měl krystal narostlý v kapce s precipitačním roztokem 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 10% (w/v) PEG 20000, 20% (v/v) PEG MME, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol zředěným na 90 % (v/v) v poměru 2:1 (v/v) pro komplex s proteinem (11,3 mg·ml⁻¹) vůči precipitantu. Pro tento krystal byla nasnímána kompletní sada difrakčních dat. Kvalita difrakčních dat, zejména nízké rozlišení, však nebyla dostatečná pro úspěšné vyřešení krystalové struktury. Difrakční dataset ale mohl být využit k základní charakterizaci krystalu: byla určena prostorová grupa krystalu, mřížové parametry elementární buňky a provedena analýza obsahu krystalu (Tabulka 3).

Na základě výpočtu Matthewsova koeficientu (Kantardjieff a Rupp, 2003) byl proveden odhad počtu molekul proteinu v asymetrické jednotce a obsah rozpouštědla (Tabulka 3). Je tedy pravděpodobné, že asymetrická jednotka krystalu obsahuje dvě kopie předpokládané biologické jednotky, tj. dimeru proteinu navázaném na jenom DNA duplexu.

Tabulka 3: Parametry krystalu LutR₂₋₇₈ s ON₂₀

Prostorová grupa	<i>P4₂1₂</i>
Parametry buňky [Å; °]	<i>a = b = 63,52, c = 236,6; α = β = γ = 90</i>
Rozlišení [Å]	<i>47,31 – 3,99</i>
Kompletnost [%]	<i>93,7</i>
Objem základní jednotky [Å ³]	<i>970 752</i>
Objem asymetrické jednotky [Å ³]	<i>121 344</i>
Matthewsův koeficient [Å ³ /Da]	<i>2,64</i>
Obsah rozpouštědla [%]	<i>68,5</i>
Počet molekul v asymetrické jednotce	<i>4</i>

Optimalizace krystalizačních podmínek vedla k úspěšné krystalizaci; a ačkoliv velikost krystalů byla dostatečná, difrakční limit byl však nízký. V dalším kroku byla dále věnována pozornost optimalizaci délky DNA duplexu s cílem podpořit krystalové kontakty a lepší skládání molekul v rámci krystalu (tzv. „crystal packing“) a tím vylepšit difrakční vlastnosti. Za tímto účelem byla využita sekvence DNA duplexu ON₂₀, ze které byly odvozeny tři varianty různých délek.

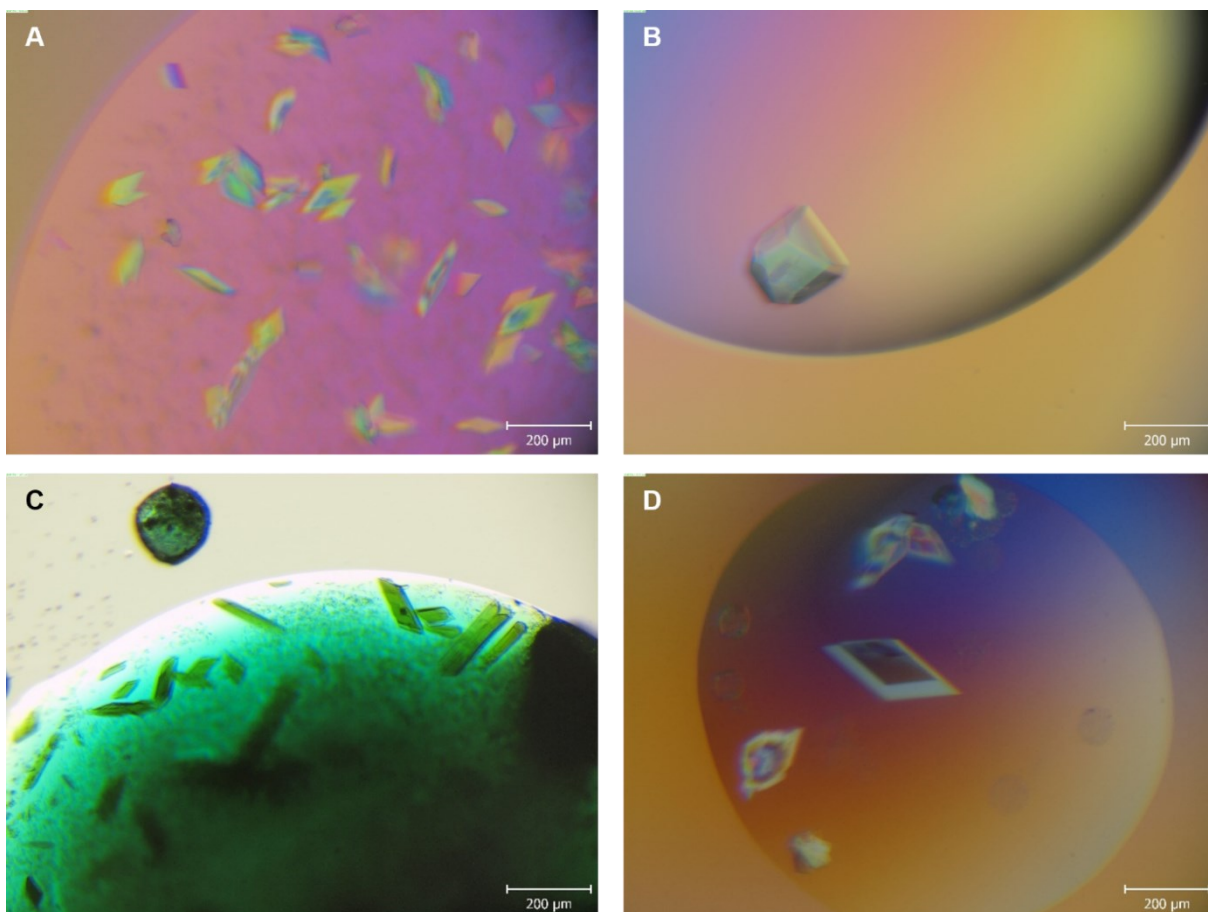
5.4.3 Krystalizace LutR₂₋₇₈ v komplexu s optimalizovanými duplexy různých délek

Ve třetím kroku optimalizace DNA duplexů pro krystalizaci jejich komplexu s LutR₂₋₇₈ byly navrženy tři další sekvence DNA, které vycházely z DNA duplexu ON₂₀. Těmi byly oligonukleotidy: ON₂₁ delší o jeden pár bazí (5'-TGCTAGTCATCAGATGATACG-3'), ON₁₉ kratší o jeden pár bazí (5'-GCTGTCATCAGATGATACG-3') a ON₁₈ kratší o dva páry bazí (5'-GCTGTCATCAGATGATCG-3'; viz Tabulka 2).

Hledání výchozích krystalizačních podmínek pro komplexy se všemi třemi DNA duplexy bylo provedeno metodou sedící kapky s využitím krystalizačního robota a sady roztoků Morpheus[®]. Výchozím pufr pro krystalizaci zůstal pufr se složením 20 mmol·l⁻¹ Tris (pH 7,5) a 100 mmol·l⁻¹ NaCl.

Hledání krystalizačních podmínek pro LutR₂₋₇₈ s ON₂₁ poskytlo celkem 11 podmínek pro růst krystalů především ve formě jehlic a jehlicovitých mikrokrystalů. Pro další optimalizace byly vybrány 3 výchozí podmínky (roztoky číslo 6, 81 a 91) a optimalizace krystalizačních podmínek spočívala v obměnách koncentrace komplexu protein-DNA v kapce a zpomalení difúze par pomocí Alova oleje. Další podrobnosti o provedení krystalizačních experimentů jsou uvedeny v kapitole 4.6.2. Tento postup nevedl ke zlepšení kvality krystalů, krystaly difraktovaly RTG záření do maximálního rozlišení 10 Å.

Vizuálně nej kvalitnější krystaly poskytla krystalizace LutR₂₋₇₈ s ON₁₈, tedy nejkratší variantou DNA duplexu. Krystaly narostly ve 46 roztocích z výchozích 96. Optimalizována byla krystalizace ve vybraných 4 podmínkách (roztoky číslo 15, 66, 74 a 90). Krystaly se objevovaly v různých tvarech, velikostech a formách (Obrázek 22). Časté byly tlustší destičky, kvádříky, sloupečky, vyskytly se i šupiny, které tvořily srostlice. Největší monokrystal, který se povedlo získat, je na Obrázku 22B. Jeho rozměry byly přibližně 200×100×80 μm. Krystaly z různých podmínek pak difraktovaly RTG záření na synchrotronu (BL 14.1, BESSY II, HZB, Německo; Mueller *et al.*, 2015) do maximálního rozlišení v rozmezí 17 – 3,2 Å.



Obrázek 22: Vybrané krystaly komplexu *LutR*₂₋₇₈ s DNA duplexem *ON*₁₈

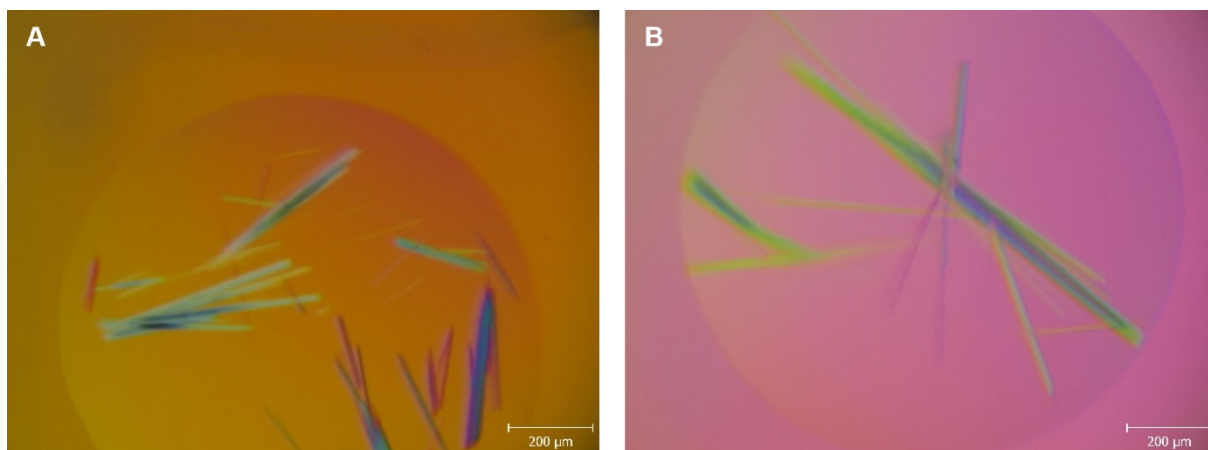
(A) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 4000, 20% (v/v) glycerol, 30 mmol·l⁻¹ NaF, 30 mmol·l⁻¹ NaBr, 30 mmol·l⁻¹ NaI; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 3,2 Å; fotografováno v polarizovaném světle;

(B) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 20 mmol·l⁻¹ mravenčan sodný, 20 mmol·l⁻¹ octan amonný, 20 mmol·l⁻¹ citrát trisodný, 20 mmol·l⁻¹ L-tartrát sodnodraselný, 20 mmol·l⁻¹ oxamát sodný; krystal difraktoval RTG záření do rozlišení 7,5 Å; fotografováno v polarizovaném světle;

(C) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MOPS/HEPES sodný (pH 7,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 20 mmol·l⁻¹ D-glukosa, 20 mmol·l⁻¹ D-manosa, 20 mmol·l⁻¹ D-galaktosa, 20 mmol·l⁻¹ L-fukosa, 20 mmol·l⁻¹ D-xyloza, 20 mmol·l⁻¹ N-acetyl-D-glukosamin; krystaly byly před vylovením máčeny spolu s krystaly Ta₂Br₁₀ a difraktovaly RTG záření do rozlišení 7 Å; fotografováno v bílém světle;

(D) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 4000, 20% (v/v) glycerol, 30 mmol·l⁻¹ NaF, 30 mmol·l⁻¹ NaBr, 30 mmol·l⁻¹ NaI; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 4,8 Å; fotografováno v polarizovaném světle.

Největší množství výchozích roztoků pro úspěšnou krystalizaci poskytl Morpheus® pro komplex LutR₂₋₇₈ s ON₁₉, a to 71 z 96. Ve většině případů se jednalo o mikrokrystaly a drobné jehlice. Objevily se však i větší a tlustší jehlice, hranolky a sloupečky dlouhé 400 – 600 μm s dalšími rozměry maximálně 40 μm (Obrázek 23).



Obrázek 23: Vybrané krystaly komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem ON₁₉

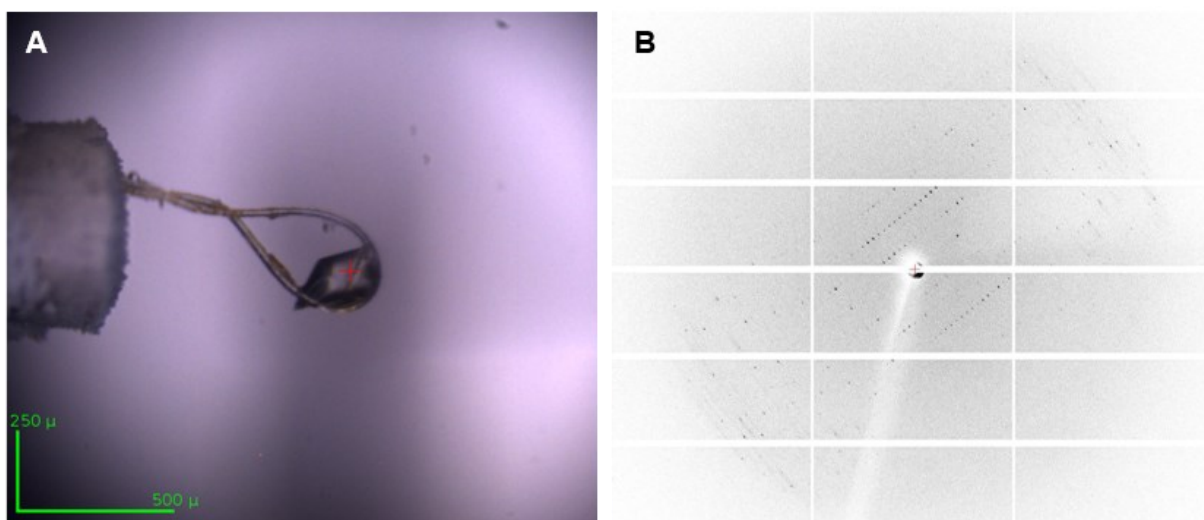
Krystaly byly fotografovány v polarizovaném světle.

(A) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 2,8 Å; fotografováno pod polarizovaným světlem;

(B) Krystalizační roztok: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 4000, 20% (v/v) glycerol, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol; krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 3,6 Å.

Optimalizace krystalizace v pěti vybraných podmínkách (roztoky číslo 18, 38, 42, 50 a 78) nevedla k výraznému zlepšení kvality krystalů. K difrakčnímu měření byly použity krystaly z výchozího experimentu. Difrakční data s nejlepším rozlišením byla získána z krystalu narostlého v precipitačním roztoku 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol, kde byl komplex s proteinem (11,3 mg·ml⁻¹) v poměru 1:1 (v/v) k precipitantu (Obrázek 23A). Krystal byl uchycen do nylonové smyčky a zmrazen v tekutém dusíku a následně transportován na zdroj synchrotronového záření BESSY II, HZB, Německo, kde proběhl sběr kompletní sady difrakčních dat (Obrázek 24). Krystal difraktoval synchrotronové záření do rozlišení 2,8 Å; kompletní dataset byl nasnímán při teplotě -173,15 °C

(100 K) a vlnové délce 0,9184 Å na pracovišti BL14.1 BESSY II, HZB, Německo (Mueller *et al.*, 2015). Tabulka 4 shrnuje parametry krystalu a statistiky sběru dat.



Obrázek 24: Nejlépe difraktující krystal LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem ON₁₉

(A) Krystal uchycený ve smyčce před snímáním difrakčních dat. Složení roztoku, ze kterého krystal pocházel: 100 mmol·l⁻¹ MES/imidazol (pH 6,5), 10% (w/v) PEG 8000, 20% (v/v) ethylenglykol, 20 mmol·l⁻¹ 1,6-hexandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1-butanol, 20 mmol·l⁻¹ (RS)-1,2-propandiol, 20 mmol·l⁻¹ 2-propanol, 20 mmol·l⁻¹ 1,4-butandiol, 20 mmol·l⁻¹ 1,3-propandiol.

(B) Difrakční obrazec z tohoto krystalu poskytující difrakce do rozlišení 2,8 Å.

Tabulka 4: Statistiky sběru difrakčních dat pro krystal komplexu LutR₂₋₇₈ a ON₁₉

Prostorová grupa	<i>P</i> 4₁2₁2
Parametry buňky [Å; °]	a = b = 69,79, c = 115,89; α = β = γ = 90
Vlnová délka [Å]	0,9184
Rozlišení [Å]	49,35 – 2,8 (2,97 – 2,80)
Počet jedinečných reflexí	7 444
Multiplicita	14,01
Kompletnost [%]	98,8 (98,8)
R _{meas} [%] ^a	17,9 (545,7)
CC _{1/2} ^b	99,9 (50,3)
Průměrná I/σ(I)	9,36 (0,46)
Wilsonův koeficient B [Å ²]	87,0
Objem základní jednotky [Å ³]	552 276
Objem asymetrické jednotky [Å ³]	69 035
Matthewsův koeficient [Å ³ /Da]	3
Obsah rozpouštědla [%]	72,4
Počet molekul v asymetrické jednotce	2

Vysvětlivky k tabulce: Data v závorkách odkazují na vrstvu s nejvyšším rozlišením;

^a **R_{meas}** je parametr, který se vypočítá ze vzorce:

$$R_{meas} = 100 \sum_{hkl} \sqrt{\left(\frac{n}{n-1}\right)} \sum_{i=1}^n |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_{i=1}^n I_i(hkl)$$

přičemž $I_i(hkl)$ značí individuální intenzitu i -tého pozorování reflexe hkl a $\langle I(hkl) \rangle$ průměrnou intenzitu reflexe hkl se součtem všech dat (Karplus a Diederichs, 2012);

^b **CC_{1/2}** je podle Kapluse a Diederichse (2012) korelační koeficient mezi náhodnou polovinou dat, z jehož hodnoty může být vypočítán Pearsonův korelační koeficient skutečné míry signálu s pomocí vzorce:

$$CC^* = \sqrt{2CC_{1/2}/(1 + CC_{1/2})}$$

přičemž CC^* je korelační koeficient, kterým je odhadována hodnota Pearsonova korelačního koeficientu skutečné míry signálu na základě konečné velikosti souboru dat.

Na základě výpočtu Matthewsova koeficientu (Kantardjieff a Rupp, 2003) byl proveden odhad počtu molekul proteinu v asymetrické jednotce a obsah rozpouštědla (Tabulka 4). Oproti předchozímu krystalu, který byl podroben difrakční analýze (Tabulka 3), obsahuje tato krystalová forma jednu kopii přepokládané biologické jednotky. Toto je pravděpodobně důvod lepších difrakčních vlastností. Zpracovaná sada difrakčních dat bude ve školící laboratoři sloužit k vyřešení krystalové struktury.

6 Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce byla příprava krystalů komplexu DBD LutR z divokých kmenů *B. subtilis* s DNA vhodných pro sběr difrakčních dat a následnou rentgenostrukturní analýzu.

Pro krystalografické studie proteinů tvořených více doménami je běžnou strategií protein rozdělit na jednotlivé domény a ty krystalizovat individuálně (Jain and Nair, 2013; Jain *et al.*, 2016; Procházková *et al.*, 2012; Řezáčová *et al.*, 2007; Řezáčová *et al.*, 2008; Škerlová *et al.*, 2014). Pro proteiny s více doménami, především pokud jsou domény propojeny flexibilními spojkami a tvoří oligomery, je totiž výrazně nižší pravděpodobnost vytvoření dobře složeného krystalu s dobrými difrakčními vlastnostmi. Proto byla pro strukturní studie v této diplomové práci použita pouze DBD LutR a ne celý protein obsahující i EBD. Tento přístup výrazně zvyšuje pravděpodobnost úspěšné krystalizace.

Hledání vhodných krystalizačních podmínek a následná optimalizace krystalizace je proces, který je náročný na čistotu a celkovou spotřebu proteinu, jelikož se testují stovky různých krystalizačních roztoků. V případě krystalizace komplexu proteinu s DNA tato spotřeba ještě narůstá a pohybuje se pak řádově v desítkách mg. Prvotní úsilí v této práci bylo proto zaměřeno na získání dostatečného množství rekombinantního proteinu ve vysoké čistotě. Heterologní expresí v *E. coli* kmeni BL21 (DE3) byl připraven LutR₂₋₇₈ podle standardního protokolu pro přípravu bakteriálních represorů používaného ve školící laboratoři. Tento protokol je popsán v kapitole 4.4.1. Protein byl produkován jak do rozpustné části buněk (cytosolu), tak v menší míře i do části nerozpustné. Pro následnou purifikaci však bylo využito pouze rozpustné frakce buněčného lyzátu, a to především ze dvou důvodů. Prvním byl fakt, že podle vizuálního vyhodnocení kontrolní SDS-PAGE analýzy se v rozpustné frakci lyzátu nacházelo dostatečné množství proteinu. Dalším důvodem pak bylo to, že v nerozpustné frakci je protein akumulován v inkluzích, kde se nachází v denaturovaném stavu a jeho purifikace a následná renaturace je časově a materiálově náročná. Z cytosolu bylo získáno dostatečné množství proteinu, který byl díky přítomnosti N-koncové fúzní His₆-kotvy purifikován s využitím chelatační chromatografie. Celkový výtěžek LutR₂₋₇₈ po purifikaci byl 53,9 mg na 1 l bakteriální kultury (4,3 mg na 1 g vlhké biomasy) v čistotě >95 %, což bylo dostačující pro použití v krystalizačních experimentech. Tento výtěžek je ve srovnání s jinými studiemi bakteriálních represorů nadprůměrně vysoký (Nováková, 2017).

Pro použití v 2D NMR vazebných experimentech byl připraven ^{15}N izotopově obohacený LutR₂₋₇₈, jehož výtěžek byl 22,3 mg purifikovaného proteinu na 1 l bakteriální kultury (2,9 mg na 1 g vlhké biomasy). Ve srovnání s nativní formou proteinu to bylo o něco méně, jelikož pro izotopové značení byly bakterie pěstovány v minimálním médiu, které je chudé na živiny. Navzdory tomu však bylo získané množství purifikovaného proteinu pro NMR experimenty dostačující.

Další částí, které byla v této diplomové práci věnována pozornost, byl návrh vhodného DNA duplexu. Jako první byl navržen DNA duplex O₁₅, který byl odvozen ze sekvence, pro niž byla potvrzena vazba v experimentech Chiu *et al.* (2014). Ti pomocí EMSA testů ověřili, že je pro vazbu LutR nezbytná právě tato invertovaná repetice přítomná v obou regulačních oblastech genů: *lutABC* a *lutP*. Jejich testy však probíhaly na delším úseku DNA (více než 100 bp) a s použitím celého proteinu s oběma doménami, a proto bylo potřeba ověřit vazbu i pro samostatnou DBD a kratší sekvenci DNA duplexu. Použití co nejkratší sekvence, která si zachovává vazebnou afinitu k proteinu a zároveň je stabilní, je klíčovou podmínkou úspěšné tvorby krystalů s dobrými difrakčními vlastnostmi.

Pro ověření vazby LutR₂₋₇₈ a duplexu O₁₅ byly provedeny experimenty metodami EMSA, NMR a SEC (kapitola 5.3). Metodami EMSA a NMR se podařilo vazbu LutR₂₋₇₈ a DNA duplexu O₁₅ ověřit. Výsledky analýzy vazby proteinu a DNA O₁₅ pomocí analytické SEC naopak nebyly dostatečně průkazné. Vrcholy signálů pro samostatnou DNA a její potenciální komplex s proteinem byly v chromatogramu příliš blízko sebe, což znemožnilo jasné vyhodnocení a interpretaci. Dalším důvodem, proč bylo vyhodnoceno, že SEC pro dané účely nemusí být vhodnou metodou, bylo to, že použitá kolona byla kalibrovaná pro globulární proteiny, zatímco DNA jako lineární molekula se v daném chromatografickém nosiči může pohybovat jinou rychlostí.

Výsledky NMR a analytických SEC experimentů zároveň poukazovaly na možnou heterogenitu a konformační nestabilitu DNA duplexu O₁₅ (kapitoly 5.2.2, 5.3.2. a 5.3.3). Sekvence tohoto duplexu je palindrom (5'-GGTCATCAGATGACC-3'), který teoreticky může tvořit vlásenku až o délce 7 párů bazí, kdy v očku vlásenky zůstane pouze jedna báze. Z výsledků výše uvedených experimentů vyplynulo, že se v roztoku nacházelo více forem DNA duplexu, které mezi sebou pravděpodobně mohly přecházet. Jednou z těchto forem tak mohla být i vlásenka.

Při návrhu dalších DNA duplexů byla palindromová sekvence LutR operátoru využita jako minimální sekvence nutná pro vazbu proteinu. Sekvence konců tohoto duplexu pak byla měněna tak, aby konce byly optimální pro vytvoření stabilního a homogenního duplexu. Pro ověření tvorby a stability duplexu byla používána metoda 1D NMR (viz kapitola 5.2.2), která společně s 2D NMR vazebnými experimenty sloužila pro rozhodování, které protein-DNA komplexy použít pro následnou krystalizaci. Návrh dalších duplexů byl pak veden výsledky dílčích krystalizačních pokusů. Rozhodující byla nejen schopnost daného komplexu vytvořit krystaly, ale také především difrakční vlastnosti získaných krystalů.

Krystalizace proteinů a jejich komplexů je proces, který ovlivňuje celá řada faktorů (shrnutí například v Bergfors, 2021). Při hledání krystalizačních podmínek se nejčastěji testují různé krystalizační roztoky (často velmi komplexní směsi obsahující mnoho různých druhů chemických sloučenin), experimentální teplota či různé techniky krystalizace (shrnutí například v Bergfors, 2021). Klíčovým faktorem úspěšné krystalizace je však čistota proteinu a jeho homogenita. Při krystalizaci komplexu je nutné sledovat čistotu a homogenitu nejen každé jednotlivé složky zvlášť, ale také komplexu jako celku (Hollis, 2007). Tak tomu bylo i v případě komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA. Proto bylo kromě přípravy čistého proteinu v této práci věnováno velké úsilí také přípravě a charakterizaci DNA duplexů. Pro růst krystalů je totiž třeba, aby byl výsledný protein-DNA komplex stabilní a homogenní (Hollis, 2007).

Při krystalizaci LutR₂₋₇₈ v komplexu s DNA byla náhodně i systematicky měněna řada parametrů, které ovlivňují krystalizaci. Začínalo se s komerčními sadami krystalizačních roztoků, v rámci optimalizace krystalizace pak byla měněna jejich koncentrace či upravováno jejich složení přidávkem aditiv. Mezi další způsoby optimalizace patřily například změny koncentrace roztoku komplexu, krystalizace při různých teplotách, zpomalování difúze par použitím Alova oleje a další (popsáno v kapitolách 4.6.2.1 a 5.4). Celkový počet různých otestovaných podmínek pro krystalizaci se blížil 2500. Jak se ale ukázalo, největší vliv na růst a kvalitu krystalů měla délka a sekvence použitého DNA duplexu. Na začátku krystalizačních experimentů byla jako inspirace pro délku duplexů využita analýza známých struktur homologních proteinů AraR a NagR (Jain a Nair, 2013; Fillenberg *et al.*, 2015). Dále byl návrh sekvence duplexů veden průběžnými výsledky krystalizačních experimentů, jak již bylo zmíněno výše.

Celkem bylo připraveno 8 různých DNA duplexů s cílem dosáhnout sekvence optimální pro tvorbu stabilního protein-DNA komplexu, který je schopen tvořit krystal a v něm optimální

krystalové kontakty. Ačkoli 6 z 8 komplexů se podařilo úspěšně zkrystalizovat, výsledné krystaly byly často nestabilní, křehké a difraktovaly RTG záření do velmi nízkého rozlišení. Toto naznačuje slabé krystalové kontakty a vysoký obsah rozpouštědla. Obě tyto vlastnosti jsou popisovány v literatuře jako typické pro protein-DNA komplexy (shrnutí například v Ducruix a Giegé, 2000) a jsou často důvodem limitovaného maximálního rozlišení, kterého je pro krystaly těchto komplexů možné dosáhnout.

Výrazného zlepšení difrakční kvality krystalů bylo v této diplomové práci dosaženo využitím stabilního DNA duplexu s délkou optimální pro tvorbu krystalových kontaktů. Použití duplexu ON₁₉ vedlo k posílení symetrie v krystalu, jehož výsledkem byl krystal s menší elementární buňkou v porovnání s krystalem získaným pro duplex ON₂₀. Konkrétně měly krystalové kontakty největší vliv na mřížový parametr *c*, který se zmenšil cca o polovinu z hodnoty 236,6 Å na 115,9 Å (viz Tabulky 3 a 4).

V rámci této diplomové práce byla pro komplex LutR₂₋₇₈ s duplexem ON₁₉ získána kompletní sada difrakčních dat do rozlišení 2,8 Å. Kvalita dat i rozlišení by měly být dostatečné pro získání strukturní informace o vazbě proteinu na DNA. Difrakční data budou využita k vyřešení krystalové struktury metodou molekulového nahrazení. Jako modely budou použity struktury homologních proteinů dostupných v PDB databázi (Tabulka 5), případně model vytvořený pomocí nástroje AlphaFold (Senior *et al.*, 2020; Jumper *et al.*, 2021; viz Obrázek 7).

Tabulka 5: Přehled publikovaných struktur protein-DNA komplexů s homologními proteiny pro použití metody molekulového nahrazení

Protein-DNA komplex	PDB kód	Rozlišení [Å]	Zdroj
DBD AraR + ORA1	4EGY	2,30	Jain a Nair, 2013
DBD AraR + ORR3	4EGZ	2,30	Jain a Nair, 2013
DBD AraR + ORR3 (mut)	4H0E	1,97	Jain a Nair, 2013
DBD AraR + ORE1	5D4R	2,07	Jain <i>et al.</i> , 2016
DBD AraR + ORX1	5D4S	1,97	Jain <i>et al.</i> , 2016
DBD NagR + DNA	4U0Y	1,91	Fillenberg <i>et al.</i> , 2015
NagR + DNA	4WWC	2,90	Fillenberg <i>et al.</i> , 2015

Získaná struktura se stane základem pro porozumění specifitě vazby DBD LutR k DNA. Bude možné objasnit roli N-koncové části DBD pro vazbu DNA a formulovat hypotézu, proč delece aminokyselinových zbytků 1-21 v LutR u domestikovaných kmenů *B. subtilis* zcela mění DNA vazebnou specifitu a funkci LutR.

Paralelně se strukturální studií LutR₂₋₇₈ prezentovanou v této diplomové práci probíhala ve školící laboratoři studie zaměřená na DBD zkrácené varianty LutR – LutR₂₂₋₇₈. Protein LutR₂₂₋₇₈ a jeho komplexy s DNA duplexy, které byly odvozeny od sekvencí některých rozpoznávaných DNA operátorů (İrigül-Sönmez *et al.*, 2014), vykazovaly značnou flexibilitu a heterogenitu (nepublikované výsledky). Krystalografie tedy nebude vhodnou metodou pro strukturální studie této varianty LutR a pro získání 3D struktury LutR₂₂₋₇₈ v komplexu s DNA bude využito metody NMR.

7 Souhrn

Výsledky získané v průběhu vypracování této diplomové práce přispěly do dlouhodobého projektu řešeného ve školící laboratoři, který je zaměřen na strukturní studie bakteriálních metabolických represorů.

V rámci této diplomové práce bylo dosaženo následujícího:

- Rekombinantní heterologní expresí v *E. coli* byl připraven LutR₂₋₇₈ jak v nativní formě, tak ve formě obohacené izotopem ¹⁵N pro 2D NMR experimenty.
- Obě formy LutR₂₋₇₈ (nativní i značená ¹⁵N) byly purifikovány v dostatečném množství a čistotě pro následné funkční a strukturní studie.
- Pro ověření vazby LutR₂₋₇₈ a DNA byl navržen DNA duplex O₁₅ odvozený od sekvence známých operátorů.
- Pomocí NMR a EMSA experimentů byla ověřena vazba LutR₂₋₇₈ k DNA duplexu O₁₅. Výsledky analytické SEC nebylo možné jednoznačně interpretovat jako vazbu proteinu k DNA. Výsledky NMR experimentů také ukázaly, že DNA duplex O₁₅ nebyl pro svou dynamičnost a potenciální heterogenitu pro krystalizační experimenty vhodný.
- Pro rychlé a materiálově úsporné ověření tvorby a stability DNA duplexů pro vazebné a krystalizační experimenty byla zavedena metoda měření 1D ¹H NMR spekter.
- Byly navrženy další DNA duplexy upravené pro krystalizaci komplexu LutR₂₋₇₈ s DNA. Jejich návrh byl inspirován délkou DNA z publikovaných krystalových struktur příbuzných proteinů s DNA. Na základě průběžných výsledků krystalizačních experimentů a difrakčních měření pak byla sekvence DNA duplexů dále optimalizována.
- Nejvyšší kvalita krystalů vhodných pro rentgenostrukturní analýzu byly získány pro komplex LutR₂₋₇₈ s DNA duplexem ON₁₉. Krystaly difraktovaly RTG záření do rozlišení 2,8 Å. Nasnímaná difrakční data budou ve školící laboratoři použita k vyřešení krystalové struktury na úrovni atomů.

8 Seznam použité literatury

- ABOLA, E., KUHN, P., EARNEST, T. & STEVENS, R. C. 2000. Automation of X-ray crystallography. *Nature Structural Biology*, 7 Suppl, 973-977. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/80754>.
- AGUILAR, C., VLAMAKIS, H., LOSICK, R. & KOLTER, R. 2007. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Current Opinion in Microbiology*, 10, 638-643. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.006>.
- ARAVIND, L., ANANTHARAMAN, V., BALAJI, S., BABU, M. M. & IYER, L. M. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 231-262. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.12.008>.
- ATSUMI, K., OIWA, R. & OMURA, S. 1975. Production of bacillin by *Bacillus* sp. strain no. KM-208 and its identity with tetaine (bacilysin). *The Journal of Antibiotics*, 28, 77-78. Dostupné také z: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.77>.
- BAI, X. C., MCMULLAN, G. & SCHERES, S. H. 2015. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends in Biochemical Sciences*, 40, 49-57. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.005>.
- BAILEY, T. L., BODEN, M., BUSKE, F. A., FRITH, M., GRANT, C. E., CLEMENTI, L., REN, J., LI, W. W. & NOBLE, W. S. 2009. MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37, W202-W208. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp335>.
- BAILEY, T. L., JOHNSON, J., GRANT, C. E. & NOBLE, W. S. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Research*, 43, W39-W49. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
- BALLEZA, E., LOPEZ-BOJORQUEZ, L. N., MARTINEZ-ANTONIO, A., RESENDIS-ANTONIO, O., LOZADA-CHAVEZ, I., BALDERAS-MARTINEZ, Y. I., ENCARNACION, S. & COLLADO-VIDES, J. 2009. Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 133-151. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x>.
- BERGFORS, T. M. (ed.) 2021. Protein crystallization. E-kniha, 3. vydání. International University Line. ISBN 978-0-9720774-7-7.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N. & BOURNE, P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235-242. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. W. 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 57-65. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro787>.
- BROWNING, D. F. & BUSBY, S. J. W. 2016. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 638-650. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.103>.
- BROWNING, D. F., BUTALA, M. & BUSBY, S. J. W. 2019. Bacterial transcription factors: Regulation by Pick "N" Mix. *Journal of Molecular Biology*, 431, 4067-4077. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.011>.
- BÜRKLEN, L., SCHÖCK, F. & DAHL, M. K. 1998. Molecular analysis of the interaction between the *Bacillus subtilis* trehalose repressor TreR and the *tre* operator. *Molecular and General Genetics MGG*, 260, 48-55. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s004380050869>.

- CARRONI, M. & SAIBIL, H. R. 2016. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes. *Methods*, 95, 78-85. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.023>.
- COLLEDGE, V. L., FOGG, M. J., LEVDIKOV, V. M., LEECH, A., DODSON, E. J. & WILKINSON, A. J. 2011. Structure and organisation of SinR, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 411, 597-613. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.06.004>.
- COMINO, N., CIFUENTE, J. O., MARINA, A., ORRANTIA, A., EGUSKIZA, A. & GUERIN, M. E. 2017. Mechanistic insights into the allosteric regulation of bacterial ADP-glucose pyrophosphorylases. *Journal of Biological Chemistry*, 292, 6255-6268. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773408>.
- D'ARCY, A., ELMORE, C., STIHLE, M. & JOHNSTON, J. E. 1996. A novel approach to crystallising proteins under oil. *Journal of Crystal Growth*, 168, 175-180. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(96\)00351-X](https://doi.org/10.1016/0022-0248(96)00351-X).
- DESSAU, M. A. & MODIS, Y. 2011. Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of Visualized Experiments*. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3791/2285>.
- DROZDETSKIY, A., COLE, C., PROCTER, J. & BARTON, G. J. 2015. JPred4: a protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, 43, W389-W394. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>.
- DUCRUIX, A. & GIEGÉ, R. 2000. Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach. 2. vydání. Oxford University Press, Oxford. ISBN 978-0199636785.
- EVANS, P. & MCCOY, A. 2008. An introduction to molecular replacement. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 64, 1-10. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1107/S09074444907051554>.
- FEKLÍSTOV, A., SHARON, B. D., DARST, S. A. & GROSS, C. A. 2014. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual Review of Microbiology*, 68, 357-376. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155737>.
- FILLENBERG, S. B., GRAU, F. C., SEIDEL, G. & MULLER, Y. A. 2015. Structural insight into operator dre-sites recognition and effector binding in the GntR/HutC transcription regulator NagR. *Nucleic Acids Res*, 43, 1283-1296. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1374>.
- FUJITA, Y. & FUJITA, T. 1987. The gluconate operon *gnt* of *Bacillus subtilis* encodes its own transcriptional negative regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 4524. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.13.4524>.
- GOELZER, A., BEKKAL BRIKCI, F., MARTIN-VERSTRAETE, I., NOIROT, P., BESSIERES, P., AYMERICH, S. & FROMION, V. 2008. Reconstruction and analysis of the genetic and metabolic regulatory networks of the central metabolism of *Bacillus subtilis*. *BMC Systems Biology*, 2, 20. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1186/1752-0509-2-20>.
- GORREC, F. 2009. The MORPHEUS protein crystallization screen. *Journal of Applied Crystallography*, 42, 1035-1042. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1107/s0021889809042022>.
- HAMON, M. A. & LAZAZZERA, B. A. 2001. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 42, 1199-1209. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02709.x>.

- HAYDON, D. J. & GUEST, J. R. 1991. A new family of bacterial regulatory proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 79, 291-296. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04544.x>.
- HELLMAN, L. M. & FRIED, M. G. 2007. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein–nucleic acid interactions. *Nature Protocols*, 2, 1849-1861. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.249>.
- HOLLIS, T. 2007. Crystallization of protein-DNA complexes. *Ve: WALKER, J. M. & DOUBLIÉ, S. (eds.) Macromolecular Crystallography Protocols: Volume 1, Preparation and Crystallization of Macromolecules*. Humana Press, Totowa. ISBN 978-1-58829-292-6.
- CHAI, Y., KOLTER, R. & LOSICK, R. 2009. A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 191, 2423-2430. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1128/jb.01464-08>.
- CHAYEN, N. E. 1997. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger protein crystals. *Journal of Applied Crystallography*, 30, 198-202. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1107/S0021889896013532>.
- CHIU, K.-C., LIN, C.-J. & SHAW, G.-C. 2014. Transcriptional regulation of the L-lactate permease gene *lutP* by the LutR repressor of *Bacillus subtilis* RO-NN-1. *Microbiology*, 160, 2178-2189. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1099/mic.0.079806-0>.
- CHU, F., KEARNS, D. B., BRANDA, S. S., KOLTER, R. & LOSICK, R. 2006. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 59, 1216-1228. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05019.x>.
- İRIGÜL-SÖNMEZ, Ö., KÖROĞLU, T. E., ÖZTÜRK, B., KOVÁCS, Á. T., KUIPERS, O. P. & YAZGAN-KARATAŞ, A. 2014. In *Bacillus subtilis* LutR is part of the global complex regulatory network governing the adaptation to the transition from exponential growth to stationary phase. *Microbiology*, 160, 243-260. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1099/mic.0.064675-0>.
- JACOB, F. & MONOD, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3, 318-356. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80072-7](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80072-7).
- JAIN, D. 2015. Allosteric control of transcription in GntR family of transcription regulators: a structural overview. *IUBMB Life*, 67, 556-563. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1002/iub.1401>.
- JAIN, D. & NAIR, D. T. 2013. Spacing between core recognition motifs determines relative orientation of AraR monomers on bipartite operators. *Nucleic Acids Research*, 41, 639-647. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gks962>.
- JAIN, D., NARAYANAN, N. & NAIR, D. T. 2016. Plasticity in repressor-DNA interactions neutralizes loss of symmetry in bipartite operators. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 1235-1242. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689695>.
- JEONG, Y., SHIN, H., SEO, S. W., KIM, D., CHO, S. & CHO, B.-K. 2017. Elucidation of bacterial translation regulatory networks. *Current Opinion in Systems Biology*, 2, 84-90. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.01.009>.
- JERS, C., PEDERSEN, M. M., PASPALIARI, D. K., SCHÜTZ, W., JOHNSON, C., SOUFI, B., MACEK, B., JENSEN, P. R. & MIJAKOVIC, I. 2010. *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Molecular Microbiology*, 77, 287-299. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07227.x>.

JUMPER, J., EVANS, R., PRITZEL, A., GREEN, T., FIGURNOV, M., RONNEBERGER, O., TUNYASUVUNAKOOL, K., BATES, R., ŽÍDEK, A., POTAPENKO, A., BRIDGLAND, A., MEYER, C., KOHL, S. A. A., BALLARD, A. J., COWIE, A., ROMERA-PAREDES, B., NIKOLOV, S., JAIN, R., ADLER, J., BACK, T., PETERSEN, S., REIMAN, D., CLANCY, E., ZIELINSKI, M., STEINEGGER, M., PACHOLSKA, M., BERGHAMMER, T., BODENSTEIN, S., SILVER, D., VINYALS, O., SENIOR, A. W., KAVUKCUOGLU, K., KOHLI, P. & HASSABIS, D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596, 583-589. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

KAMADA, M., HASE, S., FUJII, K., MIYAKE, M., SATO, K., KIMURA, K. & SAKAKIBARA, Y. 2015. Whole-genome sequencing and comparative genome analysis of *Bacillus subtilis* strains isolated from non-salted fermented soybean foods. *PLoS One*, 10, e0141369-e0141369. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141369>.

KANTARDJIEFF, K. A. & RUPP, B. 2003. Matthews coefficient probabilities: improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein–nucleic acid complex crystals. *Protein Science*, 12, 1865-1871. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1110/ps.0350503>.

KARPLUS, P. A. & DIEDERICHS, K. 2012. Linking crystallographic model and data quality. *Science*, 336, 1030-1033. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1126/science.1218231>.

KEARNS, D. B., CHU, F., BRANDA, S. S., KOLTER, R. & LOSICK, R. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55, 739-749. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04440.x>.

KONSORCIUM UniProt. 2020. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Research*, 49, D480-D489. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1100>.

KÖROĞLU, T. E., KURT-GÜR, G., ÜNLÜ, E. C. & YAZGAN-KARATAŞ, A. 2008. The novel gene *yyfI* in *Bacillus subtilis* is essential for bacilysin biosynthesis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 471-479. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1007/s10482-008-9265-8>.

KUBO, Y., ROONEY, A. P., TSUKAKOSHI, Y., NAKAGAWA, R., HASEGAWA, H. & KIMURA, K. 2011. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6463-6469. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1128/AEM.00448-11>.

KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A. M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M. G., BESSIÈRES, P., BOLOTIN, A., BORCHERT, S., BORRISS, R., BOURSIER, L., BRANS, A., BRAUN, M., BRIGNELL, S. C., BRON, S., BROUILLET, S., BRUSCHI, C. V., CALDWELL, B., CAPUANO, V., CARTER, N. M., CHOI, S. K., CODANI, J. J., CONNERTON, I. F., CUMMINGS, N. J., DANIEL, R. A., DENIZOT, F., DEVINE, K. M., DÜSTERHÖFT, A., EHRLICH, S. D., EMMERSON, P. T., ENTIAN, K. D., ERRINGTON, J., FABRET, C., FERRARI, E., FOULGER, D., FRITZ, C., FUJITA, M., FUJITA, Y., FUMA, S., GALIZZI, A., GALLERON, N., GHIM, S. Y., GLASER, P., GOFFEAU, A., GOLIGHTLY, E. J., GRANDI, G., GUISEPPI, G., GUY, B. J., HAGA, K., HAIECH, J., HARWOOD, C. R., HÉNAUT, A., HILBERT, H., HOLSAPPEL, S., HOSONO, S., HULLO, M. F., ITAYA, M., JONES, L., JORIS, B., KARAMATA, D., KASAHARA, Y., KLAERR-BLANCHARD, M., KLEIN, C., KOBAYASHI, Y., KOETTER, P., KONINGSTEIN, G., KROGH, S., KUMANO, M., KURITA, K., LAPIDUS, A., LARDINOIS, S., LAUBER, J., LAZAREVIC, V., LEE, S. M., LEVINE, A., LIU, H., MASUDA, S., MAUËL, C., MÉDIGUE, C., MEDINA, N., MELLADO, R. P., MIZUNO, M., MOESTL, D., NAKAI, S., NOBACK, M., NOONE, D., O'REILLY, M., OGAWA, K., OGIWARA, A., OUDEGA, B., PARK, S. H., PARRO, V., POHL,

- T. M., PORTETELLE, D., PORWOLLIK, S., PRESCOTT, A. M., PRESECAN, E., PUJIC, P., PURNELLE, B., et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390, 249-256. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/36786>.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- LASKARIS, P., TOLBA, S., CALVO-BADO, L. & WELLINGTON, L. 2010. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. *Environmental Microbiology*, 12, 783-796. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02125.x>.
- LEWIS, M. 2011. A tale of two repressors. *Journal of Molecular Biology*, 409, 14-27. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.023>.
- MACOL, C. P., TSURUTA, H., STEC, B. & KANTROWITZ, E. R. 2001. Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase. *Nature Structural Biology*, 8, 423-426. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/87582>.
- MIELICH-SÜSS, B. & LOPEZ, D. 2015. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 17, 555-565. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12527>.
- MILTON, M. E., DRAUGHN, G. L., BOBAY, B. G., STOWE, S. D., OLSON, A. L., FELDMANN, E. A., THOMPSON, R. J., MYERS, K. H., SANTORO, M. T., KEARNS, D. B. & CAVANAGH, J. 2020. The solution structures and interaction of SinR and SinI: elucidating the mechanism of action of the master regulator switch for biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 432, 343-357. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.08.019>.
- MOLLE, V., FUJITA, M., JENSEN, S. T., EICHENBERGER, P., GONZÁLEZ-PASTOR, J. E., LIU, J. S. & LOSICK, R. 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 50, 1683-1701. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x>.
- MORENO-CAMPUZANO, S., JANGA, S. C. & PÉREZ-RUEDA, E. 2006. Identification and analysis of DNA-binding transcription factors in *Bacillus subtilis* and other *Firmicutes* - a genomic approach. *BMC Genomics*, 7, 147-157. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-147>.
- MUELLER, U., FÖRSTER, R., HELLMIG, M., HUSCHMANN, F. U., KASTNER, A., MALECKI, P., PÜHRINGER, S., RÖWER, M., SPARTA, K., STEFFIEN, M., ÜHLEIN, M., WILK, P. & WEISS, M. S. 2015. The macromolecular crystallography beamlines at BESSY II of the Helmholtz-Zentrum Berlin: current status and perspectives. *The European Physical Journal Plus*, 130, 141. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1140/epjp/i2015-15141-2>.
- NEWMAN, J. A., RODRIGUES, C. & LEWIS, R. J. 2013. Molecular basis of the activity of SinR protein, the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 10766-10778. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455592>.
- NOVÁKOVÁ, M. 2017. Příprava, charakterizace a krystalizace metabolických represorů z bakterie *Bacillus subtilis*. Diplomová práce. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Praha.
- ORTS, J. & GOSSERT, A. D. 2018. Structure determination of protein-ligand complexes by NMR in solution. *Methods*, 138-139, 3-25. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.01.019>.

- ÖZCENGİZ, G. & ÖĞÜLÜR, İ. 2015. Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic. *New Biotechnology*, 32, 612-619. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.006>.
- PARDEE, A. B., JACOB, F. & MONOD, J. 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of "inducibility" in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1, 165-178. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(59\)80045-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(59)80045-0).
- PÉREZ-RUEDA, E. & COLLADO-VIDES, J. 2000. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 28, 1838-1847. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/28.8.1838>
- PROCHÁZKOVÁ, K., ČERMÁKOVÁ, K., PACHL, P., SIEGLOVÁ, I., FÁBRY, M., OTWINOWSKI, Z. & ŘEZÁČOVÁ, P. 2012. Structure of the effector-binding domain of the arabinose repressor AraR from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography*, 68, 176-185. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1107/s090744491105414x>.
- PURSLOW, J. A., KHATIWADA, B., BAYRO, M. J. & VENDITTI, V. 2020. NMR methods for structural characterization of protein-protein complexes. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 9. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00009>.
- RIGALI, S., DEROUAUX, A., GIANNOTTA, F. & DUSART, J. 2002. Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 12507-12515. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110968200>.
- RUPP, B. 2009. Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology. 1. vydání. Garland Science, New York. ISBN 978-0815340812.
- ŘEZÁČOVÁ, P., KOŽÍŠEK, M., MOY, S. F., SIEGLOVÁ, I., JOACHIMIÁK, A., MACHIUS, M. & OTWINOWSKI, Z. 2008. Crystal structures of the effector-binding domain of repressor Central glycolytic gene Regulator from *Bacillus subtilis* reveal ligand-induced structural changes upon binding of several glycolytic intermediates. *Molecular Microbiology*, 69, 895-910. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06318.x>.
- ŘEZÁČOVÁ, P., KREJČÍŘÍKOVÁ, V., BOREK, D., MOY, S. F., JOACHIMIÁK, A. & OTWINOWSKI, Z. 2007. The crystal structure of the effector-binding domain of the trehalose repressor TreR from *Bacillus subtilis* 168 reveals a unique quarternary assembly. *Proteins*, 69, 679-682. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1002/prot.21516>.
- SENIOR, A. W., EVANS, R., JUMPER, J., KIRKPATRICK, J., SIFRE, L., GREEN, T., QIN, C., ŽÍDEK, A., NELSON, A. W. R., BRIDGLAND, A., PENEDONES, H., PETERSEN, S., SIMONYAN, K., CROSSAN, S., KOHLI, P., JONES, D. T., SILVER, D., KAVUKCUOGLU, K. & HASSABIS, D. 2020. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature*, 577, 706-710. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1923-7>.
- SHAPIRO, A. L., VIÑUELA, E. & V. MAIZEL, J. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28, 815-820. Dostupné také z: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9).
- SHI, L., PIGEONNEAU, N., VENTROUX, M., DEROUICHE, A., BIDNENKO, V., MIJAKOVIC, I. & NOIROT-GROS, M.-F. 2014. Protein-tyrosine phosphorylation interaction network in *Bacillus subtilis* reveals new substrates, kinase activators and kinase cross-talk. *Frontiers in Microbiology*, 5, 538. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00538>.

- SHIMIZU, K. 2013. Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism. *ISRN biochemistry*, 2013, 645983-645983. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1155/2013/645983>.
- SHIMIZU, Y., SHIMIZU, N. & HAYASHI, M. 1973. In vitro repression of transcription of the tryptophan operon by *trp* repressor. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 1990-1994. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.7.1990>.
- SHULMAN, A., ZALYAPIN, E., VYAZMENSKY, M., YIFRACH, O., BARAK, Z. E. & CHIPMAN, D. M. 2008. Allosteric regulation of *Bacillus subtilis* threonine deaminase, a biosynthetic threonine deaminase with a single regulatory domain. *Biochemistry*, 47, 11783-11792. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/bi800901n>.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. & WARD, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50, 1-17. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1139/w03-076>.
- SCHÖCK, F. & DAHL, M. K. 1996. Expression of the *tre* operon of *Bacillus subtilis* 168 is regulated by the repressor TreR. *Journal of Bacteriology*, 178, 4576-4581. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4576-4581.1996>.
- SPACKMAN, D. H., STEIN, W. H. & MOORE, S. 1958. Automatic recording apparatus for use in chromatography of amino acids. *Analytical Chemistry*, 30, 1190-1206. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1021/ac60139a006>.
- STOLS, L., GU, M., DIECKMAN, L., RAFFEN, R., COLLART, F. R. & DONNELLY, M. I. 2002. A new vector for high-throughput, ligation-independent cloning encoding a Tobacco Etch Virus protease cleavage site. *Protein Expression and Purification*, 25, 8-15. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1603>.
- STÜLKE, J. & HILLEN, W. 2000. Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species. *Annual Review of Microbiology*, 54, 849-880. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.849>.
- SUGIKI, T., KOBAYASHI, N. & FUJIWARA, T. 2017. Modern technologies of solution nuclear magnetic resonance spectroscopy for three-dimensional structure determination of proteins open avenues for life scientists. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 328-339. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2017.04.001>.
- SUMI, C. D., YANG, B. W., YEO, I.-C. & HAHM, Y. T. 2014. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Canadian Journal of Microbiology*, 61, 93-103. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>.
- SUVOROVA, I. A., KOROSTELEV, Y. D. & GELFAND, M. S. 2015. GntR family of bacterial transcription factors and their DNA binding motifs: structure, positioning and co-evolution. *PLoS One*, 10, e0132618. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132618>.
- ŠKERLOVÁ, J., FÁBRY, M., HUBÁLEK, M., OTWINOWSKI, Z. & ŘEZÁČOVÁ, P. 2014. Structure of the effector-binding domain of deoxyribonucleoside regulator DeoR from *Bacillus subtilis*. *The FEBS Journal*, 281, 4280-4292. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1111/febs.12856>.
- ŠKERLOVÁ, J. 2015. Understanding the interaction of antibodies and transcription factors with their ligands through structural biology. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie, Praha.

- VARADI, M., ANYANGO, S., DESHPANDE, M., NAIR, S., NATASSIA, C., YORDANOVA, G., YUAN, D., STROE, O., WOOD, G., LAYDON, A., ŽÍDEK, A., GREEN, T., TUNYASUVUNAKOOL, K., PETERSEN, S., JUMPER, J., CLANCY, E., GREEN, R., VORA, A., LUTFI, M., FIGURNOV, M., COWIE, A., HOBBS, N., KOHLI, P., KLEYWEGT, G., BIRNEY, E., HASSABIS, D. & VELANKAR, S. 2021. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, gkab1061. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.
- VISWESWARIAH, S. S. & BUSBY, S. J. W. 2015. Evolution of bacterial transcription factors: how proteins take on new tasks, but do not always stop doing the old ones. *Trends in Microbiology*, 23, 463-467. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.04.009>.
- WASHBURN, R. S. & GOTTESMAN, M. E. 2015. Regulation of transcription elongation and termination. *Biomolecules*, 5, 1063-1078. Dostupné také z: <https://doi.org/10.3390/biom5021063>.
- WINKLER, W. C. & BREAKER, R. R. 2005. Regulation of bacterial gene expression by riboswitches. *Annual Review of Microbiology*, 59, 487-517. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121336>.
- YEO, H. K., PARK, Y. W. & LEE, J. Y. 2017. Structural basis of operator sites recognition and effector binding in the TetR family transcription regulator FadR. *Nucleic Acids Research*, 45, 4244-4254. Dostupné také z: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx009>.