

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Zdeňka Uhrová

Strukturní analýza a inhibice karbonických anhydras patogenních
kvasinek rodu *Candida*

Structural analysis and inhibition of Carbonic anhydrases
of the pathogenic *Candida* yeasts

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Olga Heidinsfeld CSc.

Konzultant: Ing. Jiří Dostál, Ph.D.

Praha 2025

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovávala 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.

Při přípravě této bakalářské práce jsem využila GPT-4o za účelem pomoci s úpravou frázování některých vět, překladu a automatické kontroly gramatiky. Klíčové prompty, které jsem použila, jsou následující: *zkontroluj gramatiku tohoto textu, najdi synonymum, vytvoř stylistický návrh*. Po použití tohoto softwaru jsem zkontrolovala a upravila obsah podle potřeby a plně přejímám odpovědnost za výslednou podobu práce.

V Praze dne 15. 5. 2025

.....

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zaměřuje na studium β -karbonické anhydrasy CpNce103p z patogenní kvasinky *Candida parapsilosis* a byla řešena v průběhu dlouhodobého projektu v laboratoři ÚOCHB AV ČR. Karbonická anhydrasa je metaloenzym se zinečnatým iontem v aktivním místě, který katalyzuje přeměnu oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan a hraje zásadní roli v udržování homeostáze v buňce. Vzhledem ke strukturální odlišnosti karbonických anhydras u savců a kvasinek představuje tento enzym potenciální cíl pro vývoj nových antimykotik. Cílem této práce bylo porovnání exprese rekombinantní formy enzymu $\Delta 42_CpNce103p$ ve dvou kmenech *Escherichia coli* – LOBSTR a BL21 (DE3) RIL za účelem přípravy dostatečného množství enzymu pro rentgenostrukturní analýzy. Získaná struktura $\Delta 42_CpNce103p$ z *C. parapsilosis* společně se strukturou karbonické anhydrasy z *C. albicans* se staly základem pro návrh inhibitorů pomocí molekulového modelování. Vybrané sloučeniny byly následně testovány. Ve studovaném souboru sloučenin vykazoval nejlepší inhibiční vlastnosti trifluoromethylsulfonamid. Výsledky této práce přispívají k pochopení vlastností β - karbonických anhydras u patogenních kvasinek rodu *Candida* a mohou sloužit jako základ pro vývoj cílené antimykotické terapie.

Klíčová slova: Karbonická anhydrasa, patogenní kvasinky, krystalová struktura, inhibitor

Abstract

This bachelor's thesis focuses on the study of the β -carbonic anhydrase CpNce103p from the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. The research was conducted as part of a long-term project in the laboratory of the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences (CAS). Carbonic anhydrase is a metalloenzyme with a zinc ion in its active site that catalyses the reversible conversion of carbon dioxide to bicarbonate, playing a vital role in maintaining cellular homeostasis. Owing to structural differences between mammalian and yeast carbonic anhydrases, this enzyme represents a promising target for the development of novel antifungal agents. The aim of this work was to compare the expression of the recombinant enzyme $\Delta 42_CpNce103p$ in two *Escherichia coli* strains—LOBSTR and BL21(DE3) RIL in order to obtain sufficient quantities of the protein for X-ray crystallographic analysis. The obtained structure of $\Delta 42_CpNce103p$ from *C. parapsilosis*, together with the known structure of carbonic anhydrase from *C. albicans*, served as a basis for the rational design of inhibitors using molecular modelling. Selected compounds were subsequently tested, and among them, trifluoromethyl sulphonamide showed the strongest inhibitory properties. The results of this thesis contribute to the understanding of β -carbonic anhydrases in pathogenic yeasts of the genus *Candida* and may support the development of targeted antifungal therapies.

Key words: Carbonic anhydrase, pathogenic yeast, crystal structure, inhibitor

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí skupiny na ÚOCHB AV ČR Ing. Ivě Pichové, CSc., za příležitost pracovat s jejím skvělým týmem. Také bych chtěla poděkovat svému konzultantovi Ing. Jiřímu Dostálovi, Ph.D., za bezmeznou trpělivost a podporu při vypracovávání této práce. Děkuji také své vedoucí práce doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc., za dobré vedení a ochotu.

Poděkování patří také tvůrcům ChatGPT (OpenAI), který mi pomohl s jazykovou formulací, kontrolou stylu a udržováním duševní pohody při psaní této práce.

Obsah

1	Úvod	9
2	Literární přehled	10
2.1	Rod <i>CANDIDA</i>	10
2.1.1	<i>Candida parapsilosis</i>	10
2.2	Faktory virulence	10
2.2.1	Adheze	11
2.2.2	Tvorba biofilmu	11
2.2.3	Sekrece hydrolytických enzymů	11
2.2.4	Adaptace na environmentální změny	12
2.3	Karbonické anhydrasy a jejich evoluční skupiny	12
2.3.1	Karbonická anhydrasa třídy β	13
2.3.2	Inhibitory β -karbonických anhydras	14
2.4	Léčba kandidóz: přehled používaných antimykotik a nové terapeutické strategie	15
2.4.1	Klasické třídy antimykotik	15
2.5	Molekulární dokování v návrhu inhibitorů β -CA	16
3	Cíle práce	17
4	Materiál a metody	18
4.1	Použité chemikálie, enzymy a inhibitory	18
4.2	Použité expresní vektory	19
4.3	Přístroje	19
4.4	Software a výpočetní nástroje	20
4.5	Metody	20
4.5.1	Transformace buněk	20
4.5.2	Exprese rekombinantních proteinů	21
4.5.3	Izolace proteinů	21
4.5.4	Chromatografie	21
4.5.5	Zahuštění izolovaných proteinů	22
4.5.6	Stanovení koncentrace proteinů	22
4.5.7	SDS-PAGE	22
4.5.8	Krystalizace difuzí par	24
4.5.9	Testování inhibitorů β -karbonické anhydrasy	24
5	Výsledky	26

5.1	Expresní vektor	26
5.2	Exprese a purifikace $\Delta 42_CpNCE103p$	27
5.2.1	Exprese v <i>E.coli</i> BL21 (DE3) RIL a <i>E.coli</i> LOBSTR	27
5.2.2	Metaloafinitní chromatografie	28
5.2.3	Gelová chromatografie.....	29
5.3	Krystalizace $\Delta 42_CpNce103p$	31
5.3.1	Testování krystalů $\Delta 42_CpNce103p$ pomocí rentgenostrukturní analýzy	32
5.4	Molekulové dokování	33
5.5	Testování inhibitorů β -karbonické anhydrasy	33
6	Diskuze.....	36
6.1	Exprese a purifikace proteinu	36
6.2	Krystalizace a výběr podmínek	36
6.3	Význam referenčního inhibitoru acetazolamidu.....	37
6.4	Srovnání inhibitorů a vazebné energie.....	37
7	Závěr.....	38
	Seznam použité literatury	39

Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam
APS	Persíran amonný
AAA	Acetazolamid
BSA	Hovězí sérový albumin
CA	Karbonická anhydrasa
CpNce103p	β -CA z <i>Candida parapsilosis</i>
FPLC	Rychlá kapalinová chromatografie
GraphPad Prism	Software pro analýzu biologických dat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
IMAC	Metaloafinitní chromatografie
Ki	Inhibiční konstanta
ND	Nejsou data
PEG	Polyethylenglykol
RPM	Otáčky za minutu
RTG	Rentgenová strukturní analýza
SDS-PAGE	Elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid
α-CA	α -karbonická anhydrasa
β-CA	β -karbonická anhydrasa
Δ42_CpNce103p	Zkrácená forma enzymu CpNce103p

1 Úvod

Vysoká míra patogenity u kvasinek rodu *Candida* je dána jejich adaptabilitou na změny v prostředí, ve kterém se vyskytují. Jedním z faktorů, které ovlivňují schopnost reagovat na environmentální změny, je produkce karbonické anhydrasy (CA). CA je metaloenzym, jenž katalyzuje přeměnu oxidu uhličitého a vody na hydrogen uhličitán a proton, čímž reguluje acidobazickou rovnováhu.

Tento enzym je nezbytný pro udržení homeostáze v buňce a je tedy pro kvasinky nepostradatelný. Kvasinky produkují β -CA, jež jsou strukturně odlišné od CA v savčích buňkách, kde se primárně vyskytují α -CA. Odlišnost struktury β -CA u kvasinek nabízí možnost cílené inhibice s omezením toxicity pro hostile.

V této práci byla porovnávána exprese rekombinantní β -CA z *C. parapsilosis* (CpNce103p) ve dvou kmenech *Escherichia coli* – LOBSTR (Low Background Strain) a BL21 (DE3) RII. Cílem bylo zjistit, který z těchto kmenů je vhodnější pro přípravu rekombinantní β CA s ohledem na snížení pozadí kontaminujících proteinů při izolaci pomocí metaloafinitní chromatografie. Kmen LOBSTR byl navržen speciálně tak, aby eliminoval běžné kontaminanty při purifikaci His-značených proteinů pro rentgenostrukturní strukturní analýzu. [1]

Po expresi byla CA izolována v dostatečném množství a čistotě. V následném kroku byla CA použita pro krystalizační experimenty za účelem získání proteinový krystalů vhodných pro rentgenostrukturní strukturní analýzu. Z krystalů byla získána prostorová struktura enzymu pomocí rentgenové strukturní analýzy. V závěrečné fázi byly otestovány vybrané inhibitory, které byly navrženy pomocí molekulárního modelování.

Tato práce přispívá k hlubšímu porozumění struktury a funkce β -CA z *C. parapsilosis* a představuje krok směrem k cílenému vývoji inhibitorů s možným terapeutickým využitím. Zároveň navazuje na předchozí kvalifikační práce řešené ve stejné výzkumné skupině [2,3], jejichž poznatky byly využity jako východisko pro další rozšíření a zpracování daného tématu.

2 Literární přehled

Tato kapitola popisuje současné znalosti, které se týkají patogenních kvasinek rodu *Candida*, léčby kandidóz, karbonických anhydras a jejich struktur.

2.1 Rod *CANDIDA*

Rod *Candida* zahrnuje široké spektrum kvasinek. Tyto mikroorganismy se přirozeně vyskytují v prostředí bohatém na organické látky, jako je půda, povrch rostlin, zvířata a člověk. Kvasinky jsou běžnou součástí mikroflóry, ale mohou mít za určitých podmínek patologické účinky, které mohou vést k náročným systémovým infekcím [4].

Mezi klinicky významné druhy patří *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*. Tyto kvasinky se liší nejen morfologicky a ve způsobu kolonizace hostitele, ale také v míře virulence, schopnosti tvořit biofilm a rezistenci vůči antimykotikům [4]. Například *C. glabrata* je často tolerantní vůči azolovým antimykotikům, zatímco *C. parapsilosis* je charakteristická výraznými adhezivními schopnostmi a afinitou k povrchům lékařských implantátů.

2.1.1 *Candida parapsilosis*

Kvasinka *Candida parapsilosis* je častým původcem nozokomiálních mykotických infekcí u pacientů s oslabenou imunitou. Protože se tento druh často vyskytuje na kůži a sliznicích lidí, může poměrně snadno dojít ke kontaminaci rukami personálu či pomůckami jako jsou například dlouhodobě používané katétry [5].

Ačkoli *Candida albicans* bývá nejčastějším původcem patogenních kvasinkových infekcí, *Candida parapsilosis* přetrvává dlouho v nemocničním prostředí a dochází k šíření mezi pacienty, zvláště pak na novorozeneckých jednotkách intenzivní péče [6].

Tento druh se podílí na vzniku jak povrchových, tak hlubokých infekcí. Jeho patogenita souvisí s tvorbou biofilmu a částečnou rezistencí vůči běžně používaným antimykotikům. *Candida parapsilosis* vykazuje vyšší rezistenci vůči azolům (zejména flukonazolu) a v některých případech i sníženou citlivost vůči echinokandinům ve srovnání s *Candida albicans* [7].

2.2 Faktory virulence

Patogenní kvasinky rodu *Candida* využívají více mechanismů k překonání obranných bariér hostitele. Virulence není dána jedním faktorem, ale souhrou více vlastností, jejichž

kombinovaný efekt umožňuje přežívání a invazi v hostitelském organismu. Mezi hlavní patří adheze, tvorba biofilmu, produkce hydrolytických enzymů a schopnost morfologické přeměny. [8,9].

2.2.1 Adheze

Uchycení se na povrchu tkáně či jiného materiálu je pro kvasinky rodu *Candida* velmi důležité pro rozvoj infekce. Adheze je způsobena proteiny, které se nazývají adhesiny. Adhesiny v extracelulárním matrixu rozpoznávají fibrinogen a fibronektin, čímž umožní přichycení na povrch tkáně [8].

Spektrum exprimovaných adhesinů může být ovlivněno prostředím, typem substrátu i morfologickým stavem buňky. Například při změně dostupnosti živin nebo během kolonizace lékařských implantátů může *Candida* zvyšovat produkci určitých adhesinů, což jí umožňuje přizpůsobit se různým podmínkám v hostitelském organismu. Tento dynamický systém adheze představuje důležitou součást schopnosti kvasinek přežít, šířit se a vytvářet rezistentní infekční ložiska [8,9].

2.2.2 Tvorba biofilmu

Schopnost tvořit biofilm je považována za jeden z hlavních faktorů přispívajících k patogenitě kvasinek rodu *Candida*. Biofilm poskytuje kvasinkám ochranu před různými vlivy, mimo jiné i imunitní reakce hostitele [8].

Matrix biofilmu obsahuje polysacharidy, proteiny a nukleové kyseliny, které společně vytvářejí ochranné podmínky. V těchto podmínkách jsou buňky odolnější vůči antimykotikům, což může komplikovat léčbu [8,9].

Tvorba biofilmu je regulována a může být ovlivněna okolním prostředím, například dostupností živin. Jednotlivé kmeny *Candida* mají rozdílnou schopnost biofilm vytvářet, což může ovlivňovat jejich patogenitu [9].

2.2.3 Sekrece hydrolytických enzymů

Produkce hydrolytických enzymů je jedním z mechanismů, jimiž si kvasinky rodu *Candida* usnadňují průnik do tkání hostitele a získávání živin. Tyto enzymy rozkládají složky extracelulárního matrixu, epitelových bariér nebo krevních proteinů a tím podporují invazivní chování patogenu [4,8].

Mezi nejvýznamnější enzymy patří sekretované proteasy, dále pak fosfolipasy a lipasy. Proteasy štěpí bílkoviny přítomné v tkáních hostitele, například protilátky či bílkoviny

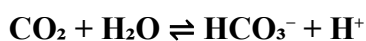
podílející se na imunitních reakcích. Fosfolipasy napadají fosfolipidové složky buněčných membrán a pomáhají s ničením buněk. Lipasy se pak podílejí na metabolismu lipidů a umožňují přežití kvasinek v prostředích s omezenou dostupností živin [8,9].

Spektrum exprimovaných enzymů a jejich množství závisí na konkrétním druhu *Candida*, stavu infekce a vnějších podmínkách. U *C. parapsilosis* byla například popsána výrazná produkce lipas, které hrají důležitou roli při kolonizaci kožního povrchu. Schopnost upravovat okolní prostředí pomocí enzymatické aktivity je tedy významným faktorem, který přispívá k patogenitě a adaptabilitě [9].

2.2.4 Adaptační změny na environmentální změny

Vysoká míra adaptability na environmentální změny je jedním z klíčových faktorů u patogenních kvasinek. Úspěšná přežití těchto mikroorganismů závisí mimo jiné na efektivitě metabolických drah, které jim umožňují asimilaci dostupných živin v různých stresových podmínkách. Mezi nejčastější stresové podmínky patří změny pH, zvýšená teplota, oxidační a osmotický stres, omezená dostupnost živin. [8]

Jedním z faktorů, na něž kvasinky musí reagovat, je proměnlivá koncentrace oxidu uhličitého v prostředí. V přírodních podmínkách je rovnovážná koncentrace CO₂ regulována jeho spontánní přeměnou na hydrogenuhličitan podle reakce:



Tato reakce však probíhá pomalu, a proto si živé organismy vyvinuly enzymový mechanismus, který tuto přeměnu urychluje podle aktuálních metabolických potřeb. Tímto enzymovým mechanismem pracuje skupina enzymů, které se nazývají karbonické anhydrasy. CA katalyzují hydrataci oxidu uhličitého na proton a hydrogenuhličitan a zpět deset tisíckrát rychleji, než by reakce probíhala bez katalýzy [10,11]. Tato enzymatická aktivita je pro patogenní mikroorganismy velmi důležitá, protože pomáhá udržovat intracelulární pH a dodává hydrogenuhličitan, který nadále slouží jako substrát pro syntézu pyrimidinů a mastných kyselin, také slouží jako signální molekula pro řadu biochemických reakcí. Vznikající proton (H⁺) ovlivňuje pH cytoplazmy, což je podstatné pro signalizaci či jiné enzymatické reakce. [12]

2.3 Karbonické anhydrasy a jejich evoluční skupiny

Kvasinky rodu *Candida* se běžně vyskytují v prostředí s nízkou koncentrací oxidu uhličitého (CO₂). Po vstupu do hostitelského organismu však čelí výrazně vyšším hladinám CO₂, které mohou být až stonásobně vyšší oproti atmosférickému prostředí. Aby byly schopny se těmto změnám rychle a účinně přizpůsobit, využívají enzym karbonickou anhydrasu (CA).

Enzym CA urychluje přeměnu oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan a volný proton, čímž ovlivňuje acidobazickou rovnováhu.

Tato reakce hraje zásadní roli nejen v udržování acidobazické rovnováhy, ale i v metabolické flexibilitě, osmoregulaci a vnímání prostředí. U patogenních mikroorganismů je aktivita CA spojována s přežíváním v proměnlivých podmínkách, růstem, morfologickými přechody i virulencí [10,11].

Karbonické anhydrasy se vyskytují ve všech třech doménách života (*Bacteria*, *Archaea*, *Eukaryota*) a představují příklad konvergentního vývoje. Z hlediska strukturní a evoluční diverzity se dělí do 8 tříd: α , β , γ , δ , ζ , η , θ a ι [13].

Zatímco enzymy třídy α jsou typické pro živočišné buňky, třída β je hojně zastoupena u nižších eukaryot a prokaryot, včetně hub a bakterií. Právě β -CA představují významný cíl výzkumu u patogenních kvasinek. Třída γ je typická pro archaeální a některé bakteriální organismy, zatímco δ a ζ CA byly nalezeny především u mořských rozsivek.

Navzdory evolučním rozdílům bývá u různých tříd CA pozorována podobná koncepce katalytického místa, typicky s iontem kovu (např. Zn^{2+}) vázaným dvěma cysteinovými zbytky a jedním histidinovým. Naopak výrazné rozdíly jsou patrné v sekvenčním okolí a v uspořádání sekundárních struktur [14].

2.3.1 Karbonická anhydrasa třídy β

První struktura β -CA byla publikována v roce 2000 a pocházela z červené řasy *Porphyridium purpureum*. Do současnosti bylo popsáno přibližně 80 prostorových struktur β -CA pocházejících z rostlin, kvasinek a bakterií.

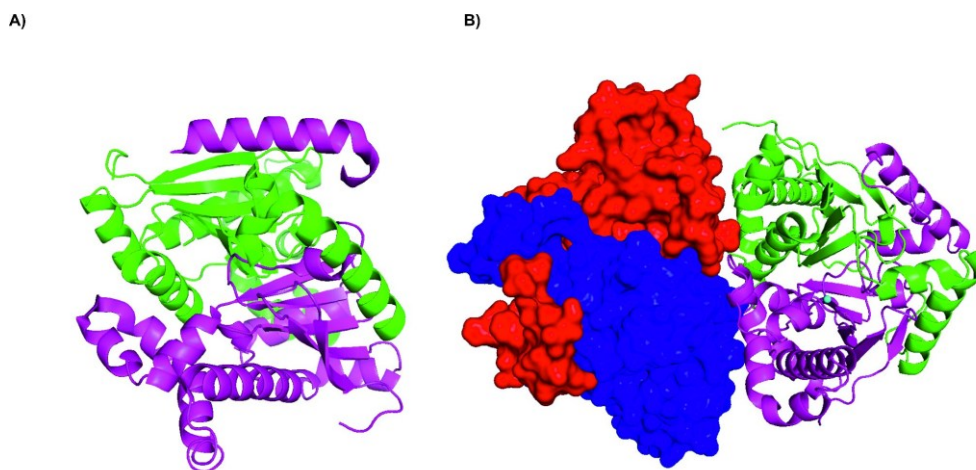
U kvasinek byla jako první identifikována β -karbonická anhydrasa u *Saccharomyces cerevisiae*, kódovaná genem NCE103 (Non-Classical protein Export pathway) [14]. CA byla identifikována jako součást proteinů sekretovaných do extracelulárního prostoru i přesto, že jí chybí klasická signalizační sekvence pro vstup do endoplazmatického retikula. [15]

Jak popsali ve své práci Teng a kol. [16], β -CA ScNce103p se skládá do tetrameru ze čtyř totožných podjednotek, které do sebe zapadají jako dva spojené dimery (Obr.1.). Dimery jsou stabilizovány interakcemi N-koncových helixů ($\alpha 1$ a $\alpha 2$), jejich kolmé propojení je realizováno centrální částí podjednotek

Jednotlivé monomery sdílejí typické znaky β -CA, což jsou β -listy a α -helixy, které obklopují aktivní místo enzymu. To se nachází v blízkosti rozhraní dvou podjednotek a je tvořeno zbytky pocházejícími z obou sousedních monomerů. Aktivní místo obsahuje ion zinku, který je koordinován dvěma cysteinovými a jedním histidinovým zbytkem.

ScNce103p má úzký přístupový tunel, který vede k aktivnímu místu, je tvořen smyčkami z obou sousedních podjednotek a jeho poloha přispívá k regulovanému průchodu CO₂.

Celkově struktura ScNce103p vykazuje znaky typické pro β-CA u hub: pevné dimericko-tetramerické uspořádání a přítomnost vstupních kanálů, které mohou ovlivňovat přístup substrátu k enzymatickému aktivnímu centru. [16]



Obr. 1 Struktura karbonické anhydrasy ScNce103p (PDB ID: 3EYX)
Vizualizována v softwaru PyMOL. A) Dimer B) Tetramer

2.3.2 Inhibitory β-karbonických anhydras

Díky výrazným rozdílům ve struktuře mezi β-karbonickými anhydrasami hub a α-izoforem u savců (Obr. 2) se tyto enzymy jeví jako vhodný molekulární cíl pro návrh antimykotik, která by zasahovala specificky patogenní mikroorganismy a zároveň minimalizovala toxicitu pro hostitele.

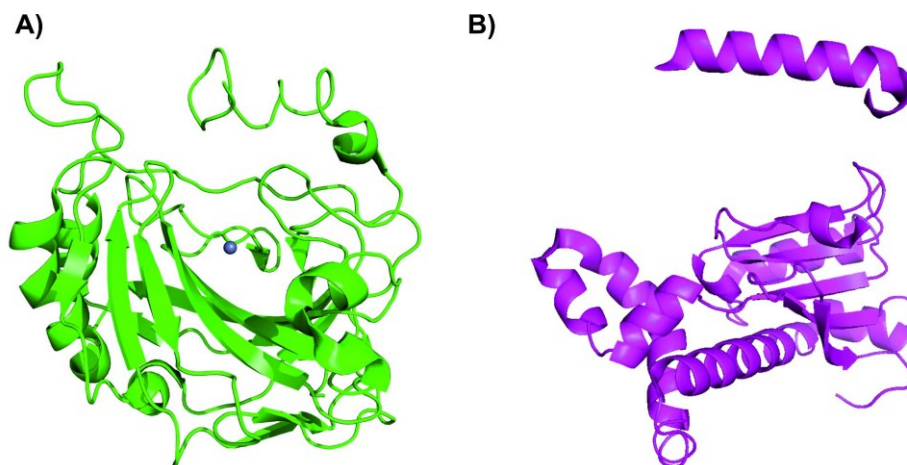
Inhibitory CA představují rozsáhlou a strukturálně různorodou skupinu molekul, které se váží do aktivního místa enzymu a ovlivňují jeho funkci. Z farmakologického hlediska jsou nejlépe prostudovanou třídou sulfonamidy, které se kompetitivně navazují na zinečnatý ion v aktivním centru a tím blokují přístup substrátu. Zásadní roli v této inhibici hrají jejich schopnosti koordinovat kov a ovlivnit protonový transfer v aktivním místě [11,17].

Sulfonamidové deriváty mohou účinně inhibovat β-CA u patogenních kvasinek a při podmínkách s nízkou koncentrací CO₂ omezit jejich růst, což podtrhuje roli enzymu v přežití patogenu [18].

Kromě sulfonamidů byly popsány i další třídy inhibitorů. Jsou jimi thiolové sloučeniny, karboxyláty nebo analogy hydrátů oxidu uhličitého, přičemž jejich účinnost a selektivita závisí na typu organismu a struktuře cílové izoformy [17]. Novější strategie se opírají o návrh inhibitorů s alternativními chemickými jádry, jako jsou triazolové, thiazolidinové nebo

karboxamidové deriváty. Tyto molekuly jsou vyvíjeny pomocí *in silico* metod a testovány pro lepší prostupnost buněčnou stěnou a vyšší selektivitu vůči β -CA hub [19].

Velmi důležité je pochopit rozdíly mezi aktivními místy jednotlivých tříd CA, což umožňuje návrh sloučenin se specifickou afinitou právě k β -CA kvasinek, a zároveň omezuje nežádoucí inhibici lidských α -CA [17].



Obr. 2. Ilustrativní srovnání struktur karbonických anhydras typu α a β
A) α -Ca (Human CA, PDB ID: 1AZM), B) β -CA (ScNce103p (PDB ID: 3EYX))

2.4 Léčba kandidózy: přehled používaných antimykotik a nové terapeutické strategie

Kandidózy představují závažný klinický problém především u pacientů se sníženou imunitou, hospitalizovaných osob a pacientů s invazivními zdravotnickými pomůckami. Léčba těchto infekcí je komplikovaná nejen rostoucí incidencí, ale i zvyšující se rezistencí některých druhů rodu *Candida* vůči běžně používaným antimykotikům. Moderní výzkum se snaží nalézt nové cíle v metabolismu patogenních hub, které by umožnily selektivní zásah bez poškození lidských buněk. Mezi takové slibné cíle patří enzymy specifické pro houby, například β -karbonické anhydrasy (β -CA), které chybí u savců. Tyto enzymy jsou esenciální pro metabolickou adaptaci kvasinek v prostředí s nízkým obsahem CO_2 a jejich inhibice může vést k narušení růstu a života schopnosti patogenní kvasinky [18].

2.4.1 Klasické třídy antimykotik

Pro léčbu kandidózy se v současnosti nejčastěji využívají tři hlavní třídy antimykotik, jsou jimi azolová antimykotika, polyenová antimykotika a echinokandiny. Azolová antimykotika (např. flukonazol) inhibují enzym lanosterol-14 α -demethylasu, což narušuje syntézu ergosterolu, hlavní složky buněčné membrány kvasinek. Jsou široce používána, ale některé druhy, jako *Candida glabrata* a *Candida krusei*, vykazují přirozenou nebo získanou rezistenci

[20]. Polyenová antimykotika (např. amfotericin B) se váží na ergosterol v membráně, což naruší její integritu a toto narušení vede k úniku intracelulárních iontů. Jejich použití je limitováno nefrotoxicitou. A echinokandiny (např. kaspofungin) inhibují syntézu β -(1,3)-D – lukanu, důležité složky buněčné stěny kvasinek. Jsou dobře tolerované a účinné zejména u invazivních infekcí, ale jejich účinnost je nižší u některých druhů, např. *Candida parapsilosis* [21].

2.5 Molekulární dokování v návrhu inhibitorů β -CA

Molekulární dokování je výpočetní metoda umožňující modelování interakce mezi malou molekulou (ligandem) a cílovým proteinem (např. enzymem β -CA). Cílem je predikovat, jakým způsobem a s jakou afinitou se ligand váže do aktivního místa enzymu. Virtuální screening velkého počtu sloučenin umožňuje předvybrat nejperspektivnější kandidáty ještě před jejich syntézou či laboratorním testováním. Tato metoda tak představuje efektivní nástroj v raných fázích vývoje nových inhibitorů β -CA u patogenních kvasinek.

Modelování interakce inhibitorů s enzymem bylo provedeno pomocí softwaru AutoDock4. Tento nástroj umožňuje predikci preferované vazebné polohy ligandu v rámci aktivního místa na základě optimalizace vazebné energie [22]. Získané výsledky lze interpretovat pomocí hodnot vazebné energie (binding energy) a vizuální analýzy interakcí v rámci aktivního místa enzymu – například přítomnost koordinační vazby se zinkem nebo interakce s klíčovými aminokyselinami jako jsou histidin nebo cystein.

Díky dostupnosti 3D struktur enzymů jako Nce103p je možné detailně analyzovat prostorové uspořádání aktivního místa a identifikovat kritické aminokyselinové zbytky pro katalýzu i inhibici. Dokování tak pomáhá pochopit nejen vazbu inhibitorů, ale i racionálně navrhovat jejich strukturu. V kombinaci s QSAR analýzami a molekulovou dynamikou lze vytvořit prediktivní modely s vysokou vypovídací schopností.

V této práci budou ukázány výsledky molekulárního dokování získaného ve spolupráci s ÚOCHB AV ČR, konkrétně od Ing. Kamily Clarové a RNDr. Mgr. Martina Lepšíka, Ph.D., kteří poskytli výpočetní modely a analýzu vazebných interakcí inhibitorů s β -karbonickou anhydrosou.

3 Cíle práce

Tato práce byla řešena v rámci dlouhodobého projektu laboratoře Ing. Ivy Pichové CSc. na ÚOCHB AV ČR. Konkrétními cíli bylo:

- Porovnat vliv exprese rekombinantní β -CA z *C. parapsilosis* (CpNce103p) v *E.coli* LOBSTR (Low Background Strain) a *E.coli* (DE3) RIL s ohledem na podíl kontaminujících proteinů
- Izolace rekombinantní β -CA Δ 42_CpNCE103p v čistotě a množství potřebné k rengenostрукturním analýzám
- Nalezení krystalizačních podmínek pro Δ 42_CpNCE103
- Testování inhibitorů pro β -CA

4 Materiál a metody

V této kapitole jsou popsány použité materiály a metody.

4.1 Použité chemikálie, enzymy a inhibitory

Při experimentální práci byly použity následující chemikálie, enzymy a inhibitory:

- **Bradfordovo činidlo** – Sigma-Aldrich, USA
- **Coomassie Brilliant Blue R-250** – Sigma-Aldrich, USA
- **Ethanol (95%)** – Penta, ČR
- **Glycerol ($\geq 99.5\%$)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Imidazol** – Fluka, Švýcarsko
- **Isopropanol** – Penta, ČR
- **LB médium** – trypton 10 g/l, NaCl 10 g/l, autolyzát z kvasinek 5 g/l, NaOH 200 μ l 5 mol/l – vlastní příprava
- **NaCl** – Penta, ČR
- **NaOH (5 mol/l)** – Penta, ČR
- **Polyethylenglykol (PEG)** – Sigma-Aldrich, USA
- **TCEP (tris(2-karboxyethyl)fosfin)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Tris-HCl pH 8.0** – Sigma-Aldrich, USA
- **SDS (dodecylsírán sodný)** – Sigma-Aldrich, USA
- **2-merkaptoetanol** – Sigma-Aldrich, USA
- **Bromfenolová modř** – Sigma-Aldrich, USA
- **TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Persíran amonný (APS)** – Sigma-Aldrich, USA
- **HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Fenolová červeň (pH indikátor)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Na₂SO₄ (sírán sodný)** – Penta, ČR
- **p-nitrofenylacetát** – Sigma-Aldrich, USA
- **BSA (hovězí sérový albumin)** – Sigma-Aldrich, USA
- **Protein Test Mixture (standard molekulové hmotnosti pro SDS-PAGE)** – Sigma-Aldrich, USA

Použité inhibitory β -karbonické anhydrazy:

- **Acetazolamid** – Sigma-Aldrich, USA (*referenční inhibitor*)
- **Sulfanilamid** – Sigma-Aldrich, USA
- **Hydrazon benzofenonu** – Sigma-Aldrich, USA
- **L-Tryptofan** – Sigma-Aldrich, USA
- **Kyselina pikrová** – Sigma-Aldrich, USA
- **2-Nitrobenzensulfonylchlorid** – Sigma-Aldrich, USA
- **4-Nitrobenzenesulfonamid** – Sigma-Aldrich, USA
- **1,2-Dinitrobenzen** – Sigma-Aldrich, USA
- **2-(benzylamino)-4-chlor-5-sulfamoylbenzoová kyselina** – Sigma-Aldrich, USA
- **But-3-yn-1-sulfonamid** – Sigma-Aldrich, USA
- **Sulfamide** – Sigma-Aldrich, USA
- **Dimethylsulfamid** – Sigma-Aldrich, USA
- **Trifluoromethylsulfonamid** – Sigma-Aldrich, USA

4.2 Použité expresní vektory

Byl použit bakteriální vektor pET22b-d26_CpNCE103 pro rekombinantní expresi homologa genu *NCE103* z *C. parapsilosis* (*CpNCE103*) již dříve připravený v rámci projektu na ÚOCHB AV ČR.

4.3 Přístroje

- **Aparatura pro FPLC** ÄKTA purifier 100, GE Healthcare Bioscience
- **Autokláv** Labo Autoclave, Sanyo
- **Centrifuga vysokorychlostní** Avanti Centrifuge J-30I, Beckman Coulter
- **Centrifuga stolní** Allegra X-1512 Centrifuge, Beckman Coulter
- **Difraktometr rentgenový** Rigaku HF007
- **Elektroforézní zdroj napětí** PowerPac HC, Bio-Rad
- **Elektroforézní komora** Mini-PROTEAN®, Bio-Rad
- **Inkubátor rotační** Inova 44, New Brunswick Scientific
- **Krystalizační robot** Mosquito, TTP Labtech
- **Mikroskop optický** s UV osvitom Olympus SZX10
- **Mikrodestičkový spektrofotometr** TECAN Infinite 200 PRO
- **Míchačka magnetická** IKA-Werke
- **Sonikátor** Bandelin Electronic

- **Spektrofotometr** NanoDrop Products ND-1000
- **Spektrofotometr** stopped-flow Applied Photophysics SX20
- **Váhy laboratorní** EL-2000 S, Setra
- **Vortex** Labortechnik
- **Krystalizační destičky a pásky** Intelli-plate, QIAGEN

4.4 Software a výpočetní nástroje

K analýze a zpracování dat byly použity následující výpočetní nástroje:

- **GraphPad Prism 9.5.1 (Dotmatics)** – nelineární regrese a výpočet inhibiční konstanty K_i
- **Microsoft Excel (verze 2021)** – tabulkové zpracování experimentálních dat
- **AutoDockTools 1.5.7 / AutoDock 4.2** – modelování vazby inhibitorů do aktivního místa enzymu (ve spolupráci s ÚOCHB AV ČR)
- **TECAN Infinite 200 PRO** – měření absorbance v mikrotitračních destičkách

4.5 Metody

Přehled použitých metod v rámci projektu. Všechny experimentální metody byly optimalizovány pro rekombinantní β -CA z *Candida parapsilosis* ve spolupráci s ÚOCHB AV ČR a vycházejí z interních laboratorních protokolů, které byly dále upraveny.

4.5.1 Transformace buněk

K expresi byly využity buňky *E.coli* BL21 (DE3) RIL a *E.coli* LOBSTR. Zmražené kompetentní buňky byly vyjmuty z mrazícího boxu (-80 °C) a ponechány na ledu do úplného rozmrazení. K buněčné suspenzi byla přidána plazmidová DNA (500 ng/ml). Směs byla inkubována přibližně 15 minut na ledu. Transformační směs byla vystavena dvouminutovému teplotnímu šoku při 42 °C, aby došlo k usnadnění vstupu plazmidové DNA do buněk. Ihned po teplotním šoku byla suspenze dána na led a k ní byl přidán 1 ml LB média. Bakteriální směs byla poté vložena do inkubátoru na 1 hodinu při teplotě 37 °C. Po hodinové inkubaci byla bakteriální suspenze převedena do sterilní zkumavky obsahující LB médium s antibiotikem (ampicilinem 50 ug/ml). Kultivace poté probíhala za stálého třepání 220 RPM, při 37 °C přes noc.

4.5.2 Exprese rekombinantních proteinů

Bakteriální suspenze (5 ml) vzniklá po transformaci byla použita k zaočkování 1 L LB média s ampicilinem. Kultivace probíhala při 30 °C, dokud optická hustota měřená při 550 nm (OD_{550}) nedosáhla přibližné hodnoty 0,6. Exprese proteinu byla indukována přidavkem 500 μ l 1 M IPTG. Kultivace dále probíhala přes noc při 20 °C a byla poté ukončena odstředěním buněk (4 000 x g, 10 min, 4 °C).

4.5.3 Izolace proteinů

Buňky obsahující rekombinantní protein byly resuspendovány v pufru TN (50 ml/500 ml kultury). Po přidavku lysozymu (1 mg/g biomasy) probíhala 30 min lyze, která byla ukončena zamražením a následným rozmražením buněk. Lyzát byl homogenizován ultrazvukem a suspenze byla odstředěna (20 000 x g, 20 min, 4 °C) a vzniklý supernatant obsahující exprimované proteiny byl použit k další izolaci. Z pelety i supernatantu byly odebrány vzorky pro kontrolu exprese pomocí SDS-PAGE.

Pufir TN: 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 2mM TCEP

4.5.4 Chromatografie

Izolace exprimovaných proteinů probíhala na přístroji ÄKTA Prime s využitím komerčních kolon. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance při 280 nm, a vodivost mS. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

4.5.4.1 Afinitní chromatografie

Při afinitní chromatografii bylo využito přirozené vlastnosti β -CA, které mají na svém C-konci oblast se zvýšeným množstvím histidinů (celkově pět). Pro chromatografii byla použita kolona HiTrap HP od firmy GE Healthcare. Průtok pufru kolonou byl standardně nastaven na 2 ml/min. Po ekvilibraci promývacím pufrem A (čtyřnásobek objemu kolony) byl na kolonu aplikován vzorek supernatantu. Následovalo promytí proteinů navázaných na nosiči a jejich eluce gradientem 0 - 0,4 M imidazolu. Eluce probíhala lineárním gradientem imidazolu s rychlostí změny 2 % elučního pufru za 1 minutu. V průběhu chromatografie byly odebírány vzorky, které byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Pufir A: 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 2mM TCEP

Pufir B: 500 mM NaCl, 400 mM imidazol, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 2 mM TCEP

4.5.4.2 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie byla využita k izolaci proteinů po afinitní chromatografii. Chromatografie byla prováděna na komerční koloně Hi load™ 16/60 Superdex™ 200. Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Po ekvilibraci pufrém C byl na kolonu aplikován vzorek zahuštěný na objem 5 ml. Frakce byly jímány po 3 ml.

Pufr C: 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 2mM TCEP

4.5.5 Zahuštění izolovaných proteinů

Pro zahušťování proteinů byly použity ultracentrifugační cely s membránou Amicon UM10, která propouští pouze částice s molekulovou hmotností menší než 10 kDa. Zahušťování probíhalo s využitím centrifugace při 4000 g, 4°C.

4.5.6 Stanovení koncentrace proteinů

Ke stanovení koncentrace proteinu byly použity dvě metody.

4.5.6.1 Metoda dle Bradfordové

Stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové je založeno na tvorbě barevného komplexu mezi proteiny a barvivem Coomassie Brilliant Blue obsaženým v činidle (BM), jehož absorbance je měřena spektrofotometricky. Při měření koncentrace proteinů ve vzorku bylo přidáno 20 μ l roztoku vzorku a 200 μ l Bradfordova činidla. Měření bylo provedeno na přístroji TECAN, který po protřepání destičky zaznamenal absorbanci při 595 nm při laboratorní teplotě. Kalibrační přímka byla vytvořena pomocí roztoků BSA o předem známé koncentraci.

Činidlo BM: 70 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95 % ethanolu, 100 ml 85 % kys. fosforečné, 850 ml H₂O

4.5.6.2 Měření na spektrofotometru NanoDrop Products ND-1000

Koncentrace proteinů byla stanovena měřením absorbance 2 μ l vzorku při vlnové délce 280 nm na spektrofotometru NanoDrop (firma). Koncentrace proteinů byla automaticky vypočítána přístrojem na základě absorbance a průměrného molárního absorpčního koeficientu dle Lambert-Beerova zákona.

4.5.7 SDS-PAGE

Polykarylamidová gelová elektroforéza (PAGE) v prostředí dodecylsírany sodného (SDS) byla použita pro separaci proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli, která koreluje

s jejich molekulovou hmotností. Proteiny jsou v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) denaturovány a nabývají záporný náboj, což umožňuje jejich separaci dle velikosti. Pro analýzu proteinů byla použita SDS-PAGE s 5 % zaostřovacím a 12 % separačním gelem. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 2:1 (vzorek: pufr) a po třiminutové denaturaci varem bylo nanášeno přibližně 5–10 µg bílkoviny do jamek v zaostřovacím gelu. Pro určení velikosti analyzovaných bílkovin byl použit komerční hmotnostní standard Protein Test Mixture (92,5; 67; 45; 29; 21; 12,5; 6,5 kDa). Elektroforéza probíhala v Tris-glycinovém pufru při konstantním napětí 200 V přibližně 45 min. Polyakrylamidový gel byl po ukončení elektroforézy barven stříbrem.

Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:

- 3 ml 0,5 mol/l Tris-HCl, pH 6,8
- 2 ml 80 % glycerol
- 1 ml 2merkaptoetanol
- 4 ml 10 % (w/v) SDS
- 2 ml 0,1 % bromfenolová modř (v 0,5 mol/l Tris.HCl, pH 6,8)

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:

- 20 mmol/l Tris pH 8,3
- 200 mmol/l glycin
- 0,1 % (w/v) SDS Objem je do 1 l doplněn destilovanou vodou.

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE:

- 4,1 ml H₂O
- 1 ml 30% směs akrylamidu
- 0,75 ml 1 M Tris (pH 6,8)
- 0,06 ml 10 % SDS
- 0,06 ml persíran amonný
- 0,006 ml TEMED

Separační gel (12 %):

- 3,3 ml H₂O
- 4 ml 30 % směs akrylamidu
- 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 0,1 ml 10 % SDS
- 0,1 ml 10 % persíran amonný
- 0,004 TEMED

4.5.8 Krystalizace difuzí par

Hlavní metodou použitou ke krystalizaci proteinu $\Delta 42_CpNce103p$ byla difuze par v uspořádání se sedící kapkou. Pomocí krystalizačního robotu MOSQUITO byly na 96jamkovou destičku Intelli-plate (QIAGEN) nanášeny krystalizační kapky. Destičky Intelli-plate umožňovaly testování dvou různých koncentrací proteinu. Vzorek proteinu byl nanášen v koncentracích v rozmezí $20 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Krystalizační kapka obsahovala $0,3 \text{ }\mu\text{l}$ roztoku komplexu enzym-inhibitor a $0,3 \text{ }\mu\text{l}$ precipitačního roztoku. Objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl $70 \text{ }\mu\text{l}$. Po nanesení kapek byly destičky překryty průhlednou páskou kvůli oddělení od vnějšího prostředí a skladovány při teplotě 18°C .

K hledání vhodných krystalizačních podmínek byly využity komerčně dostupné screeningové sady: JSCG+ (Qiagen), Midas (Molecular Dimensions), Morpheus (Molecular Dimensions) a PEGs (Qiagen).

Po nanesení kapek robotem byl pro prvotní kontrolu tvorby krystalů využit optický mikroskop. Krystaly vhodné velikosti a kvality byly následně analyzovány pomocí rentgenové strukturní analýzy

4.5.9 Testování inhibitorů β -karbonické anhydrasy

Inhibice CA pomocí vybraných sloučenin byla stanovena spektrofotometricky s využitím stopped-flow pro záznam rychlé enzymové reakce. Sledovala se změna pH reakčního prostředí v důsledku hydratace CO_2 katalyzované β -CA z *C. parapsilosis*. Ke sledování pH byla využita indikátorová barva fenolová červeně a absorbance byla měřena při vlnové délce 547 nm . Reakční směs obsahovala 20 mM HEPES (pH 7,4), $0,2 \text{ mM}$ fenolové červeně, $0,2 \text{ mM}$ Na_2SO_4 a $0,5 \text{ mM}$ substrátu (p-nitrofenylacetátu).

Inhibitory byly testovány v rozmezí koncentrací $0,1\text{--}2000 \text{ }\mu\text{M}$. Před zahájením reakce byly enzym a inhibitor inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě.

Měření byla prováděna pomocí stopped-flow spektrofotometru (Applied Photophysics) v termostatovaném kyvetovém systému. Absorbance byla zaznamenávána kontinuálně.

Každé měření bylo provedeno v pěti technických opakováních. Referenčním inhibitorem byl acetazolamid (AAA).

V této práci byla testována sada sulfonamidových derivátů. Jednotlivé sloučeniny byly navrženy ve spolupráci s kolegy z ÚOCHB AV ČR a lišily se především typem substituentu a chemickým jádrem. Cílem bylo prověřit jejich inhibiční účinnost a schopnost selektivně inhibovat β -CA z *C. parapsilosis*.

4.5.9.1 Výpočet inhibiční konstanty

Stanovení inhibiční konstanty (K_i) bylo provedeno na základě změny rychlosti reakce při různých koncentracích inhibitoru. Z časového průběhu absorbance při 547 nm byly vypočteny počáteční rychlosti (v_0) z lineární části měřicí křivky.

Počáteční rychlosti byly vyneseny proti koncentraci inhibitoru a analyzovány pomocí nelineární regrese v programu GraphPad Prism. Pro každou sloučeninu byl použit model inhibice s jedním místem vazby („[Inhibitor] vs. response – variable slope“), odpovídající rovnici:

$$v = \frac{v_0}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

kde v je rychlost reakce při dané koncentraci inhibitoru, v_0 rychlost bez inhibitoru, $[I]$ koncentrace inhibitoru a K_i inhibiční konstanta.

Hodnoty K_i byly získány proložením dat křivkou a reprezentují koncentraci inhibitoru potřebnou k 50 % inhibici aktivity enzymu za daných podmínek. Výsledná hodnota K_i je průměrem ze tří technických opakování

5.2 Exprese a purifikace $\Delta 42_CpNCE103p$

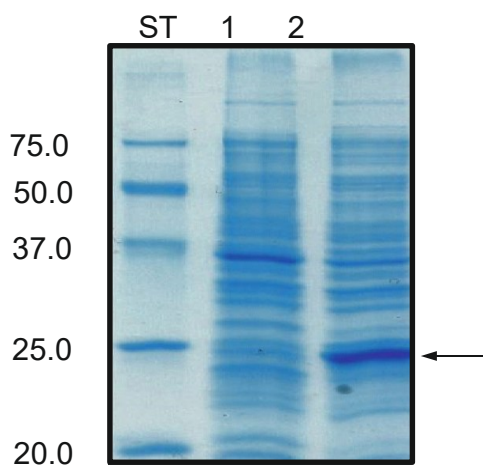
Výchozím krokem každé rentgenostrukturní analýzy proteinů je jejich příprava v dostatečném množství a čistotě. Za tímto účelem byla zvolena bakteriální exprese zkrácené formy β -arbovické anhydrasy $\Delta 42_CpNCE103p$ v kmenech *E. coli* BL21 (RIL) a LOBSTR.

5.2.1 Exprese v *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR

Expresí proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ byla zajištěna transformací buněk *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR vektorem pET22b- $\Delta 42_CpNCE103$, nesoucím gen pro produkci cílového proteinu. Transformace i následná kultivace buněk probíhala dle postupů uvedených v kapitolách 4.5.1 a 4.5.2.

Po ukončení kultivace byly buňky separovány od kultivačního média odstředěním a získaný buněčný materiál byl použit k izolaci exprimovaného proteinu. Snížení teploty kultivace z 30 °C na 20 °C vedlo ke zvýšení podílu rozpustného proteinu v supernatantu bakteriálního lyzátu.

Přítomnost rekombinantního proteinu o molekulové hmotnosti 29,2 kDa odpovídající $\Delta 42_CpNCE103p$ byla ověřena pomocí SDS-PAGE analýzy (Obr. 4).



Obr. 4 Expresí $\Delta 42_CpNCE103p$ v *E. coli* BL21 (DE3) RIL
1. Buněčný lyzát před indukcí IPTG; 2. Buněčný lyzát po indukcí IPTG²

Analýza SDS-PAGE odebraných vzorků před a po indukcí IPTG ukázala, že dochází k expresi cílového proteinu (Obr. 4).

² Šipka označuje proužek odpovídající exprimovanému proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$, při stejném množství naneseného vzorku na SDS-PAGE.

5.2.2 Metaloafinitní chromatografie

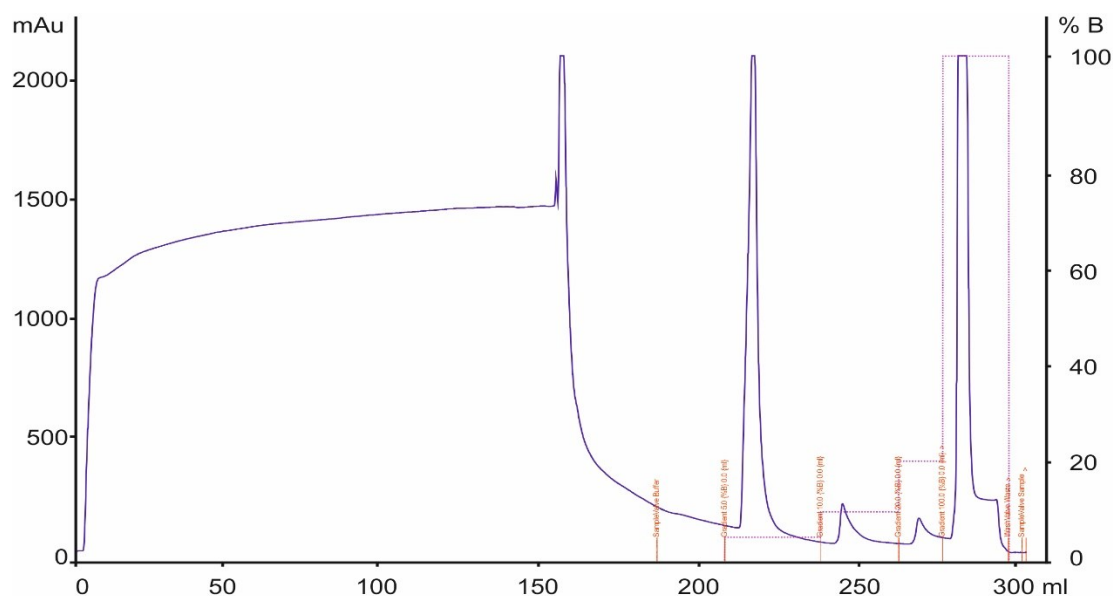
Exprimovaný protein $\Delta 42_CpNCE103p$ byl z buněk *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR izolován postupnými kroky, které zahrnovaly buněčnou dezintegraci, separaci rozpustné a nerozpustné frakce bakteriálního lyzátu (dle postupu popsaného v kapitolách 4.5.3 a 4.5.4), a následné purifikační chromatografické metody.

Po dezintegraci buněk zůstala část exprimovaného proteinu v nerozpustné frakci (peletě), tvořené zbytky buněčných struktur. Většina cílového proteinu naopak zůstala v rozpustné části lyzátu, což bylo podpořeno provedením exprese při snížené teplotě (20 °C). Rozpustná frakce (supernatant) byla následně použita k purifikaci pomocí chromatografických metod (Obr. 6, frakce V).

Prvním purifikačním krokem byla metaloafinitní chromatografie na koloně HiTrap IMAC FF (GE Healthcare), která využívá přirozenou schopnost histidinových zbytků na C konci proteinu koordinovat se s kovovými ionty (Ni^{2+}) navázanými na afinitní nosič.

Purifikace probíhala při průtoku pufru 2 ml/min. Kolona byla nejprve ekvilibrována puftrem A, následně byl aplikován supernatant získaný po expresi v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR. Eluce navázaných proteinů probíhala gradientem 0–0,4 M imidazolu. Průběh chromatografie byl monitorován pomocí UV detekce při 280 nm a jednotlivé eluční frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE.

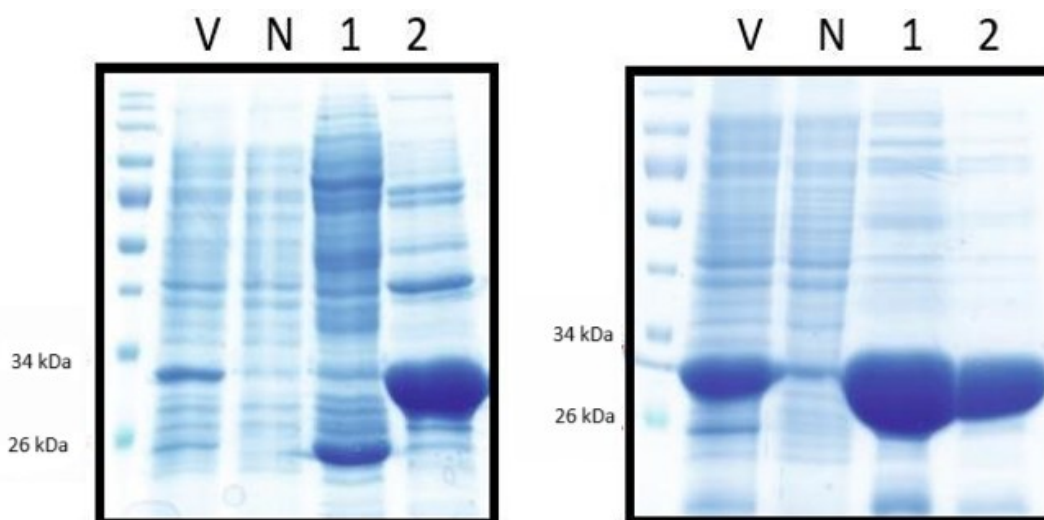
Chromatografický záznam průběhu purifikace proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ z exprese v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) RIL je uveden na Obr. 5.



Obr. 3 Chromatografický záznam afinitní chromatografie $\Delta 42_CpNCE103p$ exprimované v *E. coli* BL21 (DE3) RIL na HiTrap IMAC FF koloně (modře – A280)

Výsledné eluční frakce byly dále analyzovány metodou SDS-PAGE, která potvrdila přítomnost cílového proteinu. Rozdíly v čistotě frakcí jsou diskutovány v kapitole 6.

Na Obr. 6. je znázorněna SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí získaných během metaloafinitní chromatografie proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ exprimovaného v buňkách *E. coli* BL21 (DE3) RIL i *E. coli* LOBSTR.



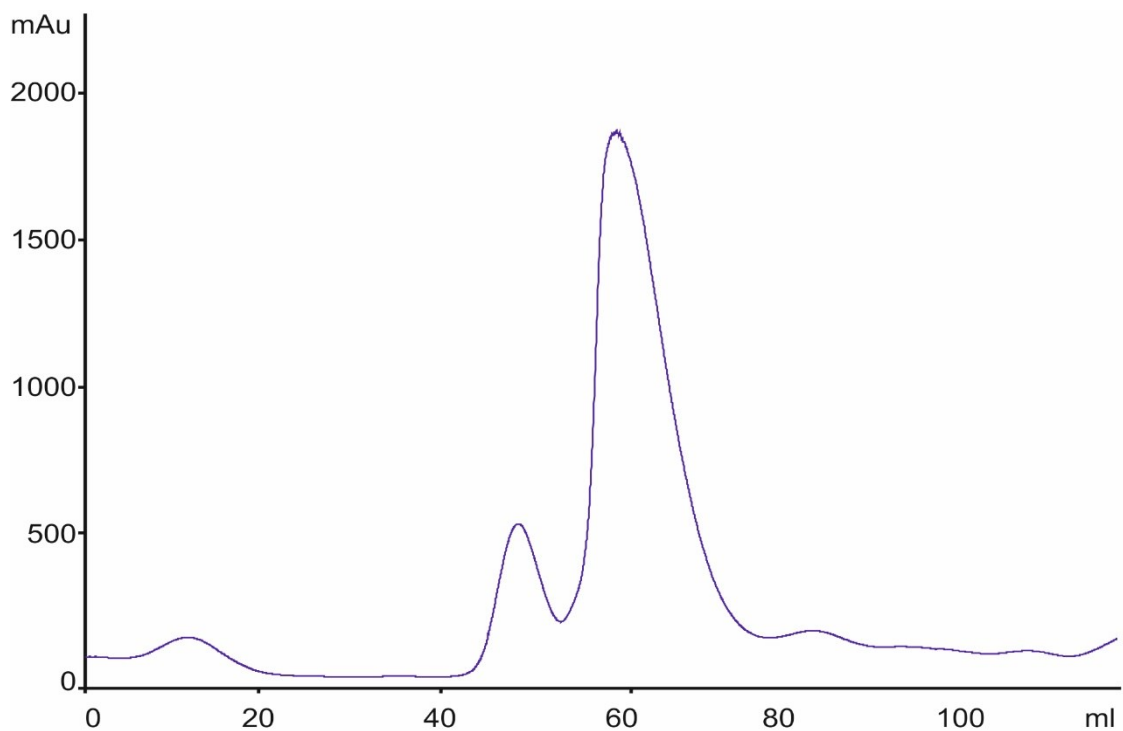
Obr. 6 SDS-PAGE analýza frakcí získaných během afinitní chromatografie $\Delta 42_CpNCE103p$ exprimované v *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR, V – vzorek supernatantu před afinitní chromatografií, N – frakce supernatantu, která protekla kolonou bez navázání na afinitní nosič, 1 – eluční frakce získaná při promývání kolony s přidavkem 5 % elučního pufru (odpovídající koncentraci imidazolu 20 mM), 2 – eluční frakce získaná při promývání kolony s koncentrací imidazolu 400 mM

5.2.3 Gelová chromatografie

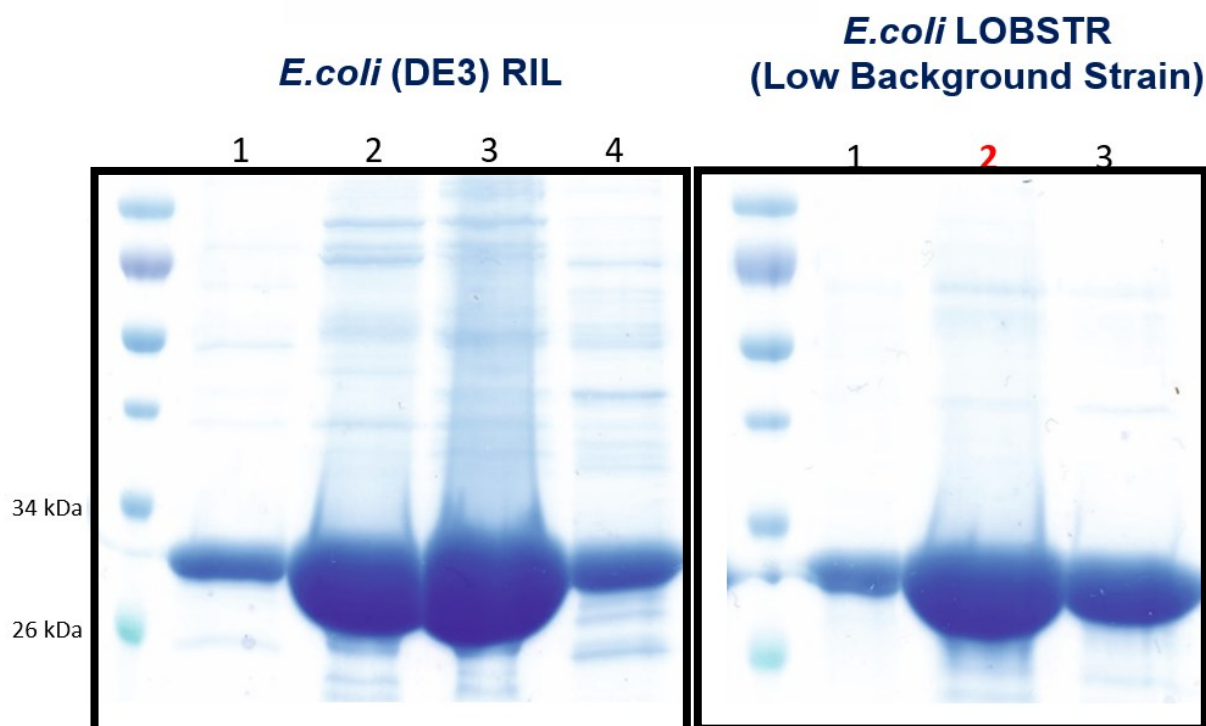
Po metaloafinitní purifikaci byla $\Delta 42_CpNCE103p$ dále čištěna pomocí gelové chromatografie. Tento krok sloužil nejen k odstranění zbytků nežádoucích proteinů a nízkomolekulárních látek, ale zároveň umožnil převedení proteinu do finálního skladovacího pufru vhodného pro další experimenty.

Gelová chromatografie byla prováděna na koloně HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200 (GE Healthcare). Na tuto kolonu byly postupně nanášeny zahuštěné vzorky proteinů, získané po afinitní chromatografii z exprese v kmenech *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR. Vzorky byly před aplikací na kolonu zahuštěny na objem 2 ml.

Průtok pufru kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Frakce byly sbírány po 3 ml a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE, s cílem ověřit čistotu a přítomnost cílového proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$. Průběh chromatografie je vidět na Obr. 7.

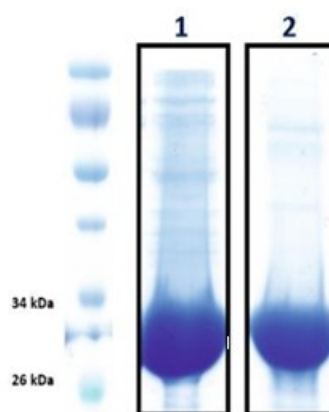


Obr. 7 Chromatografický záznam gelové chromatografie proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ exprimovaného v *E. coli* BL21 (DE3) RIL na koloně HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200



Obr. 8 SDS-PAGE analýza vybraných frakcí získaných po gelové chromatografii proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ exprimovaného v *E. coli* BL21 (DE3) RIL a *E. coli* LOBSTR

Izolované enzymy $\Delta 42_CpNCE103p$ byly uchovávány ve skladovacím pufru při teplotě 6°C. Obvyklý výtěžek purifikovaného proteinu z 1 litru bakteriální kultury se pohyboval přibližně okolo 20 mg. Finální čistota izolovaného proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$ je znázorněna na Obr. 9. Z výsledků SDS-PAGE analýzy je patrné, že použití bakteriálního kmene *E. coli* LOBSTR vedlo k výraznému snížení obsahu kontaminujících proteinů, které se nespecificky vážou na metaloafinitní kolonu HiTrap IMAC FF. Naopak při použití *E. coli* BL21 (DE3) RIL byl podíl těchto nežádoucích proteinů vyšší a provedené purifikační kroky nevedly k jejich úplnému odstranění.



Obr. 9 SDS-PAGE analýza izolovaného enzymu $\Delta 42_CpNCE103p$ po gelové chromatografii
1 – vzorek izolovaný z *E. coli* BL21 (RIL), 2 – vzorek izolovaný z *E. coli* LOBSTR

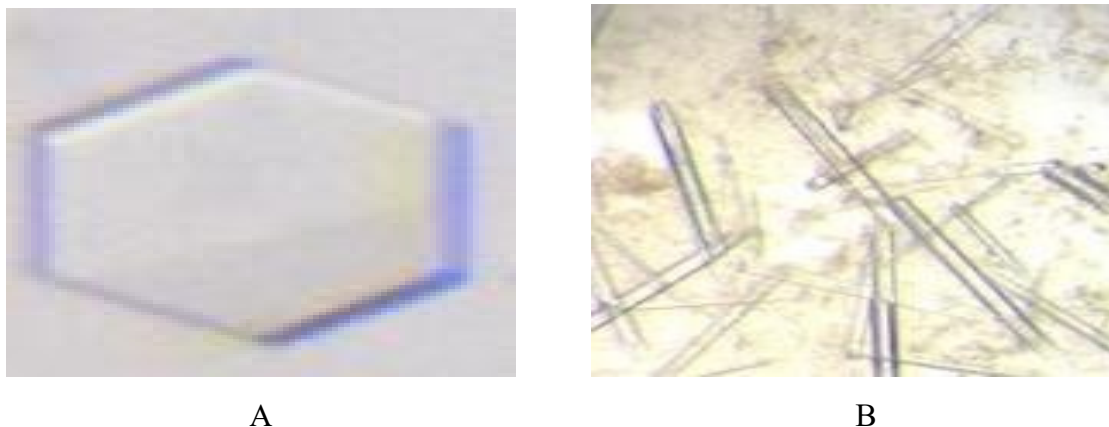
5.3 Krystalizace $\Delta 42_CpNce103p$

V rámci projektu bylo celkově otestováno 10 464 podmínek, přičemž tvorba krystalů byla zaznamenána ve 73 případech. Přehled nejvýznamnějších krystalizačních podmínek je uveden v Tab. 1.

Tabulka 1 Přehled podmínek vedoucích k úspěšné krystalizaci proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$

Protein	Složení (precipitant vždy % w/v)
$\Delta 42_CpNce103p$	140mM KSCN, 4% (w/v) PEG 3350, 15% glycerol
	200mM KCl, 100mM fosfát sodný pH 4.2, 20% PEG 3350
	200mM NaSCN, pH 6.9, 20% (w/v) PEG 3350
	200mM octan amonný, 100mM octan sodný pH 4.6, 20% (w/v) PEG 4000
	100mM bis-Tris, pH 5.5, 25%(w/v) PEG 3350

V nalezených podmínkách se nejčastěji vyskytovaly dvě formy krystalů: hexagonální tvar a tvar jehel (Obr. 10).



Obr. 10 Krystaly $\Delta 42_CpNce103p$ v podmínce
A – 200mM octan amonný, 100mM octan sodný pH 4.6, 20 % (w/v) PEG 4000
B – 200mM NaSCN, pH 6.9, 20% (w/v) PEG 3350

Vybrané krystaly byly zmrazeny v tekutém dusíku (100 K) a uchovávány ve speciálních přepravních kontejnerech pro následnou rentgenostrukturní analýzu.

5.3.1 Testování krystalů $\Delta 42_CpNce103p$ pomocí rentgenostrukturní analýzy

Testování zchlazených krystalů bylo prováděno na ústavním zdroji rentgenového záření Rigaku HF007.

Cílem bylo ověřit kvalitu krystalů pro RTG strukturní analýzu. Krystaly byly z kapalného dusíku přemístěny na goniometr, na kterém byl krystal nadále chlazen proudícím dusíkem a podrobeny rentgenostrukturní analýze (Obr. 11). Hodnocení kvality krystalů a interpretace difrakčních dat jsou podrobněji diskutovány v kapitole 6.



Obr. 11 Ukázka difrakčního obrazce: Krystal proteinu $\Delta 42_CpNce103p$ z podmínky 200mM octan amonný, 100mM octan sodný pH 4.6, 20% (w/v) PEG 4000 a jeho difrakční obrazec

Krystaly s nejlepším rozlišením bez difrakcí vodních kruhů, byly uskladněny v tekutém dusíku při 100 K a posléze zaslány k RTG analýze na synchrotron do Berlína (BL 14.1, BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB)).

5.4 Molekulové dokování

Molekulové dokování inhibitorů β -karbonické anhydrasy bylo provedeno pomocí softwaru AutoDock4.2 ve spolupráci s kolegy z ÚOCHB AV ČR, konkrétně Ing. Kamilou Clarovou a RNDr. Mgr. Martinem Lepšíkem, Ph.D. Pro každý inhibitor byla predikována preferovaná vazebná konformace v aktivním místě enzymu a byla vypočtena hodnota vazebné energie (binding energy, BE). Výpočty umožnily analyzovat přítomnost koordinační vazby mezi inhibitorem a iontem Zn^{2+} v aktivním místě, interakce s klíčovými aminokyselinami (zejména histidinem a cysteinem) a orientaci molekuly v substrátovém tunelu a aktivním centru. Interpretace pozorovaných interakcí a jejich vztah k hodnotám K_i je diskutována v kapitole 6.

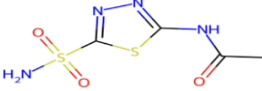
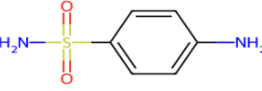
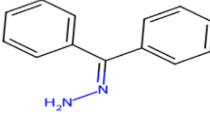
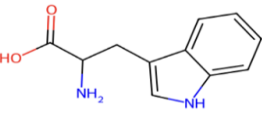
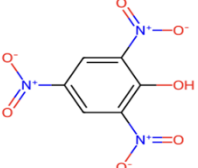
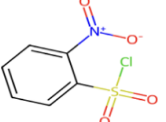
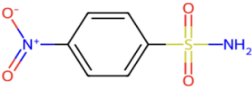
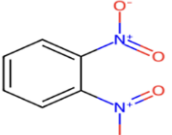
5.5 Testování inhibitorů β -karbonické anhydrasy

Aktivita proteinu byla ověřena spektrofotometricky s využitím stopped-flow. Cílem této části práce bylo testovat inhibiční účinek vybraných sulfonamidových derivátů na katalytickou aktivitu β -CA z *Candida parapsilosis*. Jako referenční inhibitor byl použit acetazolamid.

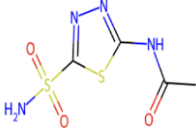
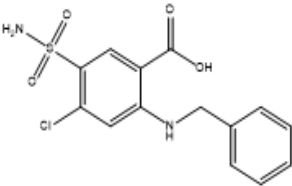
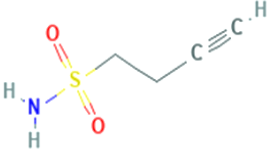
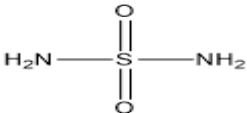
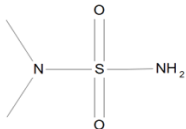
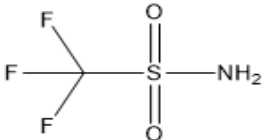
Na základě získaných dat byly počáteční rychlosti enzymové reakce v přítomnosti jednotlivých inhibitorů vyhodnoceny a dále použity pro výpočet inhibiční konstanty K_i v programu GraphPad Prism.

Celkem bylo otestováno 12 látek, které byly navrženy ve spolupráci s ÚOCHB AV ČR a odlišovaly se především typem substituentů a chemickým jádrem. Naměřené hodnoty K_i se pohybovaly v rozmezí od 1,2 μ M do 1595 μ M. Nejvyšší inhibiční účinnost vykazoval referenční inhibitor acetazolamid ($K_i = 1,2 \mu$ M), zatímco nejslabší inhibiční vykazoval sulfamid ($K_i = 1595 \mu$ M).

Tabulka 2 Hodnoty K_i inhibitorů 0–7

Číslo inhibitoru	Struktura	Název inhibitoru	K_i (μM)
0		Acetazolamid	1,2
1		Sulfanilamid	825
2		Hydrazon benzofenonu	302
3		L-Tryptofan	842
4		Kyselina pikrová	701
5		2-nitrobenzensulfonylchlorid	869
6		2-nitrobenzensulfonamid	188
7		1,2-dinitrobenzen	153

Tabulka 3 Hodnoty K_i inhibitorů 8–12

Číslo inhibitoru	Struktura	Název inhibitoru	K_i (μM)
0		Acetazolamid	1,2
8		2-(benzylamino)-4-chloro-5-sulfamoylbenzoová kyselina	377
9		but-3-yn-1-sulfonamid	933
10		Sulfamid	1595
11		Dimethylsulfamid	ND
12		Trifluormethylsulfonamid	2,2

6 Diskuze

V této kapitole je diskutováno o naměřených výsledcích.

6.1 Exprese a purifikace proteinu

V této práci byl použit vektor, který nesl zkrácenou sekvenci genu pro rekombinantní expresi β -karbonické anhydrasy CpNCE103 z *C. parapsilosis*. Zkrácení na N-konci bylo navrženo Ing. Jiřím Dostálem Ph.D., za účelem krystalizace na základě informací z literatury popisujících krystalizaci β -karbonické anhydrasy z *Saccharomyces cerevisiae*. Jednalo se o odstranění flexibilní N-koncové části proteinu, které nenarušilo aktivitu enzymu.

Při kultivaci také byla snížena teplota na 20 °C. Toto snížení teploty přispívá k vyšší rozpustnosti exprimovaného proteinu, protože zpomalí translaci a nově syntetizované polypeptidy mají více času na správné sbalení. Z cílového proteinu nevznikají tak inkluzní tělíčka, ale zůstává v rozpustné části cytosolu [23].

Dále zde byly porovnány dva běžně používané kmeny pro expresi rekombinantních proteinů: *Escherichia coli* BL21 (DE3) RIL a LOBSTR. Výsledky ukázaly, že zatímco oba kmeny umožnily úspěšnou produkci cílového proteinu $\Delta 42_CpNCE103p$, kmen LOBSTR poskytl výrazně čistší lyzát po afinitní purifikaci. Kmen *E. coli* BL21 (DE3) RIL obsahuje plasmid pRARE, který nese geny pro tRNA, která rozpoznává vzácné kodony pro *E. coli* (AGG, AUA, AGA a CUA). Přítomnost této tRNA zvyšuje míru translace cílových proteinů v transformovaných *E. coli* [24].

Kmen LOBSTR má upravené regulační oblasti genů kodující *arnA* a *slyD*. Tyto enzymy jsou bohaté na histidiny, *arnA* má 24 histidinů na hexamer a *slyD* má 15 histidinů na svém neuspořádaném C-konci. Právě kvůli vysokému obsahu histidinových zbytků, se váží při afinitní chromatografii a kontaminují cílový protein. U kmenu LOBSTR byly histidiny nahrazeny serinem u *arnA* a pro *slyD* bylo možné odstranit sekvenci kódující C-konec s histidiny [1]. Snížení obsahem histidinových zbytků u těchto proteinů, které by se vázaly při afinitní chromatografii, zvyšuje čistotu eluátu cílového proteinu. Proto se využití kmenu LOBSTR ukázalo jako vhodné v případě přípravy rekombinantní karbanické anhydrasy.

6.2 Krystalizace a výběr podmínek

Optimalizace krystalizačních podmínek zahrnovala screening čtyř komerčních sad (JSCG+, PEGs, Midas, Morpheus), ve kterých bylo otestováno přes 10 000 podmínek. Krystalizace probíhala metodou difuze par se sedící kapkou. Bylo zaznamenáno 73 podmínek vedoucích ke vzniku krystalů. Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití nízkomolekulárního PEG 3350

a glycerolu jako kryoprotektantu. Výrazně se osvědčily podmínky s pH mezi 5,5–6,9 a přítomností solí jako NaSCN nebo octan amonný. Tato pozorování odpovídají předchozím zkušenostem se strukturní analýzou β -CA jiných kvasinek [3,25].

Krystaly vhodné pro sběr difrakčních dat měly jehlicovitý tvar.

6.3 Význam referenčního inhibitoru acetazolamidu

Acetazolamid byl v této studii použit jako referenční inhibitor β -karbonické anhydrasy, což odpovídá jeho dlouhodobému využívání v biochemických studiích CA. Jedná se o klasický sulfonamid s vysokou afinitou k zinečnatému iontu v aktivním místě enzymu, přičemž vykazuje širokou inhibiční aktivitu napříč lidskými i mikrobiálními izoformami. Vhodnost použití AAA jako standardu pro srovnání nově testovaných inhibitorů byla potvrzena jeho nízkou hodnotou K_i (1,2 μM), která odpovídá literárním údajům [26].

6.4 Srovnání inhibitorů a vazebné energie

Z testovaných sulfonamidových derivátů vykazoval nejvyšší inhibiční účinek trifluoromethylsulfonamid ($K_i = 2,2 \mu\text{M}$), který svou účinností téměř odpovídal AAA. Naopak nejnižší účinnost měl sulfamid ($K_i = 1595 \mu\text{M}$). Molekulové dokování potvrdilo, že účinné inhibitory navazují koordinační vazbu se zinkem a interagují s klíčovými zbytky aktivního místa, což odpovídá nižším hodnotám vazebné energie. Inhibitory bez této interakce (např. L- rypstofan) vykazovaly slabší inhibici i vyšší predikované hodnoty vazebné energie.

7 Závěr

1. Úspěšně byla provedena exprese $\Delta 42_CpNce103p$ v *E.coli* LOBSTR, tyto exprese umožnily výtěžek o vyšší čistotě exprimovaného cílového proteinu oproti expresi v *E.coli* BL21 (RIL).
2. Hledáním krystalizačních podmínek byly nalezeny vhodné podmínky pro krystalizaci CA $\Delta 42_CpNCE103p$.
3. Byly získány vhodné krystaly CA $\Delta 42_CpNCE103p$ pro snímání difrakčních dat.
4. Byly otestovány vybrané inhibitory, přičemž jeden z nich vykazoval vůči CpNce103p srovnatelnou účinnost jako acetazolamid.

Seznam použité literatury

1. Andersen KR, Leksa NC, Schwartz TU. Optimized e. Coli expression strain lobster eliminates common contaminants from his-tag purification. *Proteins* 2013;81(11): 1857-1861.
2. Macháček, S. *Karbonické anhydrasy kvasinek rodu Candida*. Diplomová práce. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, 2018.
3. Škrlová, M. Studium struktury a funkce karbonických anhydras z patogenních kvasinek *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* a návrh nových inhibitorů. Diplomová práce. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, 2023.
4. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012;36(2): 288-305.
5. Koutserimpas C, Zervakis SG, Maraki S, Alpantaki K, Ioannidis A, Kofteridis DP, Samonis G. Non-*albicans* *Candida* prosthetic joint infections: A systematic review of treatment. *World J Clin Cases* 2019;7(12): 1430-1443.
6. Asadzadeh, M., Ahmad, S., Al-Sweih, N. *et al.* High-resolution fingerprinting of *Candida parapsilosis* isolates suggests persistence and transmission of infections among neonatal intensive care unit patients in Kuwait. *Sci Rep* 9, 1340 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37855-2>
7. Branco J, Miranda IM, Rodrigues AG. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. *J Fungi* (Basel). 2023 Jan 5;9(1):80. doi: 10.3390/jof9010080. PMID: 36675901; PMCID: PMC9862255.
8. Staniszewska M. Virulence factors in *Candida* species. *Curr Protein Pept Sci* 2020;21(3): 313-323.
9. Noble SM, French S, Kohn LA, Chen V, Johnson AD. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *PLoS Pathog*. 2011;7(3):e1002485. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002485>
10. Lindskog S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* 1997;74(1): 1-20.
11. Supuran CT. Carbonic anhydrases as drug targets. *Curr Pharm Des* 2008;14(7): 601-602.

12. Elleuche S, Pöggeler S. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology (Reading)*. 2010 Jan;156(Pt 1):23-29. doi: 10.1099/mic.0.032581-0. Epub 2009 Oct 15. PMID: 19833770.
13. Nocentini A, Supuran CT, Capasso C. An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2021 Dec;36(1):1988-1995. doi: 10.1080/14756366.2021.1972995. PMID: 34482770; PMCID: PMC8425729.
14. Gotz R, Gnann A, Zimmermann FK. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene nce103 of the yeast *saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* 1999;15(10A): 855-864.
15. Cleves AE, Cooper DN, Barondes SH, Kelly RB. A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 1996 Jun;133(5):1017-26. doi: 10.1083/jcb.133.5.1017. PMID: 8655575; PMCID: PMC2120850.
16. Teng YB, Jiang YL, He YX, He WW, Lian FM, Chen Y, Zhou CZ. Structural insights into the substrate tunnel of *Saccharomyces cerevisiae* carbonic anhydrase Nce103. *BMC Struct Biol*. 2009 Oct 24;9:67. doi: 10.1186/1472-6807-9-67. PMID: 19852838; PMCID: PMC2775743.
17. Supuran CT. Carbonic Anhydrases and Metabolism. *Metabolites*. 2018 Mar 21;8(2):25. doi: 10.3390/metabo8020025. PMID: 29561812; PMCID: PMC6027401.
18. Supuran CT. Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. *Metabolites*. 2017 Sep 16;7(3):48. doi: 10.3390/metabo7030048. PMID: 28926956; PMCID: PMC5618333.
19. Vullo D, Leewattanapasuk W, Mühlischlegel FA, Mastrolorenzo A, Capasso C, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the β -class enzyme from the pathogenic yeast *Candida glabrata* with sulfonamides, sulfamates and sulfamides. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 May 1;23(9):2647-52. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.02.092. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23511020.
20. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63. doi: 10.1128/CMR.00029-06. PMID: 17223626; PMCID: PMC1797637.
21. Peter G. Pappas, Carol A. Kauffman, David Andes, Daniel K. Benjamin, Thierry F. Calandra, John E. Edwards, Scott G. Filler, John F. Fisher, Bart-Jan Kullberg, Luis Ostrosky Zeichner, Annette C. Reboli, John H. Rex, Thomas J. Walsh, Jack D. Sobel, Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 48, Issue 5, 1 March 2009, Pages 503–535, <https://doi.org/10.1086/596757>

22. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*. 2009 Dec;30(16):2785-91. doi: 10.1002/jcc.21256. PMID: 19399780; PMCID: PMC2760638.
23. Schein, C. Production of Soluble Recombinant Proteins in Bacteria. *Nat Biotechnol* 7, 1141–1149 (1989). <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>
24. AGILENT TECHNOLOGIES. *BL21-CodonPlus Competent Cells: Instruction Manual*. Santa Clara: Agilent, 2005. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/230240.pdf>
25. Rowlett RS. Structure and catalytic mechanism of beta-carbonic anhydrases. *Subcell Biochem* 2014;75(53-76).
26. Tsikas D. Acetazolamide and human carbonic anhydrases: retrospect, review and discussion of an intimate relationship. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2024 Dec;39(1):2291336. doi: 10.1080/14756366.2023.2291336. Epub 2023 Dec 11. PMID: 38078375; PMCID: PMC11721854.