

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Tereza Dolejšová

Topologie a funkce transmembránové domény kolicinu U,

bakterie *Shigella boydii*

Topology and function of the transmembrane domain of colicin U produced by

Shigella boydii

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce:

RNDr. Radovan Fišer, Ph.D

Praha, 2015

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, 14. 08. 2015

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Radovanu Fišerovi, Ph.D. za trpělivé vedení, přínosné rady a inspiraci při psaní mé diplomové práce i během celého studia.

Také bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Davidu Šmajsovi Ph.D. za možnost část své práce vypracovávat v jeho laboratoři bakteriální genetiky a genomiky, LF MU, Mgr. Juraji Bosákovi, Ph.D. a Mgr. Kateřině Snopkové za pomoc s prováděním cílené mutagenese a produkce kolicinu U i zbylému osazenstvu laboratoře za milé přijetí.

Děkuji Mgr. Tomáši Waldovi Ph.D. za pomoc s gelovou permeační chromatografií prováděnou v laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů, AV ČR.

Mé díky také patří celé skupině laboratoře fyziologie bakterií, PřF UK za rady a pomoc s každým problémem a především za vytvoření přívětivého pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům a svému příteli za neustálou a všestrannou podporu v rámci celého mého studia.

Abstrakt

Kolicin U produkovaný kmeny bakterie *Shigella boydii* je protein, který je schopen působit lyticky na blízké bakteriální kmeny *Shigella* a *Escherichia*. Na základě sekvenční podobnosti s koliciny A, B a N se řadí mezi pórotočné koliciny. Interakce kolicinu s napadenou bakterií je zajištěna třístupňovým mechanismem: 1) Nejdříve interaguje centrální doména kolicinu s receptory vnější membrány OmpA, OmpF. 2) Dále je kolicin prostřednictvím N-terminální domény a její interakce s Tol proteiny přenesen do periplazmy a nakonec 3) C-terminální doména interaguje s vnitřní membránou napadené bakterie a způsobuje její depolarizaci.

V předkládané práci byla prokázána pórotočnost kolicinu U a dále podrobně studovány vlastnosti těchto pórů pomocí elektrofyziologických metod (měření na černých lipidových membránách). Byla stanovována vodivost jednotlivých pórů (19 pS), jejich iontová selektivita, byl sledován vliv změny různých podmínek na chování pórů. Tyto poznatky, v mnoha případech, odpovídaly zjištěním o jiných příbuzných kolicinech (kolicin B, N). Dále byl určován průměr póru ($\approx 0,8$ nm).

V další části práce byly vytvořeny jednobodové cysteinové mutace v rámci pórotočné domény kolicinu U, následně bylo vyprodukováno pět mutantních variant kolicinu U a na závěr byla ověřena jejich funkčnost tak, aby mohly být dále použity pro určení topologie pórotočné domény kolicinu U v membráně.

Klíčová slova: kolicin U, *Shigella boydii*, černé lipidové membrány (BLM), pórotočný, cysteinová mutagenese

Abstract

Colicin U is a protein produced by strains of bacterium *Shigella boydii*. It exhibits antibacterial activity against some bacterial strains *Shigella* and *Escherichia*. Based on sequence homology with colicins A, B and N, the colicin U is classified as a pore-forming colicin. Interaction of colicin U with attacked bacteria is ensured by three-step mechanism: 1) First colicin U interacts with surface receptors OmpA, OmpF and core of LPS. 2) Thereafter the colicin is translocated to periplasm through interaction with Tol proteins. 3) Finally colicin U interacts with the inner membrane of the attacked bacteria causing its depolarization.

In this thesis I demonstrated pore-forming features of colicin U and further observed characteristics and properties of these pores. Using methods of measuring on black lipid membranes I determined a single channel conductance (19 pS), ion selectivity, the influence of various conditions on the behaviour of the pores. These findings, in many cases, correspond to the findings on other related colicins. Furthermore, I successfully determined the pore diameter of colicin U ($\approx 0,8$ nm).

The next section of the thesis focuses on creation of single cysteine mutations of colicin U. Subsequently I produced five mutant variants of colicin U and verified their functionality so that they can be further used to determine the topology of transmembrane domain of colicin U in a membrane.

Klíčová slova: colicin U, *Shigella boydii*, black lipid membranes (BLM), pore-forming, cysteine mutagenesis

Obsah

Obsah.....	5
Seznam zkratk.....	8
1 Úvod	9
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1. Shigella boydii	10
2.2. Charakteristika kolicinů.....	11
2.3. Funkční klasifikace kolicinů	13
2.4. Jednotlivé domény kolicinů a jejich funkce	15
2.5. Struktura pórtvorné domény	18
2.5.1. Struktura pórtvorné domény v roztoku	18
2.5.2. Struktura pórtvorné domény v membráně – zavřený pór.....	19
2.5.3. Struktura pórtvorné domény v membráně – otevřený pór.....	20
2.6. Alternativní modely struktury póru	22
2.6.1. Toroidní model.....	22
2.6.2. Lipidové kanály.....	23
2.7. Charakteristiky kanálovitvorných proteinů	23
2.8. Pórtvorné vlastnosti příbuzných kolicinů.....	26
2.8.1. Kolicin A.....	27
2.8.2. Kolicin B.....	27
2.8.3. Kolicin N	28
2.8.4. Kolicinn E1	28
2.8.5. Kolicin Ia	29
2.9. Sledování topologie transmembránových proteinů pomocí cysteinových mutací	29
3 MATERIÁL A METODY	32
3.1. Přístrojové vybavení, chemikálie a další materiál.....	32
3.1.1. Použité chemikálie	32
3.1.2. Použité roztoky a pufry	34
3.1.3. Kultivační media	36
3.1.4. Komerční soupravy.....	37
3.1.5. Použité mikroorganismy a plazmidy	37
3.1.6. Přístrojové vybavení.....	37
3.1.7. Software	39
3.2. BLM (černé lipidové membrány).....	39

3.2.1.	Analýza a záznam jednotlivých událostí.....	40
3.2.2.	Iontová selektivita	41
3.2.3.	Efekt náboje v ústí póru a jeho okolí.....	44
3.2.4.	Stanovení průměru pórů - Renkinův model.....	44
3.2.5.	Stanovení průměru pórů s využitím různých neelektrolytů – channel filling	46
3.3.	Cysteinová mutagenese kolycinu U	47
3.3.1.	Návrh aminokyselin vhodných pro cílenou PCR mutagenyzy a návrh primerů.....	47
3.3.2.	Cílená PCR mutagenese.....	48
3.3.3.	Gelová elektroforéza.....	49
3.3.4.	Měření koncentrace a čistoty DNA	50
3.3.5.	Příprava chemokompetentních buněk.....	50
3.3.6.	Uměle navozená transformace	50
3.3.7.	Izolace plazmidové DNA.....	51
3.3.8.	Příprava vzorků na sekvenaci	51
3.3.9.	Produkce a purifikace kolycinu U a jeho mutant	52
3.3.10.	Zakoncentrování a diafiltrace proteinů pomocí Amicon ultrafiltrační kyvety	54
3.3.11.	Gelová permeační chromatografie	55
3.3.12.	Zakoncentrování proteinu pomocí přístroje Speedvac.....	56
3.3.13.	SDS-PAGE	56
3.3.14.	Western blot	57
3.3.15.	Denzitometrická analýza proteinu na SDS-PAGE	58
3.3.16.	Stanovení titru kolycinu	59
4	Výsledky.....	60
4.1.	Charakteristiky pórů kolycinu U	60
4.1.1.	Vodivostní charakteristika pórů kolycinu U v membránách z azolektinu a extraktu lipidů bakterie E.coli.....	60
4.1.2.	Iontová selektivita pórů kolycinu U	62
4.1.3.	Vliv změny pH roztoku na vodivost a aktivitu pórů.....	64
4.1.4.	Význam vápenatých iontů	65
4.1.5.	Vliv koncentrace roztoku	66
4.1.6.	Stanovení průměru pórů s využitím kationtů a aniontů o různých poloměrech	67
4.1.7.	Stanovení průměru pórů s využitím různých neelektrolytů.....	69
4.2.	Cysteinová mutagenese kolycinu U	73
4.2.1.	Návrh pozic mutací.....	73

4.2.2.	Cílená PCR mutageneze.....	75
4.2.3.	Ověření produkce funkčních variant kolicinu U	78
4.2.4.	Produkce a purifikace kolicinu U a jeho mutantních variant	78
4.2.5.	Kontrola funkčnosti mutovaných proteinů	84
5	Diskuze	89
6	Souhrn	100
	Přehled použité literatury	101
	Příloha.....	I - III

Seznam zkratek

A.U.	bezrozměrná jednotka (arbitrary unit, značí intenzitu fluorescence)
APS	peroxodisíran amonný
BLM	black lipid membrane
BSA	hovězí sérový albumin
POPC	palmitoyloleoylfosfatidyl cholin
DOPE	dioleoylfosfatidyl ethanolamin
DPhPC	difytanoylfosfatidyl cholin
DPhPE	difytanoylfosfatidyl ethanolamin
DPhPS	difytanoylfosfatidyl serin
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FPLC	rychlá proteinová kapalinová chromatografie
FRET	rezonanční energetický přenos (Förster resonance energy transfer)
HEPES	kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová
His-Tag	hexahistidinová značka
LPS	lipopolysacharid
kDa	kilodalton
NiNTA	nitrilotrioctová kyselina s navázaným Ni^{2+}
OD	optická denzita
OMP	proteiny vnější membrány
PCR	polymerázová řetězová reakce
Rpm	počet otáček za minutu (rounds per minute)
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS polyakryamidová gelová elektroforéza
SCR	záznam jednotlivých kanálů (single channel recording)
TBS	roztok Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH = 8 (Tris-buffered saline)
TEA	tetraethylamonium
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	poměr objemů dvou látek v roztoku
w/v	koncentrace látky v rozpouštědle (kg/l)
w/w	poměr hmotností látek v roztoku nebo suspenzi
wt	divoký typ (wild type)

1 Úvod

Koliciny jsou bakteriociny produkované bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, nejčastěji pak bakterií druhu *Escherichia coli*. Tyto proteiny mají velice úzké spektrum účinku, působí tedy toxicky pouze na bakteriální kmeny blízce příbuzné kmeni produkčnímu. I proto se uvažuje nad jejich potencionálním využitím v rámci specifické antimikrobiální léčby. Téměř polovina kmenů bakterie *E.coli* z klinických izolátů lidského gastrointestinálního traktu je schopna syntetizovat alespoň jeden typ kolicinu. Právě v tomto prostředí, kde je konkurenční boj mezi jednotlivými kmeny zvláště intenzivní by schopnost produkovat koliciny bakteriím mohla přinášet jistou výhodu. Koliciny mají různé typy mechanismu účinku, které jsou zajišťované C-terminální doménou kolicinu. Některé jsou schopny nukleázové aktivity, jiné fosfatázové a některé pórtvorné aktivity. Pórtvorné koliciny jsou největší skupinou. Krystalová struktura několika dosud známých pórtvorných kolicinů v roztoku dokonce již byla vyřešena, ale struktura C-terminální domény zanořené v membráně zatím nikoliv, i když již existují desítky studií, které se tímto problémem zabývají a které nám poskytují různá vodítka, k vyřešení této struktury. Navíc je zajímavé, že sekundární struktury pórtvorných domén kolicinů jsou si velmi podobné, tudíž je teoreticky možné výsledky získané u jiných kolicinů vztahovat i k našim získaným poznatkům. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla použít kolicin U jako modelového zástupce pórtvorných kolicinů a na něm studovat topologii a chování pórů, které v membráně napadené bakterie pórtvorné koliciny vytváří.

Dílčím cílem mé práce bylo vytvořit standardní protokol na metodu přípravy a purifikace kolicinu U. S jeho pomocí jsem se dopracovala k mému prvnímu hlavnímu cíli - charakterizovat vlastnosti pórů kolicinu U prostřednictvím metody měření na planárních membránách. Konkrétně tedy určit vodivost pórů, jejich iontovou selektivitu, jejich přibližnou velikost a tvar, zjistit vliv elektrostatických interakcí mezi fosfolipidy a ionty, prozkoumat propustnost pórů pro různé ionty, zjistit vliv pH a membránového potenciálu na vlastnosti kolicinových molekul a tato data poté porovnat s ostatními koliciny.

Druhým cílem mé práce bylo vytvořit bodové cysteinové mutace na specifických pozicích pórtvorné domény kolicinu U. Nakonec také připravit a purifikovat takto mutované proteiny a ověřit jejich funkčnost tak, aby bylo možné je následně využít pro fluorescenční a biotynilační pokusy, kterými v rámci záměru své další práce určím membránovou topologii pórů kolicinu U.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. *Shigella boydii*

Bakterie rodu *Shigella* poprvé popsal Kiyoshi Shiga roku 1897 a nazval je *Bacillus dysentericus* (Shiga, K. 1897 citováno podle Schroeder and Hilbi, 2008). Název *Bacillus* získaly, protože se nápadně podobaly bakterii *Bacillus coli* (dnes *Escherichia coli* (Hale and Keusch, 1996)). Ve čtyřicátých letech 20. století byl tento rod rozdělen na 4 druhy na základě jejich antigenní charakteristiky (Ewing, 1949). Dodnes toto rozdělení s drobnými změnami zůstalo, dělí se na 4 séro skupiny (rozčleňovány jako druhy): *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. sonnei*. I přesto, že ještě dnes jsou bakterie *Shigella* v mnoha studiích stále považovány za samostatný rod, nejen z historických důvodů, ale také kvůli závažnosti průjemového onemocnění (bacilární úplavice), kterou způsobují (van den Beld and Reubsaet, 2012), na základě genetické příbuznosti však jasně spadají do bakteriálního rodu *Escherichia* a čeledi *Enterobacteriaceae* (Zuo et al. 2013).

Bakterie rodu *Shigella* jsou tedy gramnegativní, nepohyblivé, fakultativně anaerobní a nesporulující bakterie, které produkují mnoho různých virulenčních faktorů kódovaných nejen na chromozomální DNA, ale především na velkých virulenčních plasmidech (Yang et al., 2005). Tato bakterie je fakultativní intracelulární patogen, který způsobuje nemoc zvanou bacilární úplavice (šigelóza), což je vlastně akutní střevní infekce. Tato infekce se může projevovat různě, od mírných vodnatých průjmů až k těžké úplavici, která se vyznačuje horečkou, břišními křečemi a stolicí obsahující krev a hlen (Niyogi, 2005). Tato nemoc představuje velké riziko pro jedince s oslabenou imunitou a pro lidi bez dostupné lékařské péče, způsobuje tedy velké problémy především v rozvojových zemích, což je patrné z práce Kotloff et al. (1999), shrnující data o incidenci bacilární úplavice mezi lety 1966-1997, kdy bylo zaznamenáno až 164 miliónů nakažených, přičemž většina byla z rozvojových zemí a dále 1,1 miliónu mrtvých, z toho 61% byly děti ve věku 5 let a méně. V další studii z roku 2010 (Bardhan et al., 2010), kde jsou shrnuta data získaná o incidenci nemoci v Asii mezi lety 2000-2009, bylo zaznamenáno 125 miliónů nakažených ale už pouze 14 tisíc úmrtí, což autoři této studie připisují zlepšení lékařské péče zahrnující přísun vitamínu A a další opatření. Při dostupné lékařské péči se aplikuje především dostatečná orální rehydratace doplněná většinou léčbou antitibiotiky (Niyogi, 2005). Vzhledem ke zvyšující se rezistenci těchto bakterií ke stávajícím antibiotikům (Niyogi, 2007), se dokonce vyplácí i vývoj vakcíny (Walker, 2015).

Bakterie *Shigella boydii* patří mezi méně rozšířený druh bakterií rodu *Shigella*, který se vyskytuje především na indickém subkontinentu (Taneja et al., 2004; Yang et al., 2005). A

jak je již z názvu mé práce patrné, je producentem kolicinu U (Šmajš et al., 1997). Není ale jedinou bakterií rodu *Shigella* schopnou produkovat koliciny. Známým producentem kolicinů je i bakterie *Shigella sonnei*, u které bylo zjištěno, že je schopna produkovat mnoho druhů kolicinů (E1, E5, E6, Js, Ia, Ib a Js) (Horák, 1994; Šmarda et al., 1987). Dokonce byla v padesátých letech 20. století navržena technika na rozlišení jednotlivých kmenů bakterie *S. sonnei* na základě jejich kapacity produkovat koliciny (Abbott and Shannon, 1958). Nicméně význam kolicinů pro bakterie rodu *Shigella* stejně tak jako pro bakterie rodu *Escherichia* je poněkud nejasný a dále se jím budu zabývat v následujících odstavcích.

2.2. Charakteristika kolicinů

Koliciny patří do velké skupiny látek nazývajících se bakteriociny. Ty jsou produkovány jak bakteriemi gramnegativními, tak i grampozitivními. Spojuje je to, že všechny vykazují antimikrobiální aktivitu. Podle Klaehammera (1988) je až 99% bakterií schopno produkovat alespoň jeden druh bakteriocinu a skutečnost, že je jich dosud objeven jen zlomek, je prý v důsledku malého množství lidí, kteří se tímto tématem zabývají. Koliciny patří mezi nejintenzivněji studované bakteriociny gramnegativních bakterií. Jejich hlavním producentem je bakterie *E. coli*, podle které získaly i název (Gratia, 1925 citováno podle Gratia, 2000). Je prokázáno, že až 30 – 50 % bakterií *E. coli* izolovaných z člověka je schopno produkovat koliciny (Riley and Gordon, 1992). Tyto proteiny jsou schopné působit toxicky na blízké příbuzné bakteriální kmeny produkčního kmene. Předpokládá se, že by mohly být produkčními bakteriemi využívány v rámci konkurenčního boje (Riley and Gordon, 1999; Riley and Wertz, 2002).

Geny pro koliciny se běžně vyskytují na speciálních Col plazmidech, přičemž existují dva typy těchto plazmidů, plazmidy typu I a typu II (Hardy et al., 1973). Plazmidy typu I se běžně vyskytují až ve 20 kopiích na buňku a mají velikost mezi 6 – 10 kb a kódují většinou koliciny ze skupiny A, zatímco plazmidy typu II jsou velké plazmidy vyskytující se jen v jedné kopii na buňku a nejčastěji kódují koliciny ze skupiny B (skupiny A a B budu charakterizovat později). Navíc je prokázáno, že jedna bakterie může obsahovat zároveň plazmidy kódující různé koliciny. Plazmidy kódující koliciny také často obsahují geny pro imunitní a lytický protein (Riley, 1993). Imunitní protein bývá exprimován buňkou zároveň s produkcí kolicinu. Tento malý protein interaguje se syntetizovanými koliciny a brání jim tak v působení na produkující buňku (Walker et al., 2003; Wallis et al., 1995), kdy v případě pórtvorných kolicinů s nimi interaguje přímo v membráně produkční bakterie (Pilsel et al.,

1998). Lytické proteiny jsou velmi malé lipoproteiny exprimované zároveň s koliciny (Cavard, 1991, 2004; Cavard et al., 1985; Jakes and Zinder, 1984; James et al., 1987; Waleh and Johnson, 1985). Jsou zodpovědné za lyzi buňky a následné uvolnění kolicinů do prostředí. Nemusí se ale vyskytovat ve všech plazmidech, nejčastěji chybí na plazmidech kódujících koliciny skupiny B (Thumm et al., 1988). Naopak jiné plazmidy kódují dokonce dva druhy lytického proteinu pro jeden kolicin (James et al., 1987). K expresi genů pro koliciny dochází v okamžiku, kdy v buňce dojde k SOS odpovědi. Dříve se předpokládalo, že efektivním spouštěčem může být cokoli, co buňku vystaví stresu a způsobí nastartování SOS odpovědi v buňce (Pugsley, 1984; Salles and Weinstock, 1989; Kuhar et al., 2001, Butala et al., 2008), nicméně na základě nedávné studie se zdá, že zdaleka nejúčinnějším spouštěčem je mutagen, který způsobuje přímo poškození DNA, jako je například mitomycin C (Ghazaryan et al., 2014). Transkripce kolicinového operonu je regulována pomocí proteinů LexA, které jsou schopny bránit expresi SOS genů. Kolicinový operon totiž obsahuje LexA oblasti, na které se dimer proteinů LexA váže a brání tak expresi kolicinů (Llobès et al., 1988). Když v buňce dojde k poškození její DNA, dojde k aktivaci proteinu RecA, který stimuluje autokatalytické štěpení proteinů LexA a tím nastartuje expresi kolicinu. Předpokládá se, že exprese více než 75% známých bakteriocinů je regulována právě pomocí tohoto mechanismu (Gillor et al., 2008).

Význam studia kolicinů

Studium kolicinů v posledních desítkách let nabývá stále většího významu, což koresponduje se stále se zvyšujícími možnostmi využití kolicinů a hledáním dalších. Již dlouho jsou koliciny považovány za modelové bakteriociny, s jejichž pomocí jsou prováděny studie zaměřené na objasnění funkce jiných proteinů gramnegativních bakterií, jako jsou například proteiny vnější membrány (OMP), Tol proteiny a další proteiny, se kterými koliciny interagují. Používají se také ke zkoumání mechanismu transportu jiných látek, jako jsou například cefalosporinová antibiotika, která jsou transportována stejným proteinovým systémem - TonB systémem (Tatsumi et al., 1995). Kvůli jejich specifitě se o kolicinech uvažuje jako o potenciální alternativě antibiotik, zvláště kvůli stále se zvyšujícímu počtu rezistentních bakterií. Již byly prováděny i studie s koliciny jako léky proti průjmovým onemocněním. Pokusy byly prováděny na prasatech, kdy se vědci pokoušeli pomocí kolicinu E1 léčit průjmy po odstavení (postweaning diarrhoea) u mladých jedinců. Podle výsledků této práce se zdá, že kolicin E1 snížil incidenci této nemoci a navíc tito léčeni jedinci nadále lépe rostli. Je to první studie prováděná přímo s purifikovaným kolicinem (Cutler et al., 2007).

Nicméně už dlouho existují různá bakteriální probiotika. Mezi tyto přípravky patří například MUTAFLOOR či SYMBIOFLOOR, které pomáhají v léčbě idiopatické chronické zácpy stejně jako na funkční střevní poruchy či chronická zánětlivá onemocnění (Jansen et al., 1998; Lodinová-Zádníková et al., 1998). Pomocí analýzy genomu bakterie obsažené v těchto přípravcích, *E. coli* Nissle 1917, byly studovány všechny faktory, které mohly ovlivnit výjimečnost tohoto kmene bakterie *E. coli*. Jedním z těchto faktorů je i schopnost produkovat několik mikrocínů (Grozdanov et al., 2004). V genovém inženýrství se pak uplatňují i samotné Col plazmidy.

2.3. Funkční klasifikace kolicinů

Koliciny řadíme do široké skupiny bakteriocínů, což je skupina různě velkých peptidů a proteinů, které vznikají ribozomální syntézou různých druhů bakterií. Od tradičních antibiotik se liší právě tím, že jsou produkovány ribozomální syntézou, ale také tím, že mají většinou velice úzké spektrum působnosti, tedy že působí jen na blízce příbuzné bakteriální kmeny (Riley and Wertz, 2002). Je známo, že dokonce i archebakterie jsou schopny bakteriociny produkovat (Torreblanca et al., 1994, Prangishvili et al., 2000). Celkově se bakteriociny dělí do různých podskupin na základě mnoha různých vlastností. Nejběžněji se rozlišují na bakteriociny, které jsou produkovány gramnegativními eubakteriemi, grampozitivními eubakteriemi či archaebakteriemi. Koliciny patří právě do skupiny produkované gramnegativními bakteriemi spolu s mikrociny, které se liší od kolicinů především tím, že mají molekulovou hmotnost menší než 10 kDa a bývají ještě dále postranslačně modifikovány (Duquesne et al., 2007).

Samotná skupina kolicinů se klasifikuje pomocí schématu navrženého Fredericqem (1957), kdy jsou jednotlivé typy kolicinů rozlišovány pomocí jejich receptorové specifity. Nicméně někdy mohou různé koliciny využívat stejný receptor a přesto jsou odlišné, v tomto případě se jednotlivé typy rozlišují podle absence zkřížené imunity produkčních kmenů a jednotlivé typy kolicinů se kromě písmena rozlišují ještě pomocí přidaného čísla. Dnes již ale nomenklatura není jednotná a je možné najít mnoho výjimek. Dále se jako doplňkové rozlišení používá dělení kolicinů do skupiny A a B na základě jejich mechanismu transportu nebo na základě jejich mechanismu účinku. V prvním případě do **skupiny A** patří koliciny **A, E1-E9, K, L, N, S4, U, Y, bakteriocin 28b, kloacin DF13** a do **skupiny B** patří koliciny **B, D, Ia, Ib, M, S1, 5, 10 a pesticin** (Cascales et al., 2007). V druhém případě jsou koliciny děleny podle mechanismu účinku na buňky:

- Koliciny pórotvorné, způsobující depolarizaci cytoplazmatické membrány (A, E1, B, Ia, Ib, K, L, N, S4, U, Y, 5 a 10, bakteriocin 28b).
- Koliciny nukleázové (E2, E3, E4, E6, E7, E8, E9 a kloacin DF13), které můžeme dále rozdělit podle místa zásahu na koliciny s DNázovou aktivitou, tRNázovou aktivitou a koliciny s jinou ribonukleázovou aktivitou.
- Koliciny degradující či inhibující syntézu peptidoglykanu (M, pesticin I).

Přehled v současné době známých kolicinů v čeledi *Enterobacteriaceae* je uvedený v Tab. 1.

Tab 1: Přehled v současné době známých kolicinů v čeledi *Enterobacteriaceae* (Šmarda a Šmajs 1998; upravené)

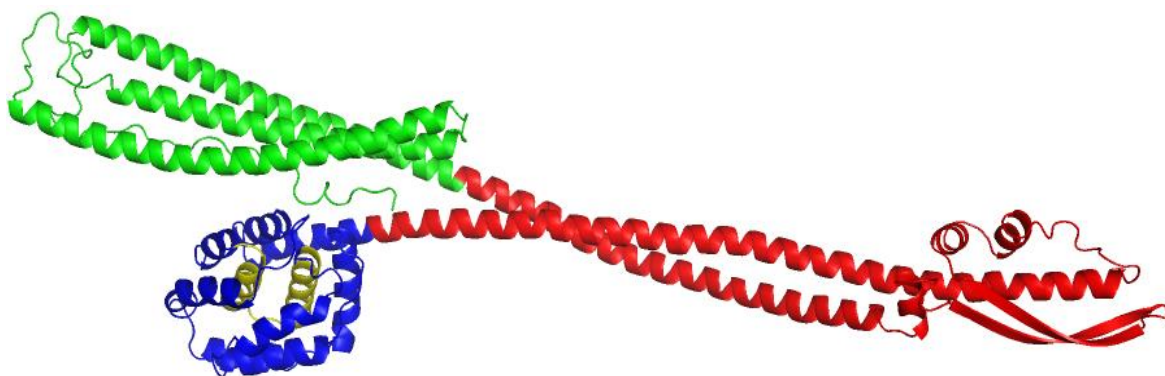
Kolicin	Receptor/přenašeč	Transportní mechanismus	Mechanismus účinku	Producent
A	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	Ionofor	<i>C. freundii</i>
B	FepA	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>E. coli</i>
D	FepA	TonB, ExbB,D	tRNA nukleáza	<i>E. coli</i>
E1	BtuB/TolC	TolA,Q,R	Ionofor	<i>E. coli</i>
E2	BtuB, OmpF	TolA,B,Q,R	DNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E3	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E4	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E5	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	tRNA nukleáza	<i>E. coli</i>
E6	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	rRNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E7	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E8	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
E9	BtuB/OmpF	TolA,B,Q,R	DNA endonukleáza	<i>E. coli</i>
Fy	YiuR	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>Y. frederiksenii</i>
Ia	Cir	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>E. coli</i>
Ib	Cir	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>E. coli</i>
Js	CjrC	Cjrb, ExbB,D	?	<i>S. sonnei</i>
K	Tsx/OmpF,A	TolA,B,Q,R	Ionofor	<i>E. coli</i>
L	?/OmpA	TolA,Q,?	Ionofor	<i>S. marcescens</i>
M	FhuA	TonB, ExbB,D	inhibitor syntézy mureinu	<i>E. coli</i>
N	OmpF/OmpC, PhoE	TolA,Q,R	Ionofor	<i>E. coli</i>
S1	Cir	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>S. sonnei</i>
S4	OmpW	TolA,B,Q,R	Ionofor	<i>S. boydii</i>

U	OmpA/OmpF, LPS	TolA,B,Q,R	Ionofor	<i>S. boydii</i>
Y	OmpA/OmpF, LPS	TolA,B,Q,R*	Ionofor*	<i>E. coli</i>
5	Tsx/TolC	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>E. coli</i>
10	Tsx/TolC	TonB, ExbB,D	Ionofor	<i>E. coli</i>
Pesticin	FyuA	TonB, ExbB,D	hydrolýza mureinu	<i>Y. pestis</i>
Bakteriocin 28b	?/OmpA,F, LPS	TolA,B,Q,R	Ionofor	<i>S. marcescens</i>
Kloacin DF13	IutA/OmpF	TolA,Q,R	rRNA endonukleáza	<i>E. cloacae</i>

Poznámka: Ionofor – kolicin depolarizující membránu; LPS – lipopolysacharid; * domněnka na základě velké sekvenční podobnosti s kolicinem U

2.4. Jednotlivé domény kolicinů a jejich funkce

Všechny dosud známé koliciny se skládají ze tří funkčně odlišených domén (Obr. 1). Centrální doména zajišťuje prvotní interakci kolicinu s receptorem napadené bakterie. N-terminální doména zajišťuje přechod přes vnější membránu a periplazmu k cytoplazmatické membráně a C-terminální doména zajišťuje samotnou lytickou aktivitu kolicinu.

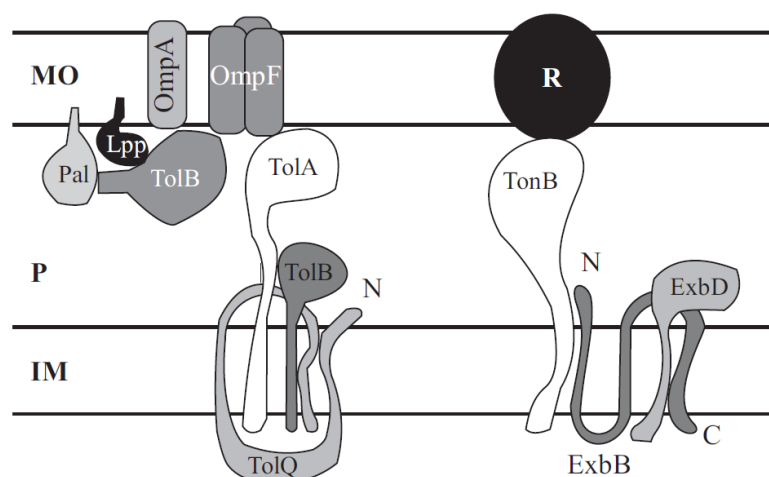


Obr. 1: Krystalová struktura kolicinu Ia, N-terminální doména – zelená, centrální doména – červená, C-terminální doména – modrá, hydrofobní vlásenka – žlutá. Struktura PDB: 1CII.

Centrální doména je schopna specificky interagovat s receptorem na vnější bakteriální membráně, čímž umožňuje zachycení kolicinu na napadené bakterii i jeho následnou aktivitu. Druhy interagujících receptorů se od sebe liší v závislosti na druhu kolicinu. Nejčastěji se jedná o protein BtuB, který je umístěn ve vnější membráně bakterie a jeho původní funkcí je přenos vitamínu B₁₂ (Mock and Pugsley, 1982; Kadner et al., 1992), dále pak proteiny Cir, OmpF, OmpA a další proteiny běžně se vyskytující ve vnější bakteriální membráně (El Kouhen et al., 1993; Smajs et al., 1997; Jakes and Finkelstein, 2010). Některé z těchto

proteinů dále slouží i jako transportéry kolicinů přes vnější membránu do periplazmy. Dodnes není zcela jasné, jakým způsobem a mechanismem se koliciny dostávají přes vnější bakteriální membránu. Předpokládá se, že po interakci s některým z receptorů vnější membrány dochází k denaturaci kolicinu (Bénédicti et al., 1992; Duche et al., 1994, Griko et al., 2000), což následně umožňuje jeho průchod přes některý z proteinů vnější membrány, β -barelového porinu, jako jsou OmpF, BtuB a další.

Jak jsem popsala výše, jednou z možností jak dělit koliciny je podle jejich mechanismu transportu přes periplazmu. Ve skupině A je tento transport zajišťován pomocí komplexu proteinů TolA, TolR, TolQ a TolB. Tol systém v gramnegativních bakteriích je jeden z prostředků zajišťujících stabilitu a integritu vnější membrány, přesto fyziologická funkce tohoto systému v buňce je zatím nejasná. O jiném systému – TonB je již známo, že ve spolupráci s dalšími proteiny vnější membrány zajišťuje transport mnoha užitečných molekul do buňky (Letain and Postle, 1997). Systém TonB umožňuje ve spolupráci s proteiny ExbB a ExbD přechod přes membránu kolicinům skupiny B (Llobès et al., 2001). Oba tyto systémy jsou schematicky znázorněny na obrázku níže (Obr. 2). Tento transport kolicinů je zajištěn interakcí výše popsaných proteinů s N-terminální doménou kolicinu, proto se také tato doména někdy nazývá translokační. N-terminální doména kolicinů obsahuje vždy krátkou sekvenci aminokyselin, která je specifická pro jeden z výše popsaných proteinových translokačních systémů. V případě kolicinů skupiny A se tato skupina nazývá Tol box (Carr et al., 2000; Pilsl and Braun, 1995) a v případě skupiny B se jedná o TonB box (Schramm et al., 1987; Mende and Braun, 1990; Tuckman and Osburne, 1992).



Obr. 2: Schématické znázornění Tol-Pal a TonB translokačního systému. OM. vnější membrána P. periplazmatický prostor, IM. vnitřní membrána, R. TonB-dependentní receptor, C. C-konec a N. N-konec (převzato z Cursino et al., 2002)

Třetí doména společná všem kolicinům se nazývá C-terminální nebo se také může nazývat podle funkce, kterou má, tedy například pórtvorná či nukleázová. Každá kolicinová C-terminální doména je zodpovědná za lytické účinky celého kolicinu, i když existuje i jedna nedávná práce popisující lytické účinky kolicinu N i po odstranění této domény (Johnson et al., 2013). Jak jsem zmiňovala výše, koliciny mohou být také děleny podle jejich mechanismu účinku na pórtvorné, nukleázové a koliciny degradující či inhibující syntézu peptidoglykanu.

Typickým zástupcem kolicinu degradujícího či inhibujícího syntézu peptidoglykanu je kolicin M. C-terminální doména tohoto kolicinu má strukturu tvořenou jak β -listy, tak i α -helixy a má mezi koliciny výjimečný typ lytické aktivity a to aktivitu fosfatázovou. C-terminální doména kolicinu M je schopna štěpit fosfoesterovou vazbu mezi undekaprenolem a zbytkem vzniklého meziproductu peptidoglykanu (-PP-MurNAc-pentapeptid-GlcNAc), a tím brání další produkci peptidoglykanu (Ghachi et al., 2006; Zeth et al., 2008).

Pro bližší charakterizaci dalších typů C-terminální domény kolicinů s nukleázovou aktivitou, jsem vybrala jednotlivé typické zástupce, které blíže popíši. Prvním z nich je kolicin E2. Tento kolicin má DNázovou aktivitu. Tato doména nespecificky štěpí chromozomální DNA s jistou preferencí pro thyminové báze, čímž způsobuje degradaci DNA. Dále v rámci své aminokyselinové sekvence obsahuje H-N-H motiv (pojmenovaný podle konzervovaných aminokyselin), což je aktivní místo, které váže různé ionty kovu především ionty Mg^{2+} , na nichž je aktivita tohoto kolicinu závislá. Toto aktivní místo

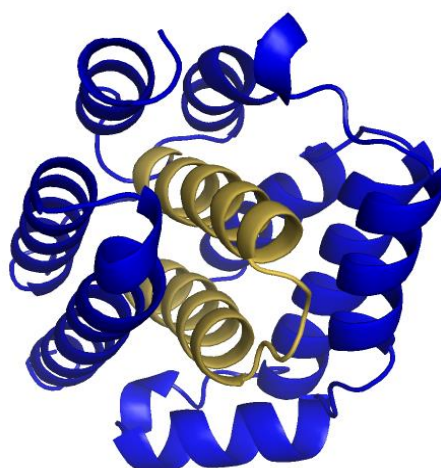
obsahuje více než 30 zbytků aminokyselin a je univerzálním strukturním prvkem u prokaryot i eukaryot (James et al., 2002). Dále existuje kolicin D, který se vyznačuje tRNázovou aktivitou, při které C-terminální doména kolicinu specificky štěpí tRNA. Cílem jsou konkrétně 4 typy tRNA s antikodony ICG,CCG, U*CU (U* = 5-methylaminomethyluridine) a CCU (kodující arginin) (Yajima et al., 2004).

Dalším zástupcem je kolicin E4, který je schopen štěpit fosfodiesterovou vazbu v dekodující oblasti 30S podjednotky ribozomu, vázat se na 70S podjednotku a hydrolyzovat 16S ribosomální RNA (rRNA) a tím zastavovat proteosyntézu (Ng et al., 2010).

2.5. Struktura pórotvorné domény

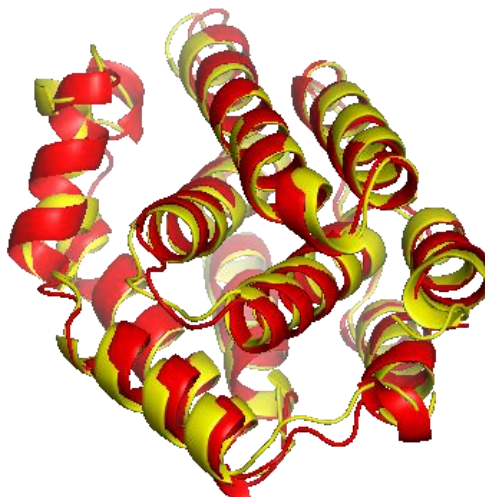
2.5.1. *Struktura pórotvorné domény v roztoku*

Krystalová struktura C-terminální domény pórotvorných kolicinů v konformaci odpovídající solubilnímu stavu již byla vyřešena u kolicinů A, Ia, E1, N, B a S4 (Parker et al., 1989; Wiener et al., 1997; Elkins et al., 1997; Vetter et al., 1998; Hilsenbeck et al., 2004; Arnold et al., 2009). Sekundární struktura této domény u všech pórotvorných kolicinů mimo membránu vykazuje velkou vzájemnou podobnost. Skládá se z deseti α -helixů, z nichž dva mají hydrofobní charakter (helixy 8 a 9) (Obr. 3). Tyto dva α -helixy vytváří tzv. hydrofobní vlásenku, která je v roztoku obklopena zbylými osmi α -helixy. Tato doména navazuje na často velice dlouhý α -helix, jehož posledních zhruba 20 aminokyselin je považováno za α -helix 1.



Obr. 3: Krystalová struktura C-terminální domény kolicinu A v solubilním stavu se skládá z deseti α -helixů, hydrofobní vlásenka – žlutá, ostatní α -helixy - modré. Ilustrace struktur byly vytvořeny v programu Pymol. Struktura PDB (Protein Data Bank): 1COL.

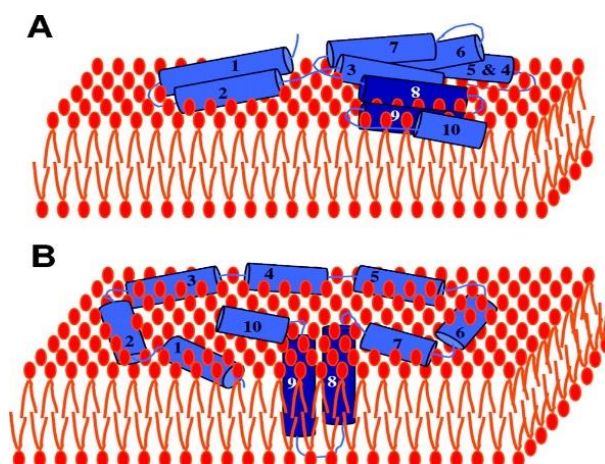
Vzhledem k sekvenční podobnosti mezi C-terminální doménou kolicinu U a A bylo provedeno porovnání jejich sekundárních struktur v programu Pymol (Obr. 4). Toto porovnání potvrzuje i vysokou podobnost jejich sekundární struktury.



Obr. 4: Porovnání známé sekundární struktury kolicinu A s modelem struktury kolicinu U vytvořeným programem iTasser na základě aminokyselinové sekvence.

2.5.2. *Struktura pórotvorné domény v membráně – zavřený pór*

Podle dosavadních studií je patrné, že kolicinové póry jsou ovládané napětím (Schein et al., 1978; Bullock et al., 1983; Pressler et al., 1986; Bourdineaud et al., 1990), tudíž musí docházet k drobným konformačním změnám způsobujícím zavírání a otevírání pórů při změnách napětí. Pórotvorná doména kolicinů tedy při interakci s vnitřní membránou napadené bakterie přechází do transmembránového stavu. Nejdříve dojde ke vzniku mezistavu, kdy je budoucí pór zanořen v membráně, ale zatím je v zavřeném stavu. Již roku 1983 se na základě práce Clevelanda et al. (1983) předpokládalo, že při interakci s membránou a při přechodu do transmembránového stavu se uplatňuje hydrofobní vlásenka (helixy 8 a 9), která je společná zatím všem objeveným pórotvorným kolicinům. Byly navrženy dva modely struktury pórotvorné domény v zavřeném stavu, modely „umbrella“ (deštník) a „penknife“ (kapesní nůž) (Obr. 5).



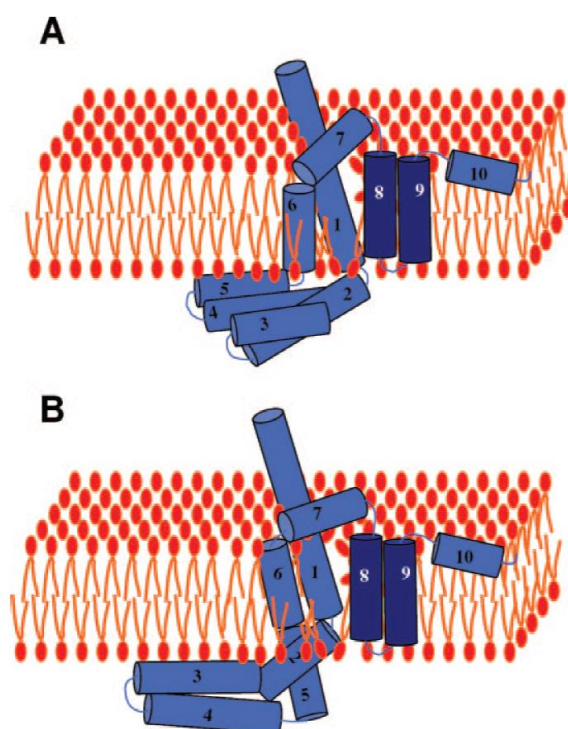
Obr. 5: Schématické zobrazení C-terminální domény v zavřeném stavu. Zavřené kolicinové kanály mohou zaujímat několik konformací navázání k membráně, dvě z nich jsou zde znázorněné. A – penknife model založený na studiích kolicinu A, B- model umbrella předpokládáný u kolicinu E1 (převzato z Cascales et al., 2007).

Model umbrella byl poprvé zmíněn v práci Parkera a et al. (1989). Tento model předpokládá, že hydrofobní vlásenka se zanořuje kolmo do membrány a ostatní α -helixy jsou rovnoměrně rozvrstveny na rozhraní membrány a periplazmatického prostoru. Zatímco podle modelu penknife, hydrofobní vlásenka není zanořena kolmo v membráně, naopak je velmi blízko dalším helixům ležícím na povrchu membrány (Lakey et al., 1993). Tento fakt byl podpořen například u kolicinu A několika studiemi (Duché et al., 1994; Lakey et al., 1993), nicméně ani pro tento kolicin není struktura póru v zavřeném stavu považována za vyřešenou, protože i pro ni existují studie nasvědčující naopak modelu umbrella (Padmavathi and Steinhoff, 2008). Příčina toho byla pravděpodobně naznačena až roku 2011 (Prieto and Lazaridis, 2011), kdy byly prováděny simulace interakce a dynamiky C-terminální domény kolicinů A, B, E1, Ia s membránou a bylo zjištěno, že orientace vlásenky C-terminální domény kolicinů A a E1 (odpovídající modelům umbrella a penknife) měly stejnou efektivní energii. Je tedy možné, že pro kolicin A mohou být správné oba tyto modely, které by mohly samovolně přecházet jeden v druhý – oba mohou existovat v rovnováze.

2.5.3. *Struktura pórotvorné domény v membráně – otevřený pór*

Po zanoření hydrofobní vlásenky do membrány při dostatečném napětí na membráně dochází k vytvoření póru. Podle dosavadních studií se zdá, že póry tvořené koliciny jsou především monomerní (Wendt, 1970; Schein et al., 1978; Cavard et al., 1988; Slatin, 1988), v rámci těchto studií byl většinou sledován lineární nárůst počtu otevřených pórů či nárůst proudu se

zvyšující se koncentrací molekul kolicinu v roztoku. Struktura póru v otevřeném stavu je nicméně zatím stále nejasná, i když již existuje několik prací zabývajících se touto problematikou, které byly prováděny především na kolicinu Ia. Tyto experimenty byly prováděny především pomocí biotin-streptavidinového systému, kdy byly cysteiny s navázaným biotinem vychytávány streptavidinem, vždy buď na cis či trans straně membrány (Qiu et al., 1996; Slatin et al., 2004) a dalšími podobnými metodami (Kienker et al., 2000). Mimo jiné bylo takto zjištěno, že α -helixy 2-5 (respektive odpovídající segment dlouhý 68 aminokyselin) jsou zřejmě při otevření póru přeneseny na trans stranu membrány (tedy dovnitř buňky), tudíž pór kolicinu Ia může být tvořen pouze několika zbylými α -helixy (Qiu et al., 1996) (Obr. 6).

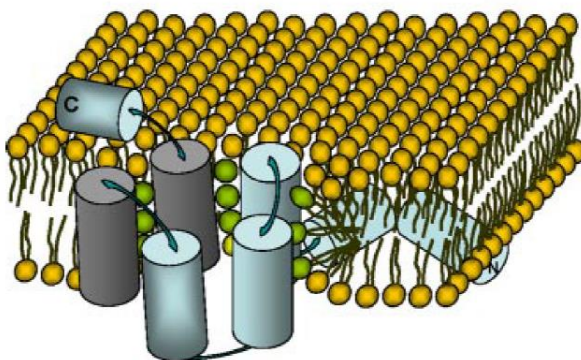


Obr. 6: Schématické zobrazení C-terminální domény v otevřeném stavu. A) Model C-terminální domény v otevřeném stavu kolicinu Ia. B) Model C-terminální domény v otevřeném stavu kolicinu A, kdy je pór částečně tvořen i helixy 2 a 5 (převzato z Cascales et al., 2007).

2.6. Alternativní modely struktury póru

2.6.1. *Toroidní model*

I přestože se zdá, že jsou kolicinové póry monomerní tedy, že jsou tvořeny pouze několika α -helixy z C-terminální domény konkrétního kolicinu (Qiu et al., 1996; Slatin et al., 2004), jsou schopné vytvářet póry, někdy dokonce o relativně velkém průměru. Například pro pórotovorný kolicin E1 se uvádí minimální průměr póru 0,8 - 0,9 nm (Raymond et al., 1985; Bullock et al., 1992). Jak je tedy možné, že pomocí několika α -helixů jsou koliciny schopny vytvářet tak velké póry? Roku 2004 tuto otázku zodpověděl Sobko a et al. (2004) tím, že dali do souvislosti již dlouho známý model toroidního póru a kolicin E1. Tento model předpokládá, že se na stavbě póru významně podílí i membránové lipidy. Tedy, že stěny póru jsou z velké části tvořeny lipidovými hlavami (Obr. 7). Tento model byl poprvé navržen pro póry tvořené magaininem, což je peptid o velikosti 23 aminokyselin, tvořící amfifilní α -helix, které jsou schopny se při dostatečné koncentraci shlukovat a právě ve spolupráci s lipidy vytvářet velké póry ($r = 1,85$ nm), které nicméně obsahují pouze 4 – 7 α -helixů magaininu (Ludtke et al., 1996; Matsuzaki et al., 1996). Kromě dalších peptidů (Yang et al., 2001) byl tento model dříve také navržen pro apoptotické proteiny, jako jsou například proteiny Bax a Bid (García-Sáez et al., 2005).



Obr. 7: Toroidní model póru kolicinu E1 upraveno a citováno podle Sobko et al. (2006b)

U jiných kolicinů se prozatím správnost toroidního modelu nezkoumala, nicméně je známo, že póry kolicinu Ia jsou tvořeny maximálně 4 α -helixy a u kolicinu A je to zřejmě podobné (Slatin et al., 2004). V každém případě se ovšem zdá, že helixů na stavbu kanálu barelového vzhledu (barrel stave model) je přesto příliš málo. Proto je možné, že i póry těchto kolicinů odpovídají toroidnímu modelu póru.

2.6.2. *Lipidové kanály*

Při práci s arteficiálními lipidovými dvojvrstvami je třeba počítat s důležitou fyzikální vlastností všech lipidových dvojvrstev, především dvojvrstev tvořených pouze jedním druhem lipidů. Touto vlastností je fázový přechod, kdy určitá teplota nebo jiný faktor (Papahadjopoulos et al., 1973; Jacobson and Papahadjopoulos, 1975) způsobuje přechod z gelové do fluidní fáze membrány, tedy přechod z tuhé membrány do tekuté. Při přechodu do gelové fáze dochází k uspořádávání molekul a značnému snížení jejich pohyblivosti. Ukázalo se, že fázový přechod může způsobovat vznik iontových kanálů bez přispění jakýchkoliv proteinů, což bylo poprvé navrženo Antonovem et al. (1980), i když první záznamy tohoto druhu kanálů byly získány již dříve (Yafuso et al., 1974). Fázový přechod, tudíž i vznik lipidových kanálů může být vyvolán mnoha faktory, jako jsou specifická teplota (Antonov et al., 2005, Papahadjopoulos et al., 1973), pH roztoku (Träuble et al., 1976; Kaufmann and Silman, 1983), napětí na membráně (Kaufmann et al. 1989), přítomnost anestetik (Seeger et al., 2007) a další (shrnutí v Heimburg, 2010). Dokonce i proteiny mohou umožňovat vznik lipidových pórů tím, že mají transmembránové helixy svou délkou nekompatibilní s tloušťkou membrány, tedy vlastně navozují fázový přechod.

Existují dva modely lipidových pórů: hydrofilní a hydrofobní póry (Glaser et al., 1988). U hydrofobního póru nedochází k přeskupování fosfolipidů na rozdíl od pórů hydrofilních. Podle Böckmanna a et al., (2008) je nicméně hydrofobní pór jen přechodná forma před vznikem hydrofilního póru, takzvaný prepór. Lipidové kanály mohou mít různou vodivost v rozmezí desítek až stovek pS, stejně tak doba otevření kanálů může být různá, proto může být někdy těžké rozeznat lipidové od proteinových kanálů, a proto je potřeba před zahájením každého měření, mimo jiné, monitorovat nejprve chování membrány bez přidání proteinů.

2.7. Charakteristiky kanálotvorných proteinů

Arteficiální planární lipidové dvojvrstvy, které jsou tvořené syntetickými fosfolipidy nebo fosfolipidy izolovanými z biologických membrán fungují jako zjednodušený jasně definovaný model přirozené membránové dvojvrstvy. Běžně se využívají při charakterizaci iontových kanálů, porinů či různých pórotvorných toxinů.

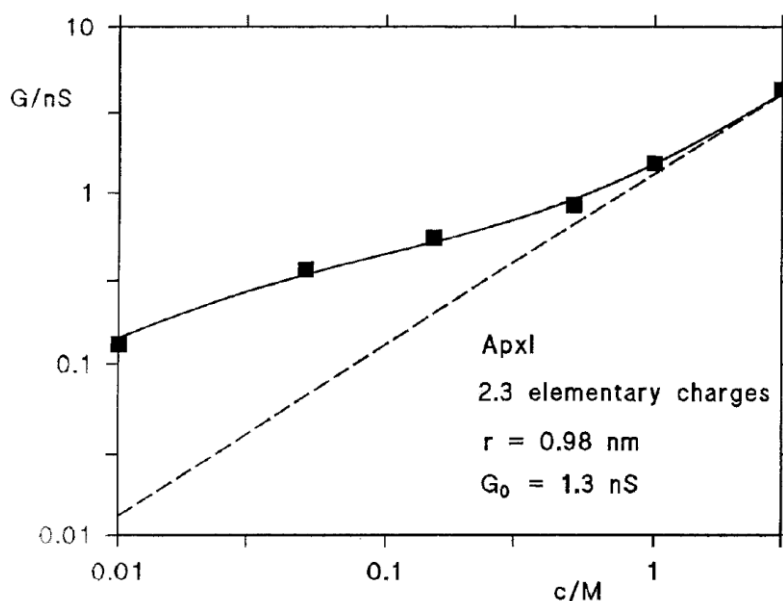
Nejběžnějším postupem přípravy arteficiálních membrán je nanesení lipidů rozpuštěných v organickém rozpouštědle do otvoru v přepážce mezi dvěma částmi teflonové komůrky, kdy dojde k postupnému vytékání rozpouštědla a následnému vzniku černé lipidové membrány (BLM – Black Lipid Membrane) (Tien, 1966; Benz et al., 1978). Existují ještě

další metody přípravy umělých dvojvrstev – například technika Langmuir-Blodgettové (Osborn and Yager, 1995, Montal and Mueller, 1972), tvorba membrán na rozhraní dvou mikrokapiček (Bayley et al., 2008), na rozhraní mikrokapičky a hydrogelu (Thompson et al., 2007) nebo tvorba dvojvrstvy v síti mikrokapiček (Bayley et al., 2008).

Funkce iontových kanálů můžeme sledovat pomocí metody záznamu jednotlivých kanálů (SCR - Single Channel Recording), která byla poprvé použita společně s metodou patch clamp (Neher and Sakmann, 1976). Během měření je zaznamenáván proud procházející otevřenými póry vzniklými v lipidové dvojvrstvě, která je sama o sobě výborným elektrickým izolantem. Tato metoda vedla k rozvoji dalších přístupů, které umožnily velice podrobnou charakterizaci studovaných iontových kanálů. Dále se metodou měření na černých lipidových membránách podrobně zabýval například Roland Benz (Benz et al., 1978). Pomocí těchto metod určoval vodivost jednotlivých pórů, zda je aktivita toxinu závislá na membránovém potenciálu, zda je kanál v membráně stále otevřený nebo fluktuuje mezi otevřeným a zavřeným stavem, dokonce zjišťoval i iontovou selektivitu kanálů (Benz et al., 1979). V rámci svých publikací Roland Benz také společně s dalšími navrhl přístup pro stanovení průměru póru prostřednictvím měření na arteficiálních lipidových membránách (Trias and Benz, 1994). Vycházeli z Renkinova velmi zjednodušeného modelu póru, který byl publikován již v roce 1954 (Renkin, 1954) a práce Nikaidoa a Rosenberga (1981). Tento model využívá zjednodušujících předpokladů, že sledovaný pór má tvar válce a procházející molekuly mají sférický tvar. Bylo sledováno omezení difúze roztoku procházejícího kanálem, které se projevovalo změnami vodivosti jednotlivých kanálů při použití iontů o různých hydratačních poloměrech. Aplikací tohoto modelu na data získaná takovým měřením (závislost vodivosti kanálů na hydratačním poloměru iontů) stanovovali přibližný poloměr studovaného kanálů (Trias and Benz, 1994).

Další zkoumanou vlastností byl efekt negativního náboje v okolí ústí póru. Tento efekt byl zkoumán opět prostřednictvím měření na planárních membránách, kdy byla sledována vodivost jednotlivých pórů v závislosti na koncentraci roztoku. Podle toho, zda byl vztah těchto dvou hodnot při dvojitým logaritmicím vynesení lineární či nikoliv, stanovovali, zda tento náboj ovlivňuje vodivost pórů (Benz et al., 1989). Vliv náboje v ústí póru je patrný na Obr. 8. Kdyby v okolí póru žádný náboj nebyl, vodivost by lineárně rostla s koncentrací roztoku. Ale z grafu je patrné, že při nízkých koncentracích iontů v roztoku je vodivost kanálů vyšší než by měla být. V okolí póru se tedy zřejmě vyskytuje náboj, který způsobuje hromadění iontů v okolí ústí póru, což se projevuje nárůstem vodivosti v takových místech. Dále pomocí rovnice poprvé zmíněné v publikaci z roku 1975 (Nelson and McQuarrie, 1975)

(kapitola 3.2.3.) dokonce stanovovali přibližný počet nábojů v okolí ústí póru i jeho poloměr (Brunen et al., 1991).



Obr. 8: Závislost vodivosti jednotlivých kanálů ApxI na koncentraci roztoku KCl (plné čtverečky). Tyto hodnoty jsou prokládány modelem získaným rovnicemi Nelsona a McQuarrieho (1975) předpokládajícího přítomnost náboje v okolí kanálu. Přerušovaná čára znázorňuje vypočítanou vodivost kanálů ApxI neovlivněnou nábojem v okolí kanálu, která vykazuje lineární závislost. G znamená vodivost v jednotkách nS a c znamená molární koncentraci KCl. Obrázek převzat z Maier et al., (1996).

Poloměr póru lze dále stanovit i prostřednictvím měření na planárních membránách v roztoku s přidávanými neelektrolyty jako je etylen glykol, glycerol, glukóza apod. Metoda stanovení velikosti póru byla použita již v mnoha předešlých pracích (Holz and Finkelstein, 1970; Krasilnikov et al., 1995; Bárcena-Uribarri et al., 2013). Na základě toho, které z těchto molekul ovlivní permeabilitu membrány a které ne, byl stanovován poloměr póru (Holz and Finkelstein, 1970b; Krasilnikov et al., 1995). Předpokládá se, že pokud jsou molekuly neelektrolytu dostatečně malé a jsou schopny projít pórem, snižují jeho vodivost prostřednictvím dvou efektů: tím, že snižují konduktivitu roztoku a tím, že svým vstupem do lumen póru snižují průchodnost procházejících iontů (Krasilnikov et al., 1998). Zatímco pokud jsou příliš velké, aby pórem prošly, jeho vodivost neovlivňují.

Další zajímavou vlastností, kterou je možné prostřednictvím měření na planárních membránách zjistit je tvar pórů. Ten byl opět zkoumán s využitím různých neelektrolytů, v tomto případě však byly neelektrolyty přidávány z různých stran membrány a byly

porovnávány rozdíly v získaných hodnotách vodivosti – tedy schopnosti látek prostupovat dovnitř póru z jedné a z druhé strany (Krasilnikov et al., 1998a).

2.8. Pórotvorné vlastnosti příbuzných kolicinů

Kolicin U byl objeven roku 1992 jako produkt bakterie *Shigella boydii* (Horák, 1992 převzato z Šmajš et al., 1997). Skládá se z 619 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 66,29 kDa. Jeho C-terminální doména, která zajišťuje toxickou aktivitu, se skládá z 200 aminokyselin. Dále bylo zjištěno, že je schopný interagovat s bakteriemi rodu *Shigella* a *Escherichia*. Podobně jako ostatní známé koliciny má třístupňový mechanismus interakce s cílovou bakterií, kdy dochází nejprve k navázání kolicinu na povrchové receptory, v tomto případě jsou to proteiny vnější membrány OmpA, OmpF a jádro lipopolysacharidu vnější membrány napadené bakterie. V další fázi dochází k translokaci přes vnější membránu a periplazmu pomocí komplexu proteinů TolA, TolB, TolQ a TolR a nakonec dochází k toxické aktivitě kolicinu U způsobující lyzi buňky. C-terminální doména kolicinu U vykazuje vysokou sekvenční podobnost s koliciny B (73 %) a A (65,5%). Sekvence celého kolicinu je z 38 % identická se sekvencí kolicinu A (Šmajš et al., 1997). U všech těchto příbuzných kolicinů byla prokázána pórotvorná aktivita (Pressler et al., 1986; Bourdineaud et al., 1990, Wilmsen et al., 1990). Proto se pórotvorná aktivita předpokládala i u kolicinu U (Šmajš et al., 1997). Součástí ColU plazmidu je kromě genu pro kolicin U také gen pro imunitní protein (174 aminokyselin) a lytický protein (45 aminokyselin). O rok později byla vydána práce právě o interakci kolicinu U s jeho imunitním proteinem (Pilsł et al., 1998). Byla provedena delece aminokyselin na pozicích 575-583, přičemž bylo zjištěno, že tato delece neovlivnila funkčnost kolicinu, ale zabránila interakci kolicinu s imunitním proteinem. Z čehož je patrné, že za interakci kolicinu U s jeho imunitním proteinem je zodpovědný právě vrcholek hydrofobní vlásenky mezi helixy 8 a 9 na jeho C-terminální doméně. Kromě imunitního proteinu byla blíže zkoumána i N-terminální doména kolicinu U. Na základě předešlé studie Šmajš et al. (1997) stanovili sekvenci TolA boxu (sekvence DGTGWS) v N-terminální doméně, který je velmi podobný již dříve objevenému TolA boxu (Pilsł and Braun, 1995). Tato sekvence byla uměle zaměněna za TonB box a následně bylo prokázáno, že takto mutovaná verze kolicinu U potřebuje pro svoji translokaci přes periplazmu jak TonB systém tak i proteiny TolA a TolQ, ale nepotřebuje TolB protein (Pilsł and Braun, 1998). Z toho je patrné, že translokace kolicinu není určována pouze touto sekvencí, ale i dalšími zatím neznámými specifickými oblastmi.

2.8.1. Kolicin A

Kolicin A je jedním z prvních objevených kolicinů (Fredericq, 1948) a zkoumán je již desítky let. I přesto však jeho studium pokračuje dodnes. Krystalová struktura jeho C-terminální domény odpovídající její konformaci v roztoku byla vyřešena již v roce 1992 (Parker et al., 1992). Struktura jeho pórotvorné domény v membráně je, ale stále nejasná, i přestože bylo dodnes publikováno mnoho studií zabývajících se jak strukturou této domény, tak i charakterizací pórů, které kolicin A vytváří (Bourdineaud et al., 1990; Duché et al., 1996; Lakey et al., 1993; Padmavathi and Steinhoff, 2008). Již roku 1983 bylo prokázáno, že za tvorbu pórů je zodpovědná právě C-terminální doména kolicinu, tím že byl vytvořen fragment C-konce kolicinu A o velikosti 20kDa a byla ověřena jeho pórotvornost na planárních membránách (Martinez et al., 1983). Póry tvořené tímto fragmentem dokonce vykazovaly podobné vlastnosti jako intaktní kolicin. Vodivost těchto pórů se pohybovala okolo 13 pS v roztoku 1M KCl při pH 6 na membránách tvořených azolektinem, nicméně napětěvé ovládání kanálů tvořených tímto fragmentem se lišilo. V téže době bylo i prokázáno, že na aktivitu zabudovávání kolicinu do membrány má vliv složení membrány, iontová síla roztoku stejně jako hodnota pH roztoku (Pattus et al., 1983). Například u změny pH roztoku platilo, že čím nižší pH roztoku bylo, tím lépe se kolicin do membrány zabudovával. Při neutrálním a bazickém pH byla ochota se zabudovat velmi nízká, když už ale jednou došlo k interakci s membránovými lipidy, vytvořil se velmi stabilní komplex (Pattus et al., 1983). Dále bylo měřením úniku draslíku z buněk prokázáno, že kolicin A vytváří také in vivo napětěvé ovládané kanály (Bourdineaud et al., 1990).

2.8.2. Kolicin B

Kolicin B je dalším dlouho studovaným kolicinem, který také vykazuje vysokou sekvenční podobnost jeho C-terminální domény s téže doménou kolicinu U (73%). Jeho krystalová struktura odpovídající solubilnímu stavu již byla vyřešena (Hilsenbeck et al., 2004) a ukázalo se, že jeho C-terminální doména je velmi podobná vyřešeným strukturám kolicinů A, N a Ia (Parker et al., 1992; Vetter et al., 1998; Wiener et al., 1997). Na základě předešlých studií Pressler a další (1986) zjistili, že kolicin B vytváří v membráně ze syntetických lipidů (DPhPC : DPhPE v poměru 4:1 w/w) póry o vodivosti přibližně 21 pS, v 1M roztoku KCl o pH 6 a že jsou tyto póry napětěvé ovládané pouze v rozmezí pH 4,5 – 6. Při pH 7 byly vzniklé póry napětěvě nezávislé. Na hodnotě pH je závislá i vodivost jednotlivých kanálů a jejich selektivita (Bullock et al., 1990). Zajímavostí je, že pro pokusy prováděné na kolicinu

A je třeba přítomnosti vápenatých iontů, které zvyšují stabilitu jejich pórů, na rozdíl právě od kolicinu B, který přítomnost vápenatých iontů nevyžaduje. Dokonce jeho přítomnost v roztoku způsobuje mírné snížení vodivosti jednotlivých pórů kolicinu B (Pressler et al., 1986).

2.8.3. *Kolicin N*

Kolicin N je další kolicin, který je kolicinu U velmi blízký, jeho C-terminální doména vykazuje až 49% sekvenční podobnost s kolicinem U (Šmajs et al., 1997). I jeho krystalová struktura odpovídající konformaci v roztoku již byla vyřešena (Vetter et al., 1998). Již roku 1990 byla publikována práce, která potvrdila, že kolicin N je také schopen tvořit iontové póry, které jsou napěťově ovládané a silně ovlivňované hodnotou pH roztoku (Wilmsen et al., 1990). Se změnou pH se například mění selektivita pórů, kdy při pH 5 je mírně anion selektivní a při pH 7 je slabě kation selektivní. Totmu odpovídá i práce zabývající se proteinem SARS-CoV E schopným vytvářet toroidní póry, která se zabývala vlivem náboje membrány na iontovou selektivitu těchto pórů i jejich další vlastnosti. Iontová selektivita se měnila v závislosti na pH ale zároveň i v závislosti na složení membrány, selektivita pórů v nenabitě membráně se měnila od mírně kation selektivní při neutrálním pH na anion selektivní při pH kyselém, což odpovídá chování kolicinu N. Iontová selektivita pórů na negativně nabitých membránách se také měnila, nicméně zůstala stále kation-selektivní (Verdiá-Báguena et al., 2013). Vodivost jednotlivých pórů kolicinu N se pohybovala okolo 13 pS v 1M roztoku KCl, pH 7 na membránách ze syntetických lipidů (POPC: DOPE, 1:1 w/w) a vzrůstala se zvyšujícím se pH roztoku (Wilmsen et al., 1990).

2.8.4. *Kolicinn E1*

C-terminální doména kolicinu E1 je pórotvorné doméně kolicinu U již méně podobná, ale její sekundární struktura je opět srovnatelná, už jen tím, že se také skládá z 10 α -helixů. Dalším důvodem, proč zde tento kolicin blíže popisuji je, že společně s kolicinem Ia jsou to koliciny, které byly v průběhu let nejpodrobněji studovány a tudíž je jejich struktura (jejich C-terminální domény v membráně) i nejlépe zmapována (Tory and Merrill, 1999; Ho et al., 2011). Roku 1983 bylo dokázáno, že za interakci kolicinu s vnitřní membránou bakterie a jeho následnou pórotvornou aktivitu je zodpovědná právě C-terminální doména kolicinu, v tomto případě byl zcela funkční i fragment ze 152 posledních aminokyselin kolicinu E1.

Kolicin E1 i jeho fragment má na azolektinových membránách v roztoku 1 M KCl, pH 4,5 vodivost 20 pS (Cleveland et al., 1983). Na pórech kolicinu E1 byl podrobně zkoumán například vliv pH roztoku na jejich vlastnosti (Davidson et al., 1985) a také správnost modelu toroidního póru pro póry kolicinu E1 silně související i se závislostí lipidového složení membrány na chování pórů, kterou se jim podařilo prokázat (Sobko et al., 2006b). Dále byl na kolicinu E1 zkoumán vliv vápenatých iontů v roztoku, kdy bylo prokázáno, že na póry kolicinu E1 mají vápenaté ionty vliv pouze při použití negativně nabitě membrány, což podporuje správnost modelu toroidního póru (Sobko et al., 2006a).

2.8.5. *Kolicin Ia*

Kolicin Ia je dalším, již velice dlouho studovaným kolicinem (Konisky and Richards, 1970; Levisohn et al., 1968). Mechanismus účinku kolicinu Ia, tedy že zvyšuje permeabilitu membrány a tím způsobuje její depolarizaci, byl známý již v sedmdesátých letech (Tokuda and Konisky, 1978, 1979). Od té doby je také blíže studován pomocí nejrozličnějších metod, jako je měření lyze lipozómů (Tokuda and Konisky, 1979) nebo měření na planárních lipidových membránách (Nogueira and Varanda, 1988). Byly prováděny i pokusy se samotnou C-terminální doménou, která je zodpovědná za lytickou aktivitu kolicinu. Pomocí těchto pokusů bylo prokázáno, že i samotná C-terminální doména je schopna tvořit póry (Ghosh et al., 1993). Dokonce byl identifikován segment helixů, který při otevření póru přechází na trans stranu membrány (Qiu et al., 1996; Slatin et al., 1994). Celý kolicin Ia i jeho C-terminální doména má vodivost mezi 40-44 pS v roztoku 1M KCl, pH 6,2 na membránách z azolektinu (Kienker et al., 2000). Vybrané vlastnosti jsou shrnuty v Tab. 2.

2.9. Sledování topologie transmembránových proteinů pomocí cysteinových mutací

Pro zjištění topologie transmembránových proteinů v membráně existuje mnoho přístupů, jako je např. sledování endogenní glykosylace a N-glykosylační mutagenese u eukaryot, vkládání různých epitopů a fúze proteinů s enzymy (van Geest and Lolkema, 2000). Nejčastěji používanými přístupy jsou však přístupy řadící se z velké části do metod pod souhrnným názvem SCAM, tedy substituted cysteine accessibility method (Anderluh et al., 1999). Do této skupiny patří ty metody, které využívají substituovaných cysteinů pro sledování topologie membránových proteinů. Takovéto cysteiny jsou následně značeny

různými látkami, jako jsou fluorescenční značky, biotin, apod. Dále se stručně zmíním o metodách, které mám v úmyslu v rámci svého dalšího studia využívat.

Biotinylace proteinů je jednou z dnes běžně používaných metod pro značení proteinu a jeho následné rozpoznávání. Nazýváme tak proces navázání biotinu na konkrétní protein. Tento proces je využíván především pro purifikaci proteinů (Hofmann et al., 1980) anebo jejich detekci (Howarth et al., 2006), jelikož biotin se váže se silnou afinitou ke streptavidinu, avidinu a také ke speciálním protilátkám. Nicméně specifická interakce biotinu s avidinem či streptavidinem se dá využít i ke sledování topologie proteinů v membráně. Je například možné sledovat cysteiny proteinu neinkorporované do membrány nebo naopak translokované dovnitř buňky pomocí již zmíněné vazby na streptavidin a to prostřednictvím měření na planárních membránách či na lipozómech. Obdobné pokusy již byly prováděny na mnoha různých proteinech včetně některých kolicinů (Qiu et al., 1994; Anderluh et al., 1999, Senzel et al., 2000).

Dále jsou pak dnes běžně využívány fluorescenční metody, umožňují celkem komplexně zmapovat topologii proteinu v membráně. A to kombinací několika metod jako je měření posunu emisních spekter solvatochromních fluorescenčních sond, doby života excitovaného stavu (lifetime), využití metody zhášení či FRET (Förster rezonance energy transfer) (Gonzalez-Manas et al., 1992; Valeva et al., 1996; Anderluh et al., 1999; Valeva et al., 2008). Velkou výhodou fluorescenčních měření je jejich citlivost, umožňující provádět některé pokusy i na jednotlivých molekulách. Pro takováto měření se využívají buď vnitřní či vnější sondy. Za vnitřní sondy se považují například tryptofany, které se v proteinu přirozeně vyskytují. Za vnější sondy jsou považovány fluorescenční sondy, jako je například badan či akrylodan, které jsou schopny se vázat na sulfhydrylové skupiny obsažené v cysteinech proteinu. Tudíž pro využití takových sond musí být nejdříve vytvořeny mutantní proteiny, které budou obsahovat unikátní cysteiny v oblastech našeho zájmu (Heuck and Johnson, 2002).

Další možnou metodou mapování topologie proteinů v membráně je metoda mapování prostřednictvím tvorby disulfidických můstků. Tato metoda je využívána již desítky let. Jedni z prvních, kteří tuto metodu použili jsou Joseph J. Falke a Daniel E. Koshland ve své práci na aspartátovém receptoru *E.coli* a *S.typhimurium*, kdy s využitím této techniky studovali dynamiku a allosterii tohoto receptoru (Falke a Koshland, 1987). A již mnoho let existují i práce využívající tuto metodu při zkoumání kolicinů (Duché et al., 1994, 1996). Tato metoda, mimo jiné, využívá jednoduchého faktu, že dojde ke vzniku disulfidické vazby i mezi dvěma relativně vzdálenými cysteiny ve struktuře proteinu v roztoku. Touto vazbou je stabilizována

konformace, která nemusí být nativní a tím vznikne nefunkční protein, který je například neschopný inkorporace do membrány a tvorby póru. Pokud se ale dva cysteiny nacházejí v nativní struktuře proteinu blízko u sebe, tvorba cysteinu nemusí protein nijak poškodit. Tato metoda tedy umožňuje rozlišit aminokyseliny, které jsou za fyziologického stavu od sebe vzdálené nebo naopak blízké.

3 MATERIÁL A METODY

3.1. Přístrojové vybavení, chemikálie a další materiál

3.1.1. *Použité chemikálie*

- Agaróza (Serva, Německo)
- Akrylamid (Serva, Německo)
- Ampicilin sodium salt (Sigma; St. Louis, USA)
 - Zásobní roztok – 50 mg/ml H₂O
 - Výsledná koncentrace – 100 µl/ml média
- Arabinóza (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (100x koncentrovaný; New England BioLabs, V. Británie)
- Citronan draselný p.a. (PENTA s.r.o., ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Serva, Německo)
- Ethanol (Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Ethylalkohol, (PENTA s.r.o., ČR)
- Ethylendiamintetraoctova kyselina (EDTA) (Lachema, ČR)
- Ethidium bromid (Boehringer, Německo)
 - Zásobní roztok - 10 mg/ml H₂O
 - Výsledná koncentrace – 0,07 µl/ml agarózového gelu
- Extrakt z lipidů bakterie *E.coli* (Avanti Polar Lipids, Inc., USA)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid draselný (Lachema, ČR)
- Chlorid amonný p.a. (Lachema, ČR)
- Chlorid cesný p.a. (Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Chlorid draselný p.a. (Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Chlorid lithný p.a. (PENTA s.r.o., ČR)
- Chlorid rubidný p.a. (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný p.a. (Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Chlorid vápenatý p.a. (PENTA s.r.o., ČR)
- Chlorid vápenatý p.a. (Lachema, ČR)
- Chloroform (PENTA s.r.o., ČR)

- Kyselina chlorovodíková (Lachema, ČR)
- Kyselina N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová (HEPES) (Sigma-Aldrich, USA)
- Maltóza (Sigma-Aldrich, USA)
- Methanol (Lach-Ner, s. r. o., ČR)
- Močovina (Merck, Německo)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva, Německo)
- N,N'-metylen-bisakrylamid (Serva, Německo)
- Naphthol Blue Black (Sigma-Aldrich, USA)
- NiNTA agaróza (QIAGEN, Německo)
- Nukleotidy – dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM; New England BioLabs, V. Británie)
- n-Butanol (Sigma-Aldrich, USA)
- n-Dekan (Sigma-Aldrich, USA)
- Octan draselný (Lachema, ČR)
- Polyethylenglykol (PEG) 300, 400, 1000 (Sigma-Aldrich, USA)
- Persulfat amonný (APS) (Serva, Německo)
- Proteinový standard PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas International Inc., Kanada)
- Sójový azolektin 11145 (Sigma-Aldrich, USA)
- Sorbitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, V. Británie)
- Tetraetylamonium chlorid (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris.Hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Německo)
- β -merkapt ethanol (Calbiochem, Německo)
- 1kbp DNA ladder (500 μ g/ml; New England BioLabs, V. Británie)

Všechny použité chemikálie dosahovaly analytické čistoty.

- Enzymy (+ příslušné pufrы)
 - *Dpn* I (20000 U/ml; New England BioLabs, V. Británie)
 - *Pfu* DNA polymeráza (1000 U/ml; MoBiTec, Německo)

3.1.2. *Použité roztoky a pufr*

• TAE pufer (zásobní roztok - 50x koncentrovaný)

Tris-HCl	242 g
Kyselina octová	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
dH ₂ O	800 ml

• Nanášecí pufr (6x koncentrovaný)

Bromphenol Blue	1 ml (10 mg/ml H ₂ O)
0,5 M EDTA	1,2 ml
10% SDS	600 µl
Glycerol	1,2 ml
dH ₂ O	6 ml

• 30 % (w/v) roztok akrylamidu pro SDS-PAGE elektroforézu:

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

• Vzorkový pufr 2x pro SDS-PAGE: pH 6,8

Tris-HCl	50 mmol/l
DTT	100 mmol/l
SDS	2 % (w/v)
Bromfenolova modř	0,1 % (w/v)
Glycerol	10 % (v/v)

Roztok jsem uchovávala zamražený při teplotě -20 °C. Před použitím se přidával 2-merkaptoethanol do výsledné koncentrace 10 % (v/v).

• Barvicí roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:

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

• **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE elektroforézu:**

Methanol	250 ml
Voda	650 ml
Kyselina octová	100 ml

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

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

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

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

• **Tris-glycinový pufr (pH 8,3)**

Tris	25 mmol/l
Glycin	250 mmol/l
SDS	0,1 % (w/v)

• **No salt pufr**

TRIS-HCl	100 mmol/l
sacharóza	20% (w/v)
EDTA	2 mmol/l

• **Lyzační pufr**

No salt buffer	0,5 l
10% TWEEN	0,001% (v/v)

1 M B-Methanol	0,001 % (v/v)
NaCl	0,15 mol/l
Inhibitory proteáz	

• **W+E pufr**

TRIS-HCl	50 mmol/l
Glycerol	4 % (v/v)
EDTA	1 mmol/l

• **Wash pufr (promývací)**

W+E buffer	1 l
dH ₂ O	1 l

• **Eluční pufr 1-3**

W+E buffer	1 l
dH ₂ O	1 l
Imidazol	250 / 500 / 1000 mmol/l

• **TBS pufr**

NaCl	140 mmol/l
Tris	20 mmol/l
Tween 20	0,001 %

3.1.3. *Kultivační media*

• Trypton-yeast (TY) médium

Yeast extract (HiMedia, Indie)	5 g
Casein enzyme hydrolysate (HiMedia, Indie)	8 g
Chlorid sodný NaCl (Penta, Česká republika)	5 g
Doplnit do 1 l dH ₂ O	

• Trypton-yeast (TY) agar 1,2%

Agar powder (HiMedia, Indie)	12 g
------------------------------	------

Yeast extract (HiMedia, Indie)	5 g
Casein enzyme hydrolysate (HiMedia, Indie)	8 g
Chlorid sodný NaCl (Penta, Česká republika)	5 g
Doplnit do 1 l dH ₂ O	

- Trypton-yeast (TY) agar 0,66% - Soft agar

Agar powder (HiMedia, Indie)	1 g
Yeast extract (HiMedia, Indie)	0,75 g
Casein enzyme hydrolysate (HiMedia, Indie)	1,2 g
Chlorid sodný NaCl (Penta, Česká republika)	0,75 g
Doplnit do 150 ml dH ₂ O	

3.1.4. *Komerční soupravy*

- AEC Staining Kit (Sigma-Aldrich, USA)
- Penta-His HRP Conjugate Kit (QIAGEN, Německo)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Německo)

3.1.5. *Použité mikroorganismy a plazmidy*

Escherichia coli DH10B (Invitrogen, USA): F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻

Escherichia coli TOP10F (Invitrogen, USA): F'[lacI^q Tn10(tet^R)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str^R) endA1 λ⁻

Escherichia coli 5K

3.1.6. *Přístrojové vybavení*

- Amicon ultrafiltrační kyvety.
- Centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf AG, Německo)
- Centrifuga MiniSpinR, (Eppendorf AG, Německo)
- Centrifuga Sorvall RC26 Plus (Du Pont Instruments, USA)
- Centrifugy:

- CR3i (Jouan, Francie)
- Mini Spin plus (Eppendorf, Německo)
- Sigma 6 K 15 (DJB Labcare, V. Británie)
- Avanti J-26XP (Beckman Coulter Inc., USA)
- Certomat WR (B. Braun Biotech International, USA)
- Digitální váhy (Mettler, Německo)
- Digitální váhy HF-2000G (A&D Weighing, USA)
- Elektrody Ag/Cl – vlastní výroba
- Elektroforetický aparát (Apelex, Francie)
- Elektroforéza Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, USA)
- Fotoaparát CAMEDIA C-4 000 ZOOM (Olympus, ČR)
- Generátor ultrazvuku (Ultragen, Slovenská republika)
- Laboratorní váha APX – 402 (Denver Instrument, USA)
- Mrazicí box (-20 °C) (Zanussi, Itálie)
- Mrazicí box (-80 °C) (Jouan, Francie)
- pH-metr, inoLab Level 1 (WTW, Německo)
- Předvážky Nagema (OWA Labor, Německo)
- soustavu *ÄKTA* Purifier (GE Healthcare, USA)
- Spektrofotometr DN-1000 (NanoDrop, USA)
- Spektrofotometr SECOMAM S.250I+ (ALC-SECOMAM, Francie)
- Superdex 75 10/300mm GL o objemu 24 ml.
- Teflonová komůrka – zakázková výroba SIPOCH, ČR
- Teflonová přepážka – vlastní výroba
- Termocykler Gene Amp PCR Systém 9700 (Applied Biosystems, USA)
- Termostat INP-500 (Memmert, Německo)
- Termostatovaná vodní lázeň typ U7C (VEB MLW, Německo)
- Termostatovaná vodní lázeň typ UH8 (VEB MLW, Německo)
- Thermocell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína)
- Ultrasonikátor S3000m (Misonix, USA)
- UV transiluminátor TCX–20.M (Vilbert Lourmat, Francie)
- Vakuový koncentrátor Savant SpeedVac SC110A (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- Vodná lázeň KL1 (Laboratorní přístroje, ČR)
- Vortex MS2 minishaker (IKA-Works, Inc., USA)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac (Basic Power Supply, Bio-Rad, USA)

- Zesilovač LCA-200-100G (Femto, Germany)

3.1.7. *Software*

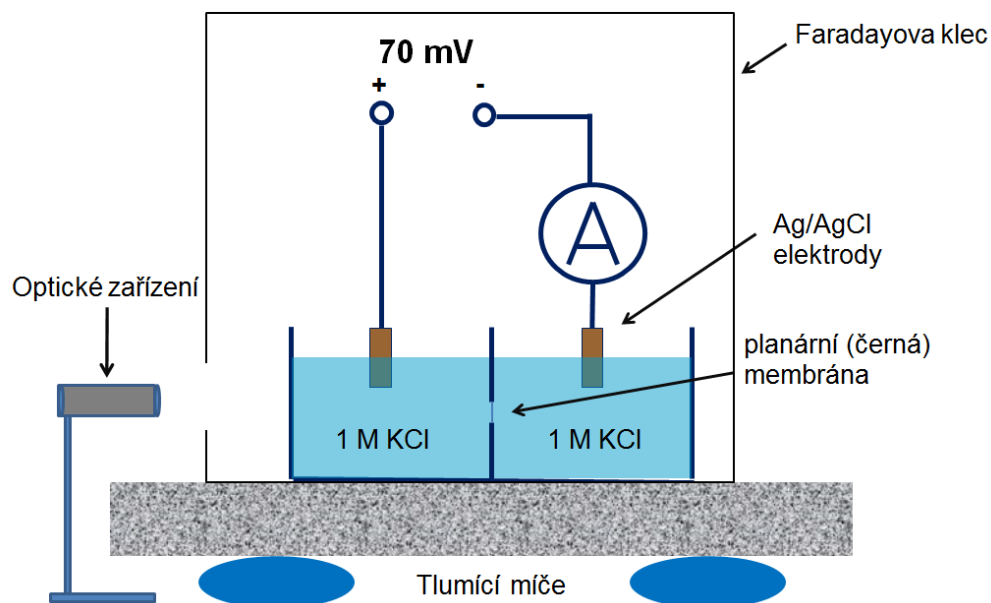
- AlphaDigiDoc[®] RT Gel Documentation System (Alpha Innotech, USA)
- BLM2 (Jiří Bok, MFF, UK)
- Lasergene[®] Sequence Analysis Software (DNASTAR, USA)
- NanoDrop 3.0.1 (NanoDrop, USA)
- QuB (State University of New York at Buffalo, USA)

3.2. BLM (černé lipidové membrány)

Měření na černých lipidových membránách (Black Lipid Membrane) je metoda založená na analýze elektrických vlastností pórotvorných proteinů, které se zabudovávají do arteficiální membrány. Zkoumané proteiny vytváří póry ve fosfolipidové dvojvrstvě a umožňují iontům roztoku procházet skrz. Průtok iontů vytváří proud, který je dále analyzován.

Speciální aparatura pro tato měření byla vyrobena v laboratoři Fyziologie bakterií na katedře Genetiky a Mikrobiologie Univerzity Karlovy. Skládá se ze speciální teflonové kyvety, argentochloridových elektrod, odstíněna od vlivu vnějších elektrických polí je tzv. Faradayovou klecí (Obr. 9). Dále je aparatura položena na mramorové desce umístěné na speciálních tlumících míčích. Pomocí argentochloridových elektrod bylo vkládáno napětí na membránu. Proud procházející membránou byl zesilován zesilovačem LCA-200-100G (zesílení 100GV/A, tedy 0,1 V/pA, Femto) a zaznamenáván pomocí A/D-převodníku (KPCI-3101, Keithly). Sběr dat byl zajišťován programem BLM2 (Jiří Bok, MFF UK). Schéma zapojení aparatury je dostupné na <http://pcfiser.natur.cuni.cz/BLM/scheme.png> (Příloha 1). Speciální kyveta má přední stranu tvořenou sklem, což nám umožňuje sledovat tvorbu membrány pomocí optického zařízení. Dále je teflonová kyveta rozdělena teflonovou přepážkou s otvorem o ploše 0,6 mm². Na každé straně přepážky byl definovaný roztok o objemu 1 ml. Za standardních podmínek se jednalo o roztok 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6. Zvolená metoda měření na černých lipidových membránách (BLM) spočívá v tom, že fosfolipidy ve směsi s organickými rozpouštědly jsou nanášeny na otvor v přepážce zmiňované výše a za postupného vytékávání rozpouštědel dochází ke vzniku a následnému ztenčování lipidové dvojvrstvy (Benz et al., 1978; Tien, 1966). Termín černé lipidové membrány (black lipid membranes) se používá právě, proto že když dochází k vytvoření

lipidové dvojvrstvy, která je tenčí než čtvrtina vlnové délky světla, pozorovateli se při posvícení v jeho směru jeví jako černá. Pro svá měření jsem nejčastěji používala 3% azolektin tedy směs lipidů izolovaných ze sóji (Příloha 2) rozpuštěných ve směsi n-dekanu a butanolu v poměru 9:1. Dalšími používanými fosfolipidy byl extrakt lipidů z bakterie *Escherichia coli*. U každého pokusu je složení fosfolipidové směsi popsáno. Na cis stranu kyvety se přidává sledovaný protein, který se do vytvořené fosfolipidové dvojvrstvy následně zabudovává. Kolicin U byl přidáván na výslednou přibližnou koncentraci v roztoku 10 nM.



Obr. 9: Schéma aparatury pro měření vodivosti jednotlivých pórů na černých lipidových membránách.

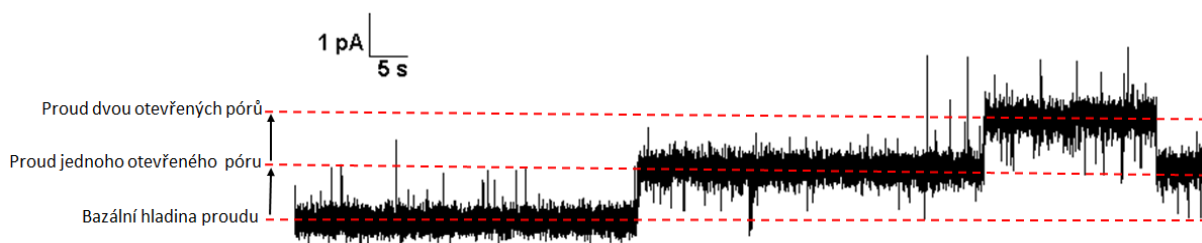
3.2.1. *Analýza a záznam jednotlivých událostí*

Souběžně se záznamem proudu (I) procházejícím vznikajícími kanály, bylo snímáno i napětí (U) na membráně (většinou 70 - 80 mV). Ke zpracování dat jsem využívala program QuB (<http://www.qub.buffalo.edu/>), kde byl zaznamenaný proud následně ještě filtrován, aby se zbavil šumu (40 Hz). Pomocí hodnot získaných z tohoto měření jsem podle vzorce:

$$G = \frac{I}{U}$$

vypočítala vodivost jednotlivých pórů, přičemž G je vodivost a má jednotky Siemens [S]. I je proud protékající elektrodami vyjádřený v ampérech [A] a U je napětí na elektrodách a tedy i na membráně vyjádřené ve voltech [V]. Proud protékající membránou bez zabudovaných proteinů jsem považovala za bazální úroveň. Zaznamenaná skoková zvýšení proudu jsem považovala za otevření póru, které umožnilo průchod dalších iontů (Obr. 10). Následně jsem

od této hodnoty odečetla předem stanovenou bazální hodnotu proudu. Vypočítaný rozdíl těchto proudů tedy udává skutečný proud procházející otevřeným pórem. Během každého pokusu jsem ověřovala čistotu roztoku minimálně hodinovým měřením proudu procházejícího membránou bez přidaného proteinu.



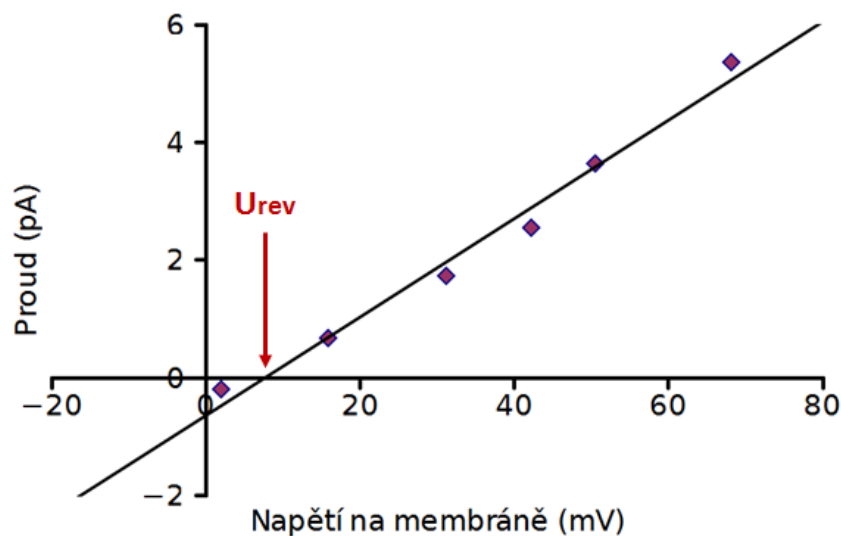
Obr. 10: Záznam vodivosti jednotlivých pórů. Skokové zvýšení proudu znamená otevření póru. Skokové snížení naopak zavření póru. Kolicin U v 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6, membrána z azolektinu.

Histogramy byly vytvářeny pomocí metody jádrového odhadu (kernel density estimation), což je neparametrický způsob určení hustoty distribuce pravděpodobností náhodných proměnných (neparametrický odhad hustoty). Tato metoda byla poprvé publikována v padesátých a šedesátých letech dvacátého století nezávisle na sobě (Rosenblatt, 1956; Parzen, 1962) a je to vlastně další z metod neparametrického odhadu hustoty, která může být použita jako alternativa ke standardním histogramům. Tato metoda využívá myšlenky aritmetického průměru n nezávislých stejně rozložených náhodných veličin, což znamená, že okolo každého pozorování je centrovaná spojitá funkce, tyto funkce jsou poté zprůměrovány jako jádrový odhad hustoty (Scott, 1992). Motivace k vytvoření náhrady za standardní histogramy byla způsobena především tím, že když se vytváří histogram, musíme počítat nejen se šířkou binů ale také koncových bodů těchto binů (tedy míst, kde jednotlivé biny začínají), zatímco metoda jádrového odhadu vede k vytváření hladších histogramů, které už jsou závislé pouze na šířce binů. Data byla zpracována skriptem Radovana Fišera, který byl vytvořen na základě těchto pravidel.

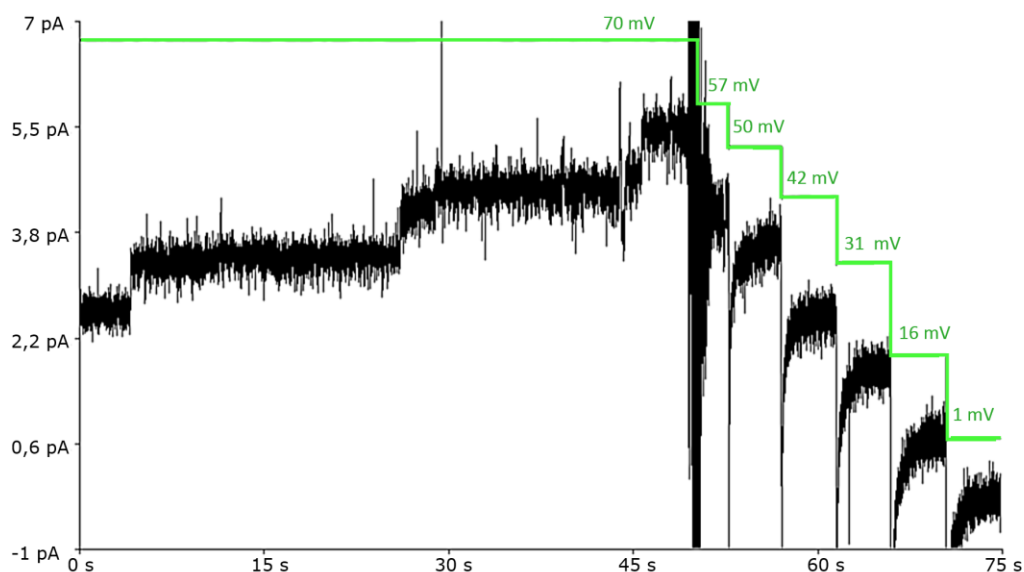
3.2.2. *Iontová selektivita*

Iontovou selektivitu kolicinu U jsem stanovovala podobným způsobem jako jiní autoři u jiných proteinových molekul (Benz et al., 1979; Trias and Benz, 1993). Při pokusu jsem nejběžněji pracovala s roztokem KCl (pH 6). Na cis straně kyvety jsem měla 0,1M roztok KCl (1ml) a na trans straně 1 M roztok KCl (1 ml). Na rozdíl od již zmiňovaných autorů jsem

protein přidávala na stranu membrány s nižší koncentrací solí, což více odpovídá fyziologickým podmínkám. Během měření jsem nechala otevřít na membráně 2-5 pórů a poté jsem měnila hodnoty napětí vkládané na membránu a zaznamenávala jsem změny proudu procházejícího membránou, způsobené změnou napětí. Tento postup jsem následně několikrát zopakovala vždy na nové membráně. Získané hodnoty proudu při různém napětí jsem vynesla do grafu, ze kterého bylo možné snadno vyčíst potenciál na membráně, při kterém tok iontů (tedy proud) mění svoji polaritu, tedy kdy je proud přesně nulový. Této hodnotě potenciálu se říká potenciál reverzní (U_{rev}) (Obr.11 a 12).



Obr.11: Ukázkový graf využitý pro stanovení reverzního potenciálu. V tomto konkrétním případě byla hodnota U_{rev} 8,9 mV. Tyto hodnoty byly získány z hodnot proudu čtyř otevřených kanálů.



Obr.12: Ukázkový záznam z měření iontové selektivity na planárních membránách, kdy je patrné, že nulový proud prochází při nenulovém napětí. 0,1M roztok na cis straně membrány a 1M na trans straně, pH 6, azolektinová membrána, koncentrace proteinu 10nM.

Při našich výpočtech vycházíme z Goldman-Hodgkin-Katzovi rovnice (Hodgkin and Katz, 1949), tedy:

$$U = \frac{RT}{F} \cdot \ln \frac{P_k \cdot c_2 + P_a \cdot c_1}{P_k \cdot c_1 + P_a \cdot c_2}$$

Přičemž P_k je propustnost pro kationty, P_a je propustnost pro anionty, c_1 koncentrace elektrolytu na jedné straně membrány a c_2 na druhé. R je molární plynová konstanta, T je teplota a F je Faradayova konstanta. Pokud definujeme iontovou selektivitu jako $S = P_k/P_a$, můžeme použít rovnici odvozenou od Goldman-Hodgking-Katzovi rovnice, tedy:

$$S_{k/a} = \frac{1 - \left(\frac{c_1}{c_2}\right) \cdot e^{U \cdot w}}{e^{U \cdot w} - \left(\frac{c_1}{c_2}\right)}$$

Kde w je konstanta $w = F/RT$, c_1/c_2 je poměr koncentrací elektrolytu na obou stranách membrány, U je již výše zmiňovaný reverzní potenciál.

Směrodatnou odchylku pro iontovou selektivitu pórů jsem vypočítala tak, že jsem stanovila extrémní hodnoty ze získaných reverzních potenciálů. Pro tyto hodnoty jsem vypočítala iontovou selektivitu a od té jsem odečetla předem vypočítanou průměrnou iontovou selektivitu.

3.2.3. *Efekt náboje v ústí póru a jeho okolí*

Efekt náboje v ústí póru je další proměnnou, která může značně ovlivnit vodivost pórů a která nám může podat další informace o jeho chování a vlastnostech. Tato vlastnost je zkoumána prostřednictvím vlivu změny koncentrace roztoku na vodivost jednotlivých pórů. Nelson a McQuarrie (1975) navrhli postup pro výpočet distribuce iontů na membránovém povrchu, která je silně ovlivněna shlukováním iontů (discrete charges). Dále pak Menestrina a Antolini (1981) navrhli aplikaci této teorie na iontové kanály obsahující nějaké náboje na svém povrchu. Kvantitativní vyjádření efektu negativního náboje v ústí kanálu na vodivost jednotlivých kanálů je následující (Benz et al., 1994):

$$\Phi = \frac{q \cdot e^{\frac{r}{l_D}}}{4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon \cdot r}$$

Náboj q ve vodné fázi vytváří potenciál Φ který je závislý na vzdálenosti r od náboje q , ε je relativní konstanta vody ($= 80$) a ε_0 je dielektrická konstanta vakua a má hodnotu ($= 8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m). l_D Debyeho vzdálenost, která vyjadřuje pokles potenciálu ve vodné fázi lze vypočítat následovně:

$$l_D^2 = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon \cdot R \cdot T}{2F^2 \cdot c}$$

c je koncentrace použitého roztoku a R je molární plynová konstanta, T je teplota a F je Faradayova konstanta.

Pokud se v okolí póru vyskytuje negativní potenciál, způsobuje akumulaci kationtů v jeho blízkém okolí. Takovouto zvýšenou koncentraci kationtů v okolí ústí póru (c_0^+) je možné vypočítat:

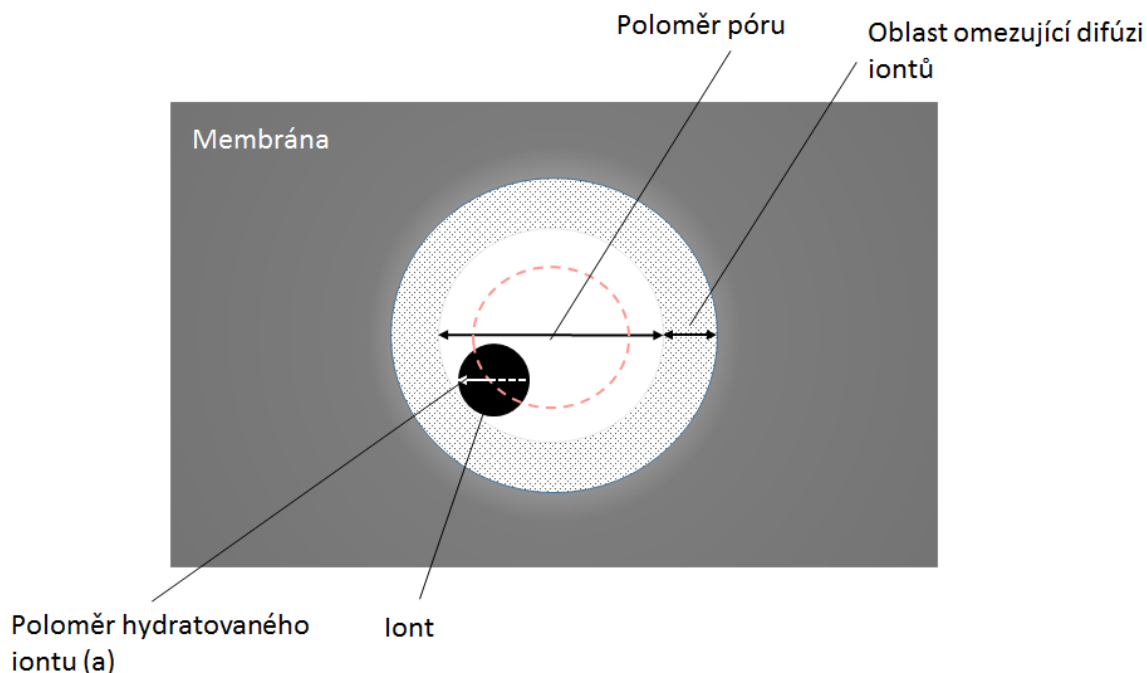
$$c_0^+ = c \cdot e^{\frac{\Phi F}{RT}}$$

Kdy opět c je koncentrace použitého roztoku a R je molární plynová konstanta, T je teplota, F je Faradayova konstanta a Φ je potenciál.

3.2.4. *Stanovení průměru pórů - Renkinův model*

Pro stanovení přibližné velikosti studovaného póru jsem dále využila teorie publikované Renkinem (Renkin, 1954). V rámci této práce Renkin ověřoval teorii z velké části vzniklou již v předešlých pracích jeho a jeho kolegů (Pappenheimer et al., 1951a; Pappenheimer, 1953) na porézních celulóзовých membránách, nepracoval tedy s pórtvornými proteiny ani s planárními membránami. Tato teorie vychází ze zjednodušujícího předpokladu, že

sledovaný pór má tvar jednoduchého válce a procházející molekuly mají sférický tvar (Obr. 13). Dále je založena na omezení difúze sledovaných molekul procházejících pórem.



Obr. 13: Renkinův zjednodušený model kanálu.

Renkin vyjádřil dva korekční faktory, které ovlivňují průchod molekuly pórem. (Pappenheimer et al., 1951b). První korekční faktor předpokládá, že molekula prochází pórem, bez toho aniž by se dotýkala stěn, byl již dříve popsán (Ferry, 1936). Rovnice níže tedy vyjadřuje sterický faktor omezující vstup molekuly do póru:

$$A = A_0 \cdot \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$$

A_0 je tedy oblast průřezu póru, a je poloměr procházejících molekul, r je poloměr póru.

Druhý faktor počítá s třením molekuly o stěny póru při jejím průchodu a byl popsán již v práci z roku 1951 (Pappenheimer et al., 1951):

$$\frac{A}{A_0} = 1 - 2,104 \cdot \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5$$

Celkové omezení difúze molekul je dáno rovnicí:

$$\frac{A}{A_0} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \cdot \left[1 - 2,104 \cdot \left(\frac{a}{r}\right) + 2,09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0,95 \left(\frac{a}{r}\right)^5\right]$$

Na základě znalosti vodivostí jednotlivých pórů pro různé kationty a hydratačních poloměrů těchto kationtů jsem byla schopná s využitím Renkinova korekčního faktoru stanovit přibližný poloměr póru. Naměřenými hodnotami vodivostí pro různé kationty jsem

prokládala (fitovala) tento model. Hodnota poloměru póru r , která umožnila nejlepší nafilování získaných dat odpovídá poloměru póru.

Hydratační poloměry iontů byly převzaty z předešlých publikací (Apelblat, 2014; Maier et al., 1996) nebo vypočítány ze Stokesovy rovnice (Trias and Benz, 1994) s využitím známé limitní molární konduktivity (λ_0), převzaty z Castellan (1983):

$$a = \frac{F \cdot e \cdot z^2}{6 \cdot \pi \cdot h \cdot \lambda}$$

Kde a je hydratační poloměr iontu, F je Faradayova konstanta, e je elementární náboj ($e = 1,602 \cdot 10^{-19}$), z je valence iontů a h je viskozita roztoku ($h = 1,002 \cdot 10^{-3}$).

3.2.5. Stanovení průměru pórů s využitím různých neelektrolytů – channel filling

Metoda stanovení velikosti póru využitím různých neelektrolytů byla použita již v mnoha předešlých pracích (Holz and Finkelstein, 1970; Krasilnikov et al., 1995; Bárcena-Uribarri et al., 2013). Pro toto stanovení je třeba znát vodivost jednotlivých pórů měřených v roztoku s přidaným neelektrolytem a také poloměry jednotlivých molekul neelektrolytů, získaných výpočtem za předpokladu, že tyto molekuly mají tvar koule, jejíž objem byl získán prostřednictvím stanovení viskozity roztoku (Sabirov et al., 1993). Za těchto předpokladů lze sledovat, jak jednotlivé molekuly neelektrolytu v závislosti na své velikosti ovlivňují vodivost pórů. Při těchto pokusech jsem vždy měřila v roztoku 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6 s přidaným konkrétním neelektrolytem (20 % w/v). Hodnota 20 % byla zvolena, protože vyšší koncentrace už by především u větších neelektrolytů mohla vést k nežádoucí destabilizaci arteficiální membrány a nižší koncentrace vede zase ke snížení přesnosti této metody (Sabirov et al., 1993). Po přidání neelektrolytu je značná část objemu roztoku obsazena jeho molekulami. Nicméně objem molekul neelektrolytu je nezávislý na jejich molekulární hmotnosti.

Použití 20% polyethylenglykolu o různých velikostech vždy způsobí zvýšení iontové koncentrace o 30 %, zcela nezávisle na molekulární hmotnosti. Molární koncentrace se tedy nedá použít jako určující jednotka pro koncentraci. V rámci této metody je potřeba především udržet koncentraci KCl stejnou při použití různých neelektrolytů, aby se kvůli tomu neměnila vodivost jednotlivých kanálů, proto se nevyužívá molární hmotnosti a molárních koncentrací, ale koncentrace vyjádřené v hmotnosti na objem.

Zaplnění póru (Channel filling)

Další vlastností, kterou kromě vodivosti budeme určovat je Channel filling (zaplnění sledovaného póru). Takto nazvaná vlastnost byla poprvé zmíněna v práci (Krasilnikov et al., 1998), nicméně tato metoda byla poprvé publikována již roku 1993 (Sabrinov et al., 1993) a byla vyjádřena rovnicí:

$$F = \left[\frac{(g_0 - g_i)}{g_i} \right] / \left[\frac{(\chi_0 - \chi_i)}{\chi_i} \right]$$

kde g_0 je vodivost pórů v přítomnosti neelektrolytu, g_i je vodivost pórů v roztoku bez přidaného neelektrolytu, χ_0 je konduktivita roztoku bez přidaného neelektrolytu a χ_i je konduktivita roztoku s přidaným neelektrolytem. Channel filling tedy vyjadřuje hodnotu zaplnění póru konkrétním neelektrolytem. Prostřednictvím této veličiny je možné zjistit nejen zaplnění póru, ale i přibližné umístění a průměr nejužší části póru (konstrikční místo) a také velikost ústí (vstupů) tohoto póru, například rozšiřující se vstup na jednu stranu, a to měřením s konkrétním neelektrolytem jen na jedné straně membrány. Pro snazší představu se zaplnění póru (channel filling) může vyjádřit v procentech (F%):

$$F\% = \frac{2F_i}{(F_1 + F_2)} \cdot 100 \%$$

F_i je zaplnění v přítomnosti daného neelektrolytu a F_1 a F_2 vyjadřují zaplnění v přítomnosti dvou nejmenších měřených neelektrolytů.

3.3. Cysteinová mutagenese kolicinu U

3.3.1. *Návrh aminokyselin vhodných pro cílenou PCR mutagenyzy a návrh primerů*

Konkrétní aminokyseliny byly navrženy s využitím programů pro predikci sekundárních struktur PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), transmembránových segmentů Octopus (<http://octopus.cbr.su.se/>) a provedením alignmentů se sekvenčně podobnými proteiny pomocí programů Clustal 0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Obr.14) a SAM (Sequence Alignment and Modeling System) dostupný online na adrese: <https://compbio.soe.ucsc.edu/sam.html> . V neposlední řadě jsem využila modelování možných struktur pórotvorné domény kolicinu U v membráně pomocí softwaru Rosetta membrane. Kombinací těchto metod jsem se pokusila vybrat nejvhodnější aminokyseliny pro záměnu za cystein tak, aby co nejméně ovlivnily topologii proteinu v membráně. Zvolila jsem

aminokyseliny na pozicích I433, F463, D486, F504, V532, W545 a L579, blíže popsané v kapitole 4.2.1. Primery pro cílenou PCR mutagenezi byly navrženy pomocí softwarů DNASTAR Lasergene (<http://www.dnastar.com/t-products-dnastar-lasergene-cloning.aspx>) a PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>).

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment **U+A+B**

```

Kolicin U          ----ANDEKAVLTKASEIIISVGDKAGEYLGDKYKVL SREIADNIKNFQG
Kolicin B          --EQENDEKTVLTKTSEVIIISVGDKVGEYLGDKYKALSREIAENINNFQG
Kolicin A          VAEKAKDERELLEKTSELIAGMGDKIGEHLGDKYKAI AKDIADNIKNFQG
                   :*: :* *:*: :* :*:** *:*****.:*:*:*:*:*:

```



```

Kolicin U          KTIRSYDEAMASVNKLMANPDLKINAADRDAIVNAWKAFDAEDMGNKFAA
Kolicin B          KTIRSYDDAMSSINKLMANPSLKINATDKEAIVNAWKAFNAEDMGNKFAA
Kolicin A          KTIRSFDDAMASLNKITANPAMKINKADRDALVNAWKHVDAQDMANKLGN
                   *****:*:*:*:*:*: ***:** *:*****.:*:*:*:*:

```



```

Kolicin U          LGKTFKAADYVMKANNVREKSIEGYQTGNWGPLMLEIESWVLSG IASAVA
Kolicin B          LGKTFKAADYAIKANNIREKSIEGYQTGNWGPLMLEVESWVISGMASAVA
Kolicin A          LSKAFKVADVVMKEVKVREKSIEGYETGNWGPLMLEVESWVLSGIASSVA
                   *:*:*:*.**.:*.:*:*****:*****:*****:*:*:*:*:

```



```

Kolicin U          LSFFSAIFGTFAMLGVFSTSLAGILAVILAGLVGALIDDNFVDKLNNEII
Kolicin B          LSLFSLTLGSALIAFGLSATVVGFGVVIAGAIGAFIDDKFVDELN HKII
Kolicin A          LGIFSATLGAYALSLGVPAI AVGIAGILLAAVVGALIDDKFADALNNEII
                   *:**: *: : ..: .*:.:*:*. **:*****:*. ***:**

```



```

Kolicin U          RPAY
Kolicin B          K---
Kolicin A          RPAH
                   :

```

Obr. 14: Ukázka alignmentu pórotvorné domény kolicinu U a blízkce příbuzných kolicinů A a B. Provedeno pomocí programu Clustal 0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

3.3.2. Cílená PCR mutageneze

Pro cílenou mutagenezi celého plazmidu jsem využila modifikovanou metodu PCR za použití polymerázy *Pfu* Turbo, přičemž použitím primerů částečně nehomologních k templátové DNA, jsem získala požadované konstrukty se změněnou sekvencí v cílové oblasti. Vzorky pro PCR reakci jsem připravila podle tabulky níže (Tab. 2) a PCR reakce proběhla v přístroji GeneAmp PCR System 9700 za podmínek uvedených v tabulce 3 (Tab. 3). Jako

templátový plazmid byl použit plazmid pDS1066 (autor plazmidu Mgr. Juraj Bosák, nepublikovaný konstrukt):

Tab. 2: Příprava vzorků pro PCR reakci.

Reagencie	Objem (ul)
dH ₂ O	43
Pfu Turbo pufr	5
dNTP mix	0,4
DNA templát	1
Pfu Turbo polymeráza	0,5
primer F	1
primer R	1

Tab. 3: Podmínky PCR reakce.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)
Úvodní denaturace	94	2
20 cyklů opakování	94	0,5
	37	1
	68	12
Konečná extenze	68	20

K následnému odstranění původní templátové DNA ze směsi byl použit enzym *Dpn* I přidáný v objemu 1 ul a inkubovaný 1 h při 37 °C. Nakonec byly PCR produkty rozděleny pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a detekovány.

3.3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je běžně využívanou metodou pro rozdělení či detekci fragmentů DNA stejně tak jako celých proteinů. Pro rozdělení PCR produktů se běžně využívají gely agarózové, které mohou být tvořeny 0,5% - 4% agarózou. V tomto případě jsem pro detekci PCR produktů použila 1% agarózový gel ve směsi s ethidium bromidem jako interkalačním činidlem (v konečné koncentraci 10 mg/ml). Celý gel byl ponořený v TAE pufru, ředěný 50x ze zásobního roztoku. Na tento gel bylo nanášeno po 10 ul směsi PCR vzorků s nanášecím pufrům (v poměru 1:1). Pro samotný proces separace molekul jsem použila zařízení i zdroj od firmy Apelex. Separace DNA fragmentů probíhala za stálého napětí 90 V po dobu 1 h. Poté jsem fragmenty DNA s interkalačním barvivem vizualizovala pomocí UV transiluminátoru

TCX-20.M a archivovala fotoaparátem Olympus Camedia C4000 a softwarem AlphaDigiDoc RT Gel Documentation System.

3.3.4. *Měření koncentrace a čistoty DNA*

Pro ověření úspěšnosti izolace DNA jsem použila spektrofotometrické stanovení s využitím spektrofotometru ND-1000 a příslušného softwaru NanoDrop 3.0.1. Nanesením 1 ul vzorku byla zjištěna absorbance roztoku při vlnové délce 260 nm (dle vztahu, kde $A_{260} = 1$ odpovídá koncentraci 50 ng/ul). Čistota izolované DNA je ověřena poměrem absorbancí při 260 a 280 nm, kdy pro čistou DNA platí, že je poměr absorbancí v rozmezí $A_{260}/A_{280} = 1,8-1,85$. Zatímco v případě kontaminace proteiny je poměr absorbancí nižší než 1,8 a při kontaminaci s RNA je poměr absorbancí vyšší než 2.

3.3.5. *Příprava chemokompetentních buněk*

Chemokompetentní buňky jsem vytvořila tak, že jsem je vystavila působení 0,1 M CaCl_2 , které způsobuje jejich chemokompetenci, tedy schopnost buněk snadněji přijímat cizorodou DNA. Nejprve byl 1ml noční kultury kmene *E.coli* DH10B přeočkován do 100 ml TY média a třepán (200 rpm) po dobu 4 h při 37°C. Poté byly buňky stočeny ve vychlazené centrifuze (4°C) při 3000 g po dobu 20 min. Od té doby se pracovalo stále na ledu. Byl odstraněn supernatant, buňky byly rozsuspendovány v 50 ml 0,1 M CaCl_2 a takto inkubovány na ledě 1 h. Následně byly buňky opět stočeny (3000 g, 4 °C, 15 min), resuspendovány v 2,5 ml 0,1M CaCl_2 a inkubovány na ledě po dobu 1h. Takto vzniklé chemokompetentní buňky byly smíchány s 2,5 ml 20% glycerolu, rozděleny po 500 ul do mikrozkušavek. Následně byly uloženy do -80°C připravené k následnému použití.

3.3.6. *Uměle navozená transformace*

Celá příprava vzorku na transformaci probíhá na ledě. Ve vychlazených sterilních mikrozkušavkách jsem smíchala 50 ul kompetentních buněk a 2 ul plazmidové DNA (v našem případě se jedná o neúplnou plazmidovou DNA vzniklou při cílené PCR mutagenезi) a inkubovala jsem na ledě. Po 30 minutách jsem zkumavky ponořila do vodní lázně (42 °C) na 42 s, čímž byly buňky vystaveny tepelnému šoku a následně mohlo docházet k přenosu DNA do buněk. Poté jsem je okamžitě vrátila na led a nechala inkubovat dalších 30 min. Nakonec jsem transformované buňky nanasla na agarovou plotnu s ampicilinem a

nechala inkubovat přes noc při 37 °C. Ampicilinové plotny jsem využívala, protože plazmidy transformované do buněk obsahují rezistenci právě na toto antibiotikum.

3.3.7. *Izolace plazmidové DNA*

Plazmidová DNA z transformovaných bakterií *E.coli* DH10B byla izolována s použitím komerčního kitu QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy QIAGEN, podle postupu doporučeného výrobcem. Nejprve jsem vybraný bakteriální kmen kultivovala přes noc při 37 °C v LB médiu (25 ml) s přidaným ampicilinem (100 µg/ml). Noční inokulum jsem následně centrifugovala (3000 g, 25 min) a odstranila jsem supernatant. Buňky jsem resuspendovala v 500 µl pufru P1 (*obsahuje enzym RNázu A*), přenesla do mikrozkušavky a přidala 500 µl P2 pufru (*obsahuje hydroxid sodný*). Tuto směs jsem několikrát promíchala. V tomto kroku došlo k porušení buněčných povrchů. Do 5 min jsem přidala 700 µl pufru N3 (*obsahuje guanidiny hydrochlorida a kyselinu octovou*) a řádně promíchala převrácením zkumavky. Tato fáze je kritická, protože v ní dochází k zastavení lyze a vysrážení proteinů. Následně jsem buněčné lyzáty stočila (10 min, 14100 g), čímž jsem se zbavila rozbitých buněk. Získaný supernatant obsahující plazmidovou DNA jsem přenesla na připravené kolonky příslušného kitu. Tyto kolonky s lyzátem jsem centrifugovala (60 s, 14100 g) a zachytila jsem tak plazmidovou DNA navázáním na membránu filtru, v další fázi jsem přečišťovala zachycenou DNA. Nejdříve jsem ji promyla stočením (60 s, 14100 g) 500 µl pufru PB (*guanidiny hydrchlorid*) a následně 750 µl pufru PE (*etanol*). Poté byla kolonka stočena ještě jednou, abych se zcela zbavila etanolu obsaženého v pufru PE. Sběrnou tubu kolonky jsem nahradila mikrozkušavkou a na pročištěnou DNA jsem přidala 50 µl pufru EB (*eluční pufr*). Nechala jsem 2 min působit a pak jsem kolonku opět stočila (60 s, 14100 g). Koncentraci a čistotu získané plazmidové DNA jsem zjišťovala pomocí spektrofotometru ND-1000 a příslušného softwaru NanoDrop 3.0.1. a gelovou elektroforézou.

3.3.8. *Příprava vzorků na sekvenaci*

Pro bezproblémovou sekvenaci jsem musela zajistit koncentraci plazmidové DNA minimálně okolo 30 ng/µl, nejlépe ale od 50 ng/µl výše. Vzorky na sekvenaci byly připraveny smícháním izolované plazmidové DNA s 5 µl konkrétního sekvenačního primeru o koncentraci 5 pmol/ul vybraného v závislosti na úseku plazmidu, který jsem chtěla sekvenovat (Tab. 4). Sekvence vzorků byla prováděna ve firmě GATC Biotech Sangerovou

metodou. Analýza výsledků sekvenování byla provedena softwarem Lasergene® Sequence Analysis Software.

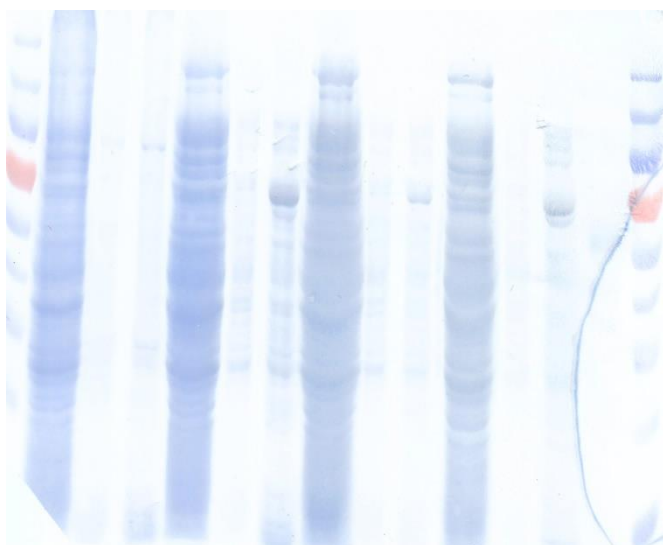
Tab. 4. Sekvence primerů pro sekvenaci.

Název primeru	Sekvence
2colU-F	GAATACAGGGCTGGT
3colU-F	AAAGCGGCTGCTGAA
pBAD-F	ATGCCATAGCATTTTATCC

3.3.9. *Produkce a purifikace kolicinu U a jeho mutant*

3.3.9.1. *Kontrolní maloobjemová produkce*

Nejdříve jsem nechala přes noc narůst kulturu produkčního kmene bakterií *E. coli* TOP10F. Druhý den jsem 5 ml této kultury přidala do 50 ml LB média s přidaným ampicilinem (výsledná koncentrace 100 µg/ml) a nechala třepat (200 rpm) při 37 °C do OD 0,5. Poté jsem sterilně přidala 20% L-arabinózu ve výsledné koncentraci 0,02% (v/v) a nechala třepat (200 rpm) při 37°C po dobu minimálně 3 h. Následně jsem indukované buňky stočila (3000 g, 25 min, 4 °C). Odstranila jsem supernatant (odebrán vzorek na SDS-PAGE). Zbylé buňky jsem resuspendovala v 1ml lyzačního pufru a nechala inkubovat na ledě po dobu 1 h. Poté jsem buňky vystavila působení ultrazvuku (24 kHz), došlo k rozrušení povrchu bakterií a jejich lyzi, působení ultrazvuku jsem aplikovala tak dlouho, dokud nedošlo k částečnému vyčerení roztoku. Lyzované buňky jsem stočila (3000 g, 4 °C, 10min) a odebrala jsem lyzát (odebrán vzorek na SDS-PAGE). Lyzát obsahující produkovaný protein jsem smíchala s předem připravenými NiNTA agarózovými kuličkami. A nechala jsem protein pomocí hexahistidynové kotvy vázat na kuličky po dobu 2 h, za pomalého otáčení (4 °C). Poté jsem lyzát s kuličkami stočila (3000 g, 4 °C, 10min) a oddělila od kuliček. Ke kuličkám jsem následně přidala 1 ml promývacího pufru, nechala 2 min promývat a následně jsem opět stočila. Odebrala jsem promývací pufr. Během každého tohoto kroku jsem odebrala vzorek pro SDS-PAGE, kterou jsem následně provedla a zkontrolovala tak, že došlo k produkci dostatečného množství proteinu a že se následně navázal na NiNTA agarózové kuličky. Zároveň jsem obdobným způsobem provedla produkci i za mírně pozměněných podmínek, čímž jsem se pokusila produkci kolicinu U optimalizovat (Obr. 15).



1. Marker
2. Lyzát – 0M EDTA
3. Flow through– 0M EDTA
4. Kuličky před elucí– 0M EDTA
5. Lyzát – 1mM EDTA
6. Flow through – 1mM EDTA
7. Kuličky před elucí – 1mM EDTA
8. Lyzát – 2mM EDTA
9. Flow through – 2mM EDTA
10. Kuličky před elucí – 2mM EDTA
11. Lyzát – 0M EDTA, jiné kuličky
12. Flow through – 0M EDTA, jiné kuličky
13. Kuličky před elucí – 0M EDTA, jiné kuličky
14. Pozitivní kontrola
15. Marker

Obr. 15: Optimalizace purifikace kolicinu U.

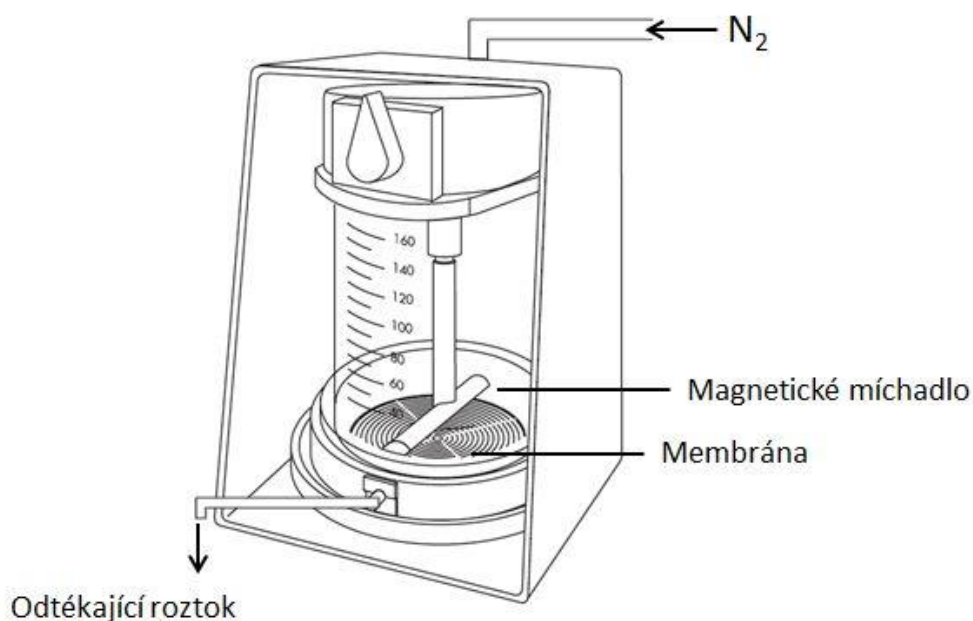
3.3.9.2. Velkoobjemová produkce kolicinu U

Nejprve jsem si připravila buňky *E.coli* TOP10F obsahující plazmid kódující tvorbu kolicinů. 250 ml nočního inokula buněk TOP10F jsem naočkova do 2,25 l LB média s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 µg/ml. Nechala jsem třepat (150 rpm) při 37 °C do OD okolo 0,5. Následně jsem buňky indukovala 20% roztokem sterilní L-arabinózy do výsledné koncentrace 0,02 % a nechala třepat 3 h při 37 °C, tím jsem indukovala expresi kolicinu U. Indukované buňky jsem stočila (8000 g, 4°C, 15 min), odebrala supernatant a buňky resuspendovala v 50 ml lyzačního pufru. Buňky v lyzačním pufru jsem nechala inkubovat 1 h na ledu. Následně byly buňky vystaveny působení ultrazvuku (24 kHz), ultrazvuk jsem aplikovala tak dlouho, dokud nedošlo k částečnému vyčerpání roztoku. Zlyzované buňky jsem stočila (3000 g, 4°C, 20 min) a odebrala jsem lyzát. K 50ml lyzátu jsem přidala 500 µl promytých NiNTa-agarozových kuliček schopných vázat hexahistidinovou kotvu, která je součástí exprimovaných proteinů. Nechala jsem proteiny vázat na kuličky po dobu 2 h, ve 4°C, za pomalého otáčení. Lyzát s navázanými kuličkami jsem nechala protéct předem připravenou kolonou, na které se zachytily kuličky s navázanými proteiny. Tyto kuličky jsem následně promyla 50 ml promývacího pufru a pak už jsem

navázané proteiny vyvazovala elučními pufrý s postupně se zvyšující koncentrací imidazolu (0,25 M, 0,5 M, 1 M), který je schopen vázat se na kuličky místo navázaných proteinů. Ze získaných elučních frakcí jsem odebrala vzorky, které jsem dala na gel, abych ověřila výsledek purifikace.

3.3.10. *Zakoncentrování a diafiltrace proteinů pomocí Amicon ultrafiltrační kyvety*

Po skončení purifikace se získává protein v elučním pufru s vysokým obsahem imidazolu. Aby bylo možné s proteinem dále pracovat, bylo nutno odstranit nízkomolekulární látky, které by mohly inhibovat protein při následných studiích. V mém případě se jednalo především o imidazol (může způsobovat srážení proteinu) a EDTA. Odstranění těchto látek jsem provedla pomocí Amicon ultrafiltrační kyvety. Tato koncentrační a dialyzační aparatura (Obr. 16) umožňuje přefiltrování relativně velkých objemů roztoků tlakem plynného dusíku vypouštěného na povrch roztoku. Tento tlak způsobuje průchod roztoku přes speciální membránu v dolní části kyvety, která zabraňuje průchodu proteinu (xxx). Tudíž se dá tato aparatura použít pro zakoncentrování proteinu, ale i pro jeho dialýzu. Nejprve jsem nechala speciální membránu promývat v destilované vodě po dobu 1 h. Sestavila jsem aparaturu dle návodu a následně jsem membránu, již vloženou v aparatuře promyla několikrát destilovanou vodou. Do promyté aparatury jsem následně nalila 3 ml získané nejkoncentrovanější eluční frakce proteinu a přidala jsem 50 ml pufru, který jsem požadovala jako konečný (0,1 M KCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA). Pečlivě jsem aparaturu uzavřela a spustila magnetické míchadlo a také jsem spustila dusík do maximálního výsledného tlaku 70 psi. Po zakoncentrování na $\pm$ 3 ml jsem opět přidala 50 ml pufru a opět zakoncentrovala. Ve výsledku byl původní roztok naředěný zhruba 300x, tudíž například imidazol o původní koncentraci 0,25 M by naředěn na výslednou koncentraci 0,001 M. Odtékající roztok jsem jímala a ukládala. Se získanými vzorky jsem provedla zkoušku na přítomnost proteinu pomocí metody dle Bradfordové, abych si ověřila, že není poškozená membrána a nedochází k úniku proteinu do vypouštěného roztoku. Vzorky zakoncentrovaných a dialyzovaných roztoků jsem dala na SDS-PAGE.



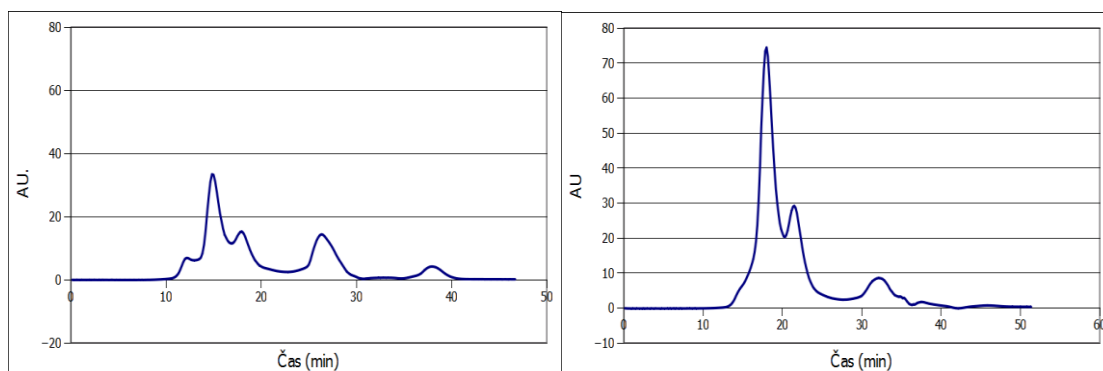
Obr. 16: Amicon ultrafiltrační aparatura.

3.3.11. *Gelová permeační chromatografie*

Dále jsem přistoupila k dalšímu běžně využívanému purifikačnímu kroku, gelové permeační chromatografii, kterou jsem provedla v Laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů na AV ČR. Nejprve jsem si připravila používaný roztok (0,1 M NaCl, 50 mM TRIS). K vlastní chromatografii jsem používala soustavu *AKTA Purifier* (GE Healthcare, USA) FPLC (z angl. "Fast protein liquid chromatography"), použita byla kolona Superdex 75 10/300 mm GL o objemu 24 ml. Kolona Superdex obsahuje zesíťovaný agarózový gel s kovalentně navázaným dextranem. Tento gel vytváří směs různě velkých chodbiček, ve kterých se procházející molekuly zachytávají nebo volně prochází v závislosti na jejich velikosti. Dostatečně velké molekuly se nezachytávají a procházejí souběžně s mobilní fází. Superdex 75 je schopen zachytávat molekuly o velikosti 3000 až 70000 Da. Pro všechny purifikované proteiny byla nastavena průtoková rychlost 0,6 ml/min, maximální tlak v koloně byl 1 MPa. Součástí soustavy byl i spektrofotometr nastavený na vlnovou délku 280 nm, takže v protékajícím roztoku mohl být průběžně v čase detekován obsažený protein a stanoveny frakce, které obsahují protein. Nejprve byla kolona promyta výše zmiňovaným pufrem. Poté jsem pomocí hamiltonovy stříkačky nanasla 0,5 ml konkrétního vzorku s obsaženým proteinem. Proběhlo chromatografické dělení proteinu na koloně. Získané frakce jsem jímala do mikrozku mávek a dále analyzovala pomocí SDS-PAGE.

3.3.12. Zakoncentrování proteinu pomocí přístroje Speedvac

Pro zakoncentrování proteinů jsem využila vakuového koncentrátoru SpeedVac (Savant, model SC110A), který pracuje na principu vypařování rozpouštědla z roztoku ve vakuu. Vzorky jsem se pokusila zakoncentrovat na podobnou výslednou koncentraci. Toho jsem docílila výpočtem finálního zakoncentrování vzorků pomocí záznamu spektrofotometrických měření (280 nm) získaných při gelové permeační chromatografii (Obr. 17) a vypočítala přibližné zakoncentrování (Tab. 5).



Obr. 17: Ukázkový záznam koncentrace proteinů získaná spektrofotometrickým měřením. Poměr koncentrací v jednotkách AU lze následně snadno porovnat.

Tab. 5: Výpočty pro zakoncentrování mutovaných proteinů.

	A.U.	A.U. (%)	Zakoncentrování
Kolicin U (wt)	60	80	2,3x
F436C	75	100	2x
D468C	25	33,3	5,6x
F504C	30	40	4,7x
V352C	14	18,7	10x
W545C	52	69,3	2,7x

3.3.13. SDS-PAGE

Během své práce jsem používala 10% polyakrylamidový gel, na kterém se dají rozdělit proteiny o hmotnosti 10 – 100 kDa. Separační gel jsem si připravila tak, že jsem smíchala všechny komponenty vypsané v kapitole 3.1.2., přičemž úplně nakonec jsem přidala APS a

TEMED a poté jsem ho nalila mezi skla na elektroforézu, zalila vodou a nechala 30 min tuhnout. Mezitím jsem si připravila koncentrační gel. Poté jsem odsála vodu z povrchu ztuhlého gelu a nalila zaostřovací gel. Vložila jsem hřebínek a nechala opět zhruba 50 min tuhnout. Takto připravený gel jsem vložila do elektroforetické aparatury a zalila elektrodovým pufrům, který vznikl naředěním 5x koncentrovaného elektrodového pufru. Do jamek vyplněných pufrům jsem nanasla vzorky proteinů ve směsi s barvicím roztokem 1:1, předem inkubované při 100 °C po dobu 5 min. Do první a poslední jamky jsem nanasla proteinový marker. Následně jsem spustila zdroj pro elektroforézu (200 V, 40 pA), který způsobil, že proteiny záporně nabitě pomocí SDS putují směrem k anodě a rozdělují se na základě molekulární hmotnosti. Takto rozdělené proteiny jsem vizualizovala pomocí barvení s Comassie Brilliant Blue, barvou Naphtol Blue Black nebo jsem provedla Western blot

3.3.13.1. Barvení s Comassie Brilliant Blue

Nejběžnější metodou vizualizace všech proteinů na gelu je barvení Comassie Brilliant Blue. Toto barvivo je schopné vázat se kvantitativně na všechny proteiny na gelu. Gel po elektroforéze jsem nechala barvit v roztoku Coomassie Blue po dobu minimálně 2 h. Následně jsem ho dala odbarvovat do odbarvovacího roztoku, kde zůstal do odbarvení, tedy do okamžiku kdy byla viditelná pouze místa s navázanou barvou.

3.3.13.2. Barvení s Naphtol Blue Black

Další metodou barvení, kterou jsem využívala, bylo barvení s roztokem Naphtol Blue Black (též amido black). Toto barvivo je též schopné vázat se na všechny proteiny. Používala jsem ho na barvení proteinů přenesených na nitrocelulózovou membránu. Tuto metodu jsem používala především pro její citlivost a kvůli snazšímu uchovávání výsledků v podobě nitrocelulózových membrán.

3.3.14. Western blot

Je speciální laboratorní metoda pomocí, které můžeme detekovat konkrétní proteiny na nitrocelulózové membráně. Pro rozdělení proteinů se využívá gelová elektroforéza, kde jsou rozděleny všechny proteiny, které jsou následně přeneseny na membránu a na ní jsou detekovány pouze specifické proteiny pomocí interakce se specifickou protilátkou. Nejdříve jsem si připravila nitrocelulózovou membránu (6x8 cm) a ponořila jsem ji do metanolu. Do připravené vaničky s transferovým pufrům jsem si předem na černý konec blotovací kazety

naskládala buničinu a vatu. Na buničinu jsem poté položila gel s proteiny rozdělenými podle velikosti, na něj jsem položila membránu, další buničinu, vatu a nakonec jsem celou kazetu uzavřela, a to velice opatrně abych zabránila přístupu vzduchu a tím vzniku bublinek na membráně. Kazetu jsem vložila do blotovacího přístroje také předem naplněného transferovým pufrem a pustila elektrický proud (100 V, 1 h), který způsobil přenos proteinů z gelu na membránu. Po přeblotování jsem membránu ponořila do 7 ml blokovacího pufru a nechala blokovat po dobu 1 h. V této fázi dochází k vyblokování nespecifických míst na membráně, aby nakonec byly vizualizované pouze cílové proteiny. Poté jsem do falkony se zbylými 3 ml blokovacího pufru přidala 3 ul specifických protilátek (Penta-His HRP Conjugate) a promíchala. Pak jsem do ní vložila membránu přeblotovanou stranou nahoru a po dobu 1 hodiny jsem nechala vázat protilátky za pokojové teploty. Následně jsem membránu promyla v TBS pufru 3x po 15 minutách. Zviditelnit lze navázané protilátky pomocí barvení (např. Gramovo) nebo chemiluminiscenční cestou.

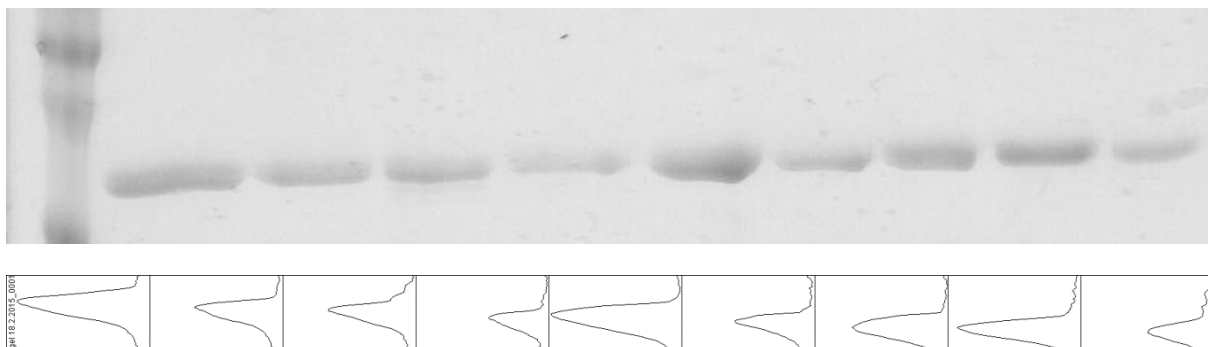
3.3.14.1. Kolorimetrická vizualizace

Kolorimetrickou detekci specifických proteinů membrány po Western blottu jsem provedla pomocí speciálního kitu od firmy Sigma Aldrich - AEC Staining Kit, kdy jsem membránu vložila do roztoku tvořeného 4 ml H₂O a reagensii z AEC Staining kitu a nechala vázat. Po několika minutách již proteiny byly viditelné. Membránu jsem poté opláchla destilovanou vodou a nechala usušit.

3.3.15. Denzitometrická analýza proteinu na SDS-PAGE

Nejdříve byl připraven 10% polyakrylamidový gel obdobným způsobem jako v kapitole 3.3.4. Důležité bylo dbát především na to, aby nanáška všech vzorků byla stejná. Na první polovinu gelu byly nanесeny vzorky s proteiny o neznámé koncentraci a na druhou polovinu gelu byla nanесena koncentrační řada proteinu BSA ve stejném objemu. Poté byla provedena samotná denzitometrická analýza pomocí programu ImageJ (dle internetového návodu: http://www1.med.umn.edu/starrlab/prod/groups/med/@pub/@med/@starrlab/documents/content/med_content_370494.html). Nakonec se tedy podařilo získat tabulku denzit jednotlivých bandů vyjádřených v ploše (area) (Obr. 18). Následně jsem získané denzity převedla na procentuální zastoupení jednotlivých bandů, jako 100% denzitu jsem zvolila band s proteinem BSA o koncentraci 0,1 mg/ml. A na základě získaného procentuálního poměru jsem

vypočítala přibližnou koncentraci jednotlivých vzorků. Celá denzitometrická analýza byla provedena na dvou gelech 2× nezávisle za sebou.



Obr. 18: Určení koncentrace proteinu na základě denzitometrie bandů z SDS-PAGE. Druhý obrázek vyjadřuje denzity jednotlivých variant, z nichž byla následně vypočítána plocha.

3.3.16. Stanovení titru kolicinu

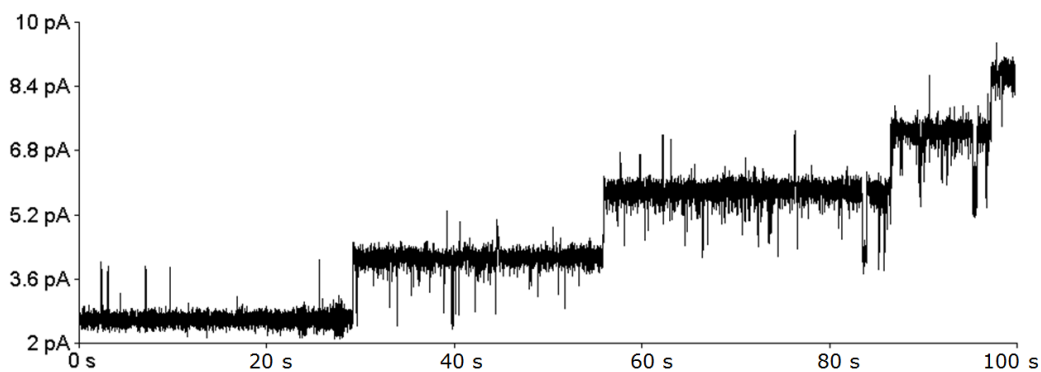
Titř kolicinu byl stanoven kapkovou metodou. Bakteriální kmen *E. coli* 5K, který vykazuje citlivost pro kolicin U byl kultivovaný v 5 ml LB média přes noc při 37 °C. Noční inokulum citlivého kmene o objemu 100 ul jsem naočkovala do 3 ml TOP agaru (0,6 % agar), promíchala a tím převrstvila standardní agarovou plotnu (1,2 % agar). Po naředění kolicinu U a jeho mutovaných variant trojkovou řadou (3^0 - 3^5) v roztoku 150 mM NaCl, 5 mM TRIS, jsem tato ředění nanasla v kapkách (3 ul) na agar s citlivým kmenem, nechala zaschnout a dala přes noc kultivovat při 37°C. Titraci jsem provedla minimálně ve 3 nezávislých opakováních a nakonec jsem stanovila výsledný titr kolicinu U a jeho mutovaných variant pro citlivý kmen.

4 VÝSLEDKY

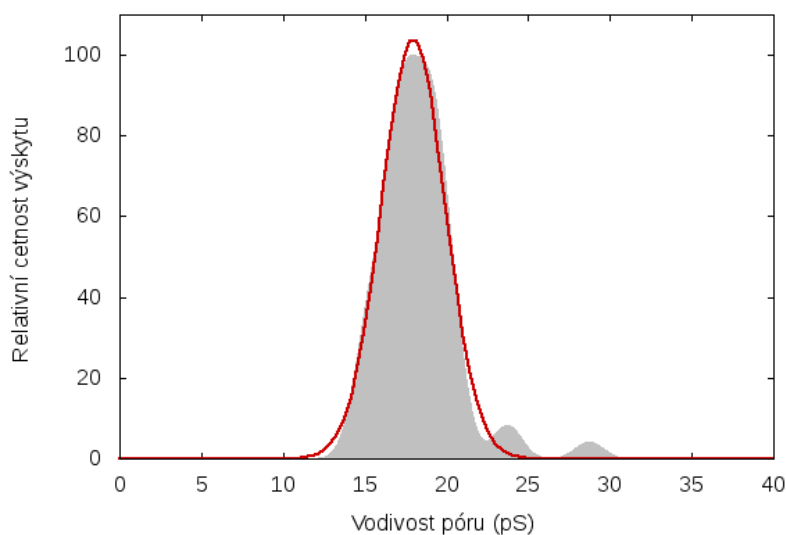
4.1. Charakteristiky pórů kolicinu U

4.1.1. *Vodivostní charakteristika pórů kolicinu U v membránách z azolektinu a extraktu lipidů bakterie E.coli*

Měřením na černých lipidových membránách jsem se pokusila co nejpodrobněji prostudovat elektrické vlastnosti póru kolicinu U, nejen vodivost jednotlivých pórů a jejich selektivitu, ale také změny chování pórů při různých podmínkách a jejich přibližnou velikost. Pro všechna vodivostní měření jsem stanovila standardní podmínky, které vyplývají nejen ze snahy přiblížit se fyziologickým podmínkám, ale především z potřeby použít takové podmínky, které by umožnily snazší porovnávání s dalšími koliciny i jinými pórtvornými proteiny. Standardní podmínky jsem definovala takto: měřila jsem v roztoku 1M KCl, 10mM HEPES při pH 6 a membrány byly tvořeny z azolektinu (sójový extrakt – Příloha 2) ve směsi s dekanem a butanolem, velikost otvoru na tvorbu membrány byla standardně 0,6 mm² a výsledná koncentrace přidávaného proteinu v roztoku byla 10 nM. Roztok 1M KCl jsem zvolila, protože póry kolicinu U jsou malé a při nižší koncentraci chloridu draselného by byly naší aparaturou hůře rozlišitelné i následně charakterizovatelné. Dále jsem zvolila pH roztoku pH 6, jelikož enterobakterie produkující koliciny se vyskytují ve střevech, kde se hodnota pH běžně pohybuje mezi 5 – 7 (Fallingborg, 1999). Membrány z azolektinu jsem zvolila, protože existuje mnoho prací o kolicinech i jiných pórtvorných proteinech prováděných právě na membránách ze sójových lipidů. Použití těchto lipidů sice není fyziologicky příliš relevantní, ale skýtá mnoho výhod, například fakt, že membrány vytvořené touto lipidovou směsí jsou velmi stabilní a tím se zvyšuje efektivita měření. Při měření vodivostí pórů kolicinu U za standardních podmínek jsem zjistila, že průměrná vodivost póru se pohybuje okolo 19 pS (Obr. 20). Navíc, jak je z ukázkového záznamu měření patrné, kolicin U tvoří stabilní a uniformní póry (Obr. 19).

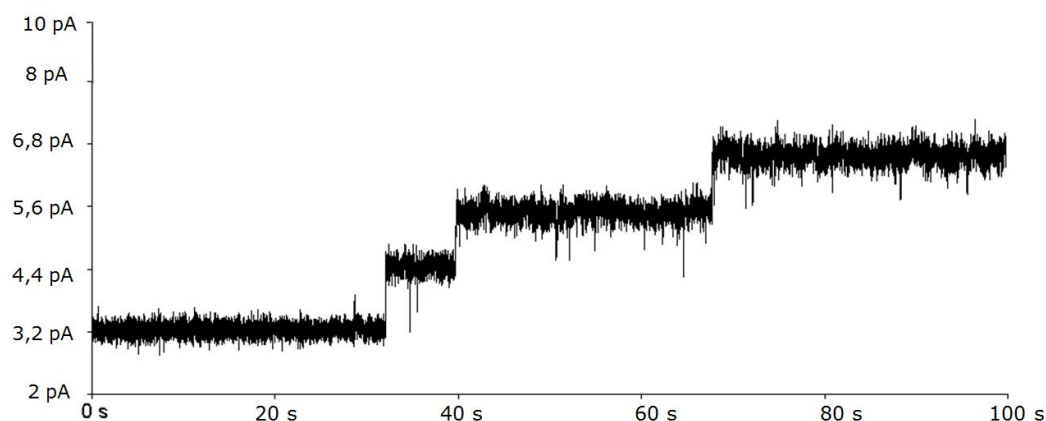


Obr. 19: Ukázkový záznam měření při standardních podmínkách – 1M KCl, 10 mM HEPES, pH 6, azolektinové membrány, 10nM proteinu, 70 mV, data filtrována na 40 Hz.

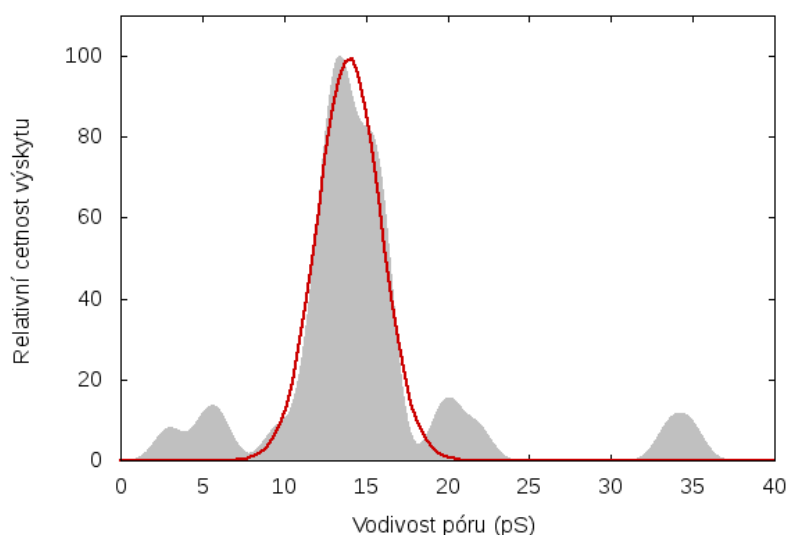


Obr. 20: Histogram četnosti vodivostí pórů kolicinu U měřených při standardních podmínkách – 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6, azolektinová membrána, 10 nM protein, 75 mV. Data byla sbírána 2 hodiny. V histogramu je zahrnuto 62 událostí (jednotlivých otevření pórů). Histogram byl sestaven z binů (tedy intervalu hodnot) o velikosti 5 pS.

Jak jsem již zmiňovala výše, membrány z azolektinu obsahují lipidy ze sóji, tudíž jde o zcela odlišné membránové složení, než mají skutečné produkční či napadané kmeny bakterií. Což jsou v případě kolicinu U některé kmeny bakterie *Escherichia coli* a *Shigella boydii*. Proto jsem provedla kontrolní měření s membránami tvořenými extraktem z lipidů bakterie *E. coli*. Na základě těchto měření jsem zjistila, že v těchto membránách tvoří kolicin U také stabilní a uniformní póry (Obr. 21) ovšem s nižší vodivostí okolo 14 pS (Obr. 22).



Obr. 21: Ukázkový záznam měření na membránách z lipidů bakterie *E. coli*. Měřeno v 1M KCl, 10 mM HEPES, pH 6, membrány z lipidů bakterie *E. coli*, 10nM proteinu, 75 mV, data filtrována na 40 Hz.



Obr. 22: Histogram četnosti vodivostí pórů kolicinu U měřených na membránách z lipidů bakterie *E. coli*. Dál měřeno v 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6, 10 nM protein, 75 mV Data byla sbírána 2 hodiny. V histogramu je zahrnuto 35 událostí (jednotlivých otevření pórů). Histogram byl sestaven z binů (tedy intervalu hodnot) o velikosti 5 pS.

4.1.2. Iontová selektivita pórů kolicinu U

Velice důležitou vlastností, která se u pórtvorných proteinů běžně zkoumá je iontová selektivita. Tato hodnota nám poskytuje informace o tom, zda studovaný pór upřednostňuje průchod některých iontů oproti ostatním a je vyjadřována jako poměr hodnot propustností kationtů oproti aniontům. Tuto vlastnost lze zjistit měřením na planárních lipidových

membránách, kdy se vytvoří gradient na membráně a měří se proud procházející membránou při různém napětí. Takto získané hodnoty se vynesou do grafu, z něhož získáme hodnotu U_{rev} , což je hodnota reverzního potenciálu. Pomocí této hodnoty s využitím Goldman-Hodgkin-Katzovi rovnice poté snadno zjistíme iontovou selektivitu (kapitola 3.2.2.). Zjištěná iontová selektivita pórů kolicinu U při standardních podmínkách byla 1,4 (+/-). Z této hodnoty tedy vyplývá, že póry jsou velmi slabě kation selektivní. Ale jak je patrné z tabulek níže, iontová selektivita silně závisí na podmínkách měření. Například je silně ovlivněna jak hodnotou pH roztoku (Tab. 7) tak i druhy kationtů či aniontů v roztoku (Tab. 6).

Tab. 6: Iontová selektivita měřená v chloridovém roztoku s přidávanými různými kationty, 0,1M roztok na cis straně membrány a 1M na trans straně, pH 6, azolektinová membrána, koncentrace proteinu 10nM:

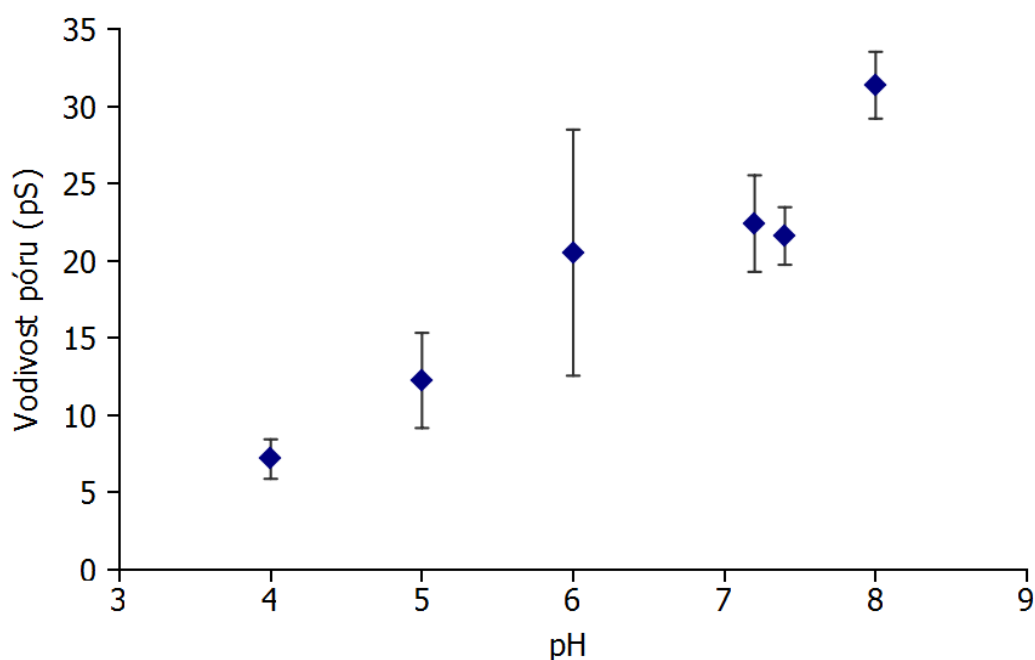
	U_{rev} (mV)	Iontová selektivita (K^+/A^-)	Směrodatná odchylka iontové selektivity	Počet opakování
RbCl	26,3	3,7	2,35	8
NaCl	16,34	2,2	0,42	2
NH₄Cl	10,20	1,64	0,02	3
KCl	7,08	1,4	0,1	5
CsCl	2,87	1,14	0,07	2
LiCl	0,82	1,04	0,24	5

Tab. 7: Iontová selektivita pórů při různém pH roztoku. Měřeno v 0,1M KCl na cis straně membrány a 1M KCl na trans straně, azolektinová membrána, koncentrace proteinu 10 nM:

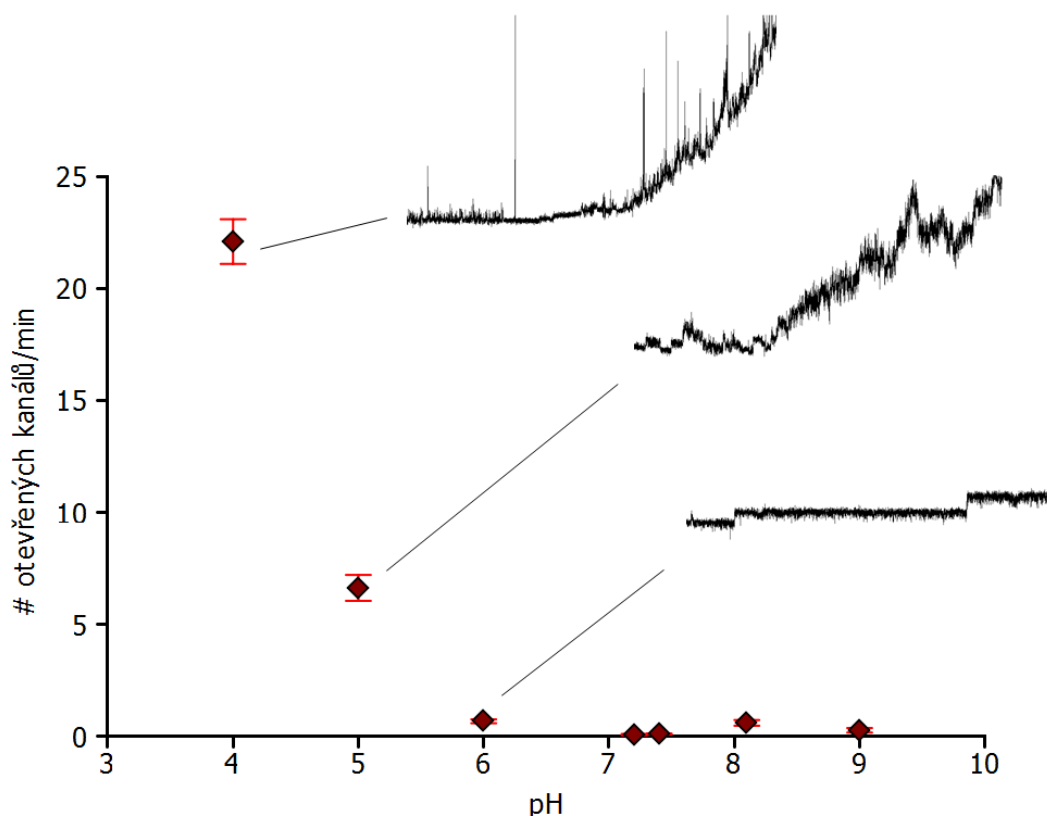
pH roztoku KCl	U_{rev} (mV)	Iontová selektivita (K^+/A^-)	Směrodatná odchylka iontové selektivity	Počet opakování
7,4	7,18	1,41	0,26	6
6	7,08	1,4	0,1	5
5	0,62	1,03	0,16	12

4.1.3. Vliv změny pH roztoku na vodivost a aktivitu pórů

Vliv změny hodnot pH roztoku na pórtvorné proteiny byl studován v mnoha předešlých pracích jak na kolicinech, tak i jiných proteinech (Donovan et al., 1981; Mel and Stroud, 1993; Muga et al., 1993; Davidson et al., 1985; Wilmsen et al., 1990). Například pro kolicin E1 bylo prokázáno, že největší množství proteinu se zabudovává do membrány při pH 4 (Davidson et al., 1985). Pro kolicin N byla dokonce vyslovena hypotéza, že se může vyskytovat ve dvou stavech, v závislosti na pH roztoku ve kterém je rozpuštěn (Wilmsen et al., 1990). Z těchto důvodů jsem sledovala vliv pH roztoku na vodivost a aktivitu pórů kolicinu U. Z grafů sledujících vliv pH roztoku na vodivost či aktivitu otevírání pórů je patrné, že póry kolicinu U jsou na pH roztoku silně závislé (Obr. 23 a 24). Se zvyšujícím se pH roztoku se lineárně zvyšuje vodivost jednotlivých pórů a zároveň se snižuje pravděpodobnost otevírání těchto pórů.



Obr. 23: Závislost vodivosti jednotlivých pórů na pH roztoku. Měřeno při standardních podmínkách, pouze při různém pH (1M KCl, azolektin, 75 mV, pH 4-9) Průměrná vodivost vypočítána z minimálně 20 událostí pro měření v pH 8, 7 a 6 a z více než 70 událostí pro pokusy v pH 4 a 5.



Obr. 24: Závislost četnosti otevírání pórů na pH roztoku. Měřeno při standardních podmínkách, pouze při různém pH (1M KCl, azolektin, 10nM kolicinu, 75 mV, pH 4-9). Jednotlivé hodnoty byly získány z měření trvajících 20 min pro nízké pH 4-5 (vyšší aktivita) až 150 min pro vyšší pH 6-9 (nižší aktivita). Odhad chyby byl získán pomocí Poissonova rozdělení. U hodnot vodivosti při pH 4, 5 a 6 jsou zobrazeny ukázkové záznamy z jednotlivých měření na planárních membránách, kde je patrné jiné chování při pH vyšším než 6 oproti nižším hodnotám pH. Všechny záznamy jsou dlouhé 50 s, filtrované na 40 kHz.

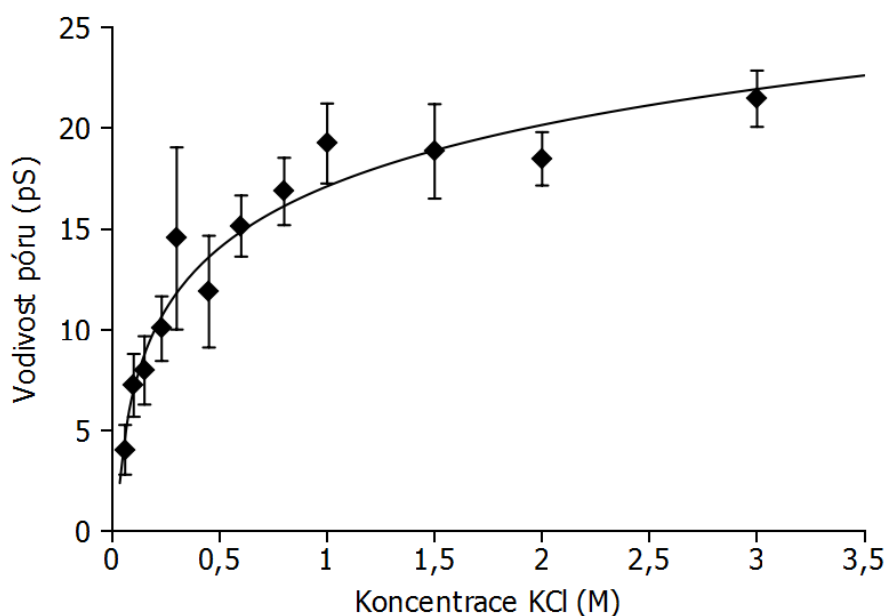
4.1.4. Význam vápenatých iontů

Kationty vápníku bývaly často běžnou součástí roztoků pro měření prováděná s koliciny. Přidávány byly zřejmě z toho důvodu, že se u nich předpokládá stabilizační efekt na membrány. Na základě studií Sobka a et al. (2006a) se zdá, že vápenaté kationty snižují aktivitu kolicinu E1 na negativně nabitých membránách (tedy snižuje se množství zabudovaných kolicinů). Předpokládá se, že Ca^{2+} se váže na negativně nabitě fosfolipidy a způsobuje změny v zakřivení membrány. Efekt Ca^{2+} na jednotlivé koliciny se liší, například kolicin A vyžaduje přítomnost Ca^{2+} v roztoku pro stabilizaci svých pórů, zatímco u kolicinu B ionty Ca^{2+} nemají vliv na stabilitu ani aktivitu pórů (Pressler et al., 1986). Z těchto důvodů jsem se rozhodla ověřit vliv vápenatých iontů na póry kolicinu U. Na základě měření na

planárních membránách (1M KCl, 10 mM HEPES, pH 6, 10 nM kolicin U, azolektin, 75mV, různá koncentrace CaCl_2) se zdá, že při nízkých koncentracích vápníku v roztoku (2 mM CaCl_2), nemají kationty vápníku žádný vliv na vodivost či stabilitu pórů, při vyšších koncentracích CaCl_2 (25 mM CaCl_2) stále není ovlivněna stabilita pórů kolicinu, nicméně vodivost pórů se snižuje téměř na polovinu.

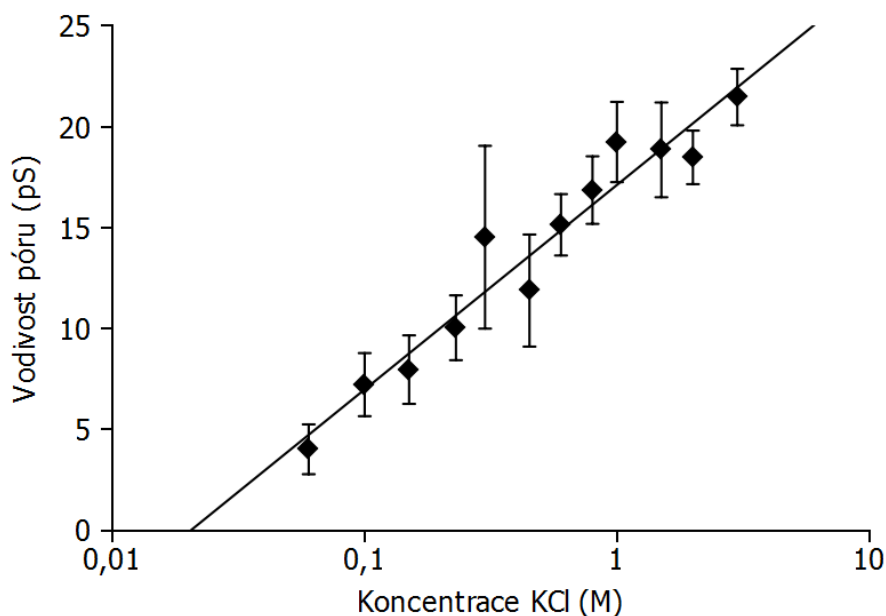
4.1.5. Vliv koncentrace roztoku

Prostřednictvím měření vodivosti pórů kolicinu U v roztoku KCl o různé koncentraci jsem se pokusila zjistit, zda se v ústí póru nebo v jeho těsném okolí nachází nějaké náboje, které by mohly způsobovat atrahování iontů v jeho okolí a také průměr sledovaného póru. Na základě získaných dat a jejich směrnice (charakteru) je možné vypočítat hodnotu náboje i průměr póru. Vyhodnocení dat bylo prováděno podle kapitoly 3.2.3. Měření bylo prováděno v roztoku o různé koncentraci KCl, vždy s 10 mM HEPES při pH 6 na membránách z azolektinu, při napětí 75 mV. Z grafů níže (Obr. 25 a 26) je patrné, že vodivost se v závislosti na zvyšující koncentraci KCl zvyšovala nelineárně. Při koncentraci roztoku vyšší než 1M se již vodivost příliš nezměnila, můžeme proto předpokládat, že při těchto vyšších koncentracích už u by mohlo docházet k saturaci póru a proto v tomto případě není možné tento model pro stanovení poloměru póru a náboje použít.



Obr. 25: Závislost vodivosti jednotlivých pórů na koncentraci chloridu draselného v roztoku. Měřeno v roztoku KCl o různých koncentracích, 10 mM HEPES, pH 6, membrány z azolektinu, 10nM

proteinu, 75 mV. Průměrná vodivost získána z minimálně 20 událostí. Směrodatná odchylka vyjadřuje variabilitu vodivostí jednotlivých pórů.



Obr. 26: Semilogaritmické vynesení vlivu koncentrace chloridu draselného v roztoku na vodivost jednotlivých pórů. Měřeno v roztoku KCl o různých koncentracích, 10 mM HEPES, pH 6, membrány z azolektinu, 10nM proteinu, 75 mV. Směrodatná odchylka vyjadřuje variabilitu vodivostí jednotlivých pórů.

4.1.6. Stanovení průměru pórů s využitím kationtů a aniontů o různých poloměrech

Vzhledem k tomu, že předešlý model nešel na náš protein použít, zvolila jsem další metodu pro zjištění průměru póru kolicinu U. Využila jsem zjednodušujícího modelu zpracovaného Renkinem (kapitola 3.2.4.). V rámci měření na planárních membránách jsem tedy pórem nechala procházet ionty o různých velikostech a sledovala jejich vliv na vodivost jednotlivých pórů. Pokud je pór dostatečně malý můžeme dokonce určit, jak velké ionty už nejsou schopny pórem projít. Nejdříve jsem se sledovala vliv různě velkých kationtů na vodivost pórů, především proto, že sledované póry jsou slabě kation selektivní. Samotný pokus probíhal obdobně jako pokus při sledování vodivostí kolicinu U při standardních podmínkách. Jediným rozdílem bylo, že byl použit 1M roztok chloridu s jinými kationty (LiCl, NaCl, CsCl atd.). Z tabulky níže (Tab. 8) je patrné, že čím větší měly kationty

hydratační poloměr, tím nižší byla vodivost pórů. Výjimku tvoří kationty Cs^+ , které i přesto, že mají poloměr podobný jako draselné či rubidné ionty, způsobují snížení vodivosti jednotlivých pórů na polovinu. Pro sledování vlivu aniontů byl pokus veden obdobně, pouze byl využit roztok draselný s anionty o různých velikostech. Z tabulky 9 je také patrné, že i se zvyšujícím se poloměrem procházejících aniontů se snižuje vodivost pórů.

Tab. 8: Souhrnná tabulka s hodnotami poloměrů hydratovaných kationtů a vodivostí pórů v 1M roztoků s příslušnými kationty. Měřeno v 1M chloridovém roztoku s příslušným kationtem, pH 6, azolektin, 75 mV. Průměrná vodivost získána z minimálně 25 událostí. Variabilita vodivosti jednotlivých pórů je vyjádřena směrodatnou odchylkou. Poloměry hydratovaných iontů byly převzaty z publikací (Trias and Benz, 1994) a (Maier et al., 1996).

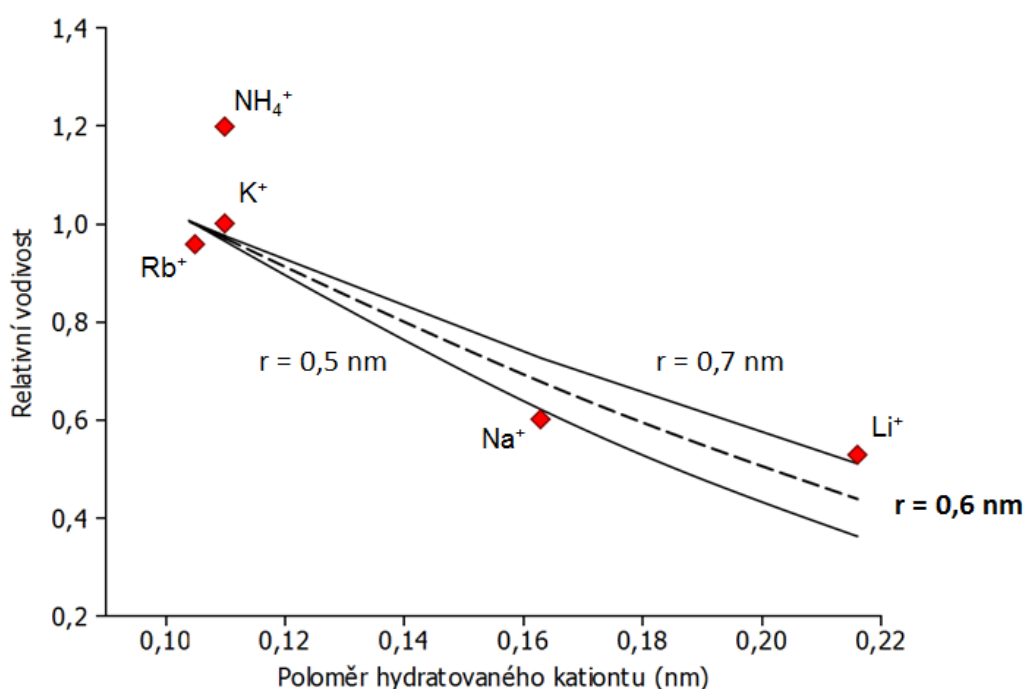
	Poloměr hydratovaného kationtu (nm)	Vodivost pórů v 1M roztoku (pS)	Směrodatná odchylka
RbCl	0,105	18,5	4,4
CsCl	0,106	10	1,2
NH₄Cl	0,111	23	7,1
KCl	0,111	19,3	2
NaCl	0,163	11,5	1,7
LiCl	0,216	10,2	1,7
N(C₂H₅)₄Cl	0,250	0 *	-
Tris-Cl	0,321	0 *	-

* V průběhu měření se neotevřely žádné póry.

Tab. 9: Souhrnná tabulka s hodnotami poloměrů hydratovaných aniontů a vodivostí pórů v 1M roztoků s příslušnými anionty. Měřeno v 1M draselném roztoku s příslušným aniontem, pH 6, azolektin, 75 mV. Průměrná vodivost získána z minimálně 25 událostí. Poloměry hydratovaných iontů byly vypočítány na základě Stokesovy rovnice (kapitola 3.2.4.) poloměr aniontu citronanu převzat z Apelblat (2014).

	Poloměr hydratovaného aniontu (nm)	Vodivost pórů v 1M roztoku (pS)	Směrodatná odchylka
KCl	0,107	19,3	2
CH₃COOK	0,202	13,7	3,4
C₆H₅K₃O₇	0,38	10,8	2,3

I přesto, že pór kolicinu U, jak je patrné z tabulek, není ovlivňován pouze jednou skupinou nabitých iontů, rozhodla jsem se aplikovat Renkinův model na získaná data (Obr 27). Vynesla jsem do grafu hodnoty poloměru kationtů a vodivost jednotlivých kanálů a tato data jsem proložila křivkou získanou výpočtem z Renkinovy rovnice (kapitola 3.2.4.). Pomocí tohoto proložení jsem získala přibližnou hodnotu poloměru póru, za předpokladu, že tyto póry jsou vodou naplněné válce a pro procházející molekuly je limitním faktorem pouze poloměr póru. Zjištěný průměr póru se pohybuje mezi 1 a 1,4 nm.

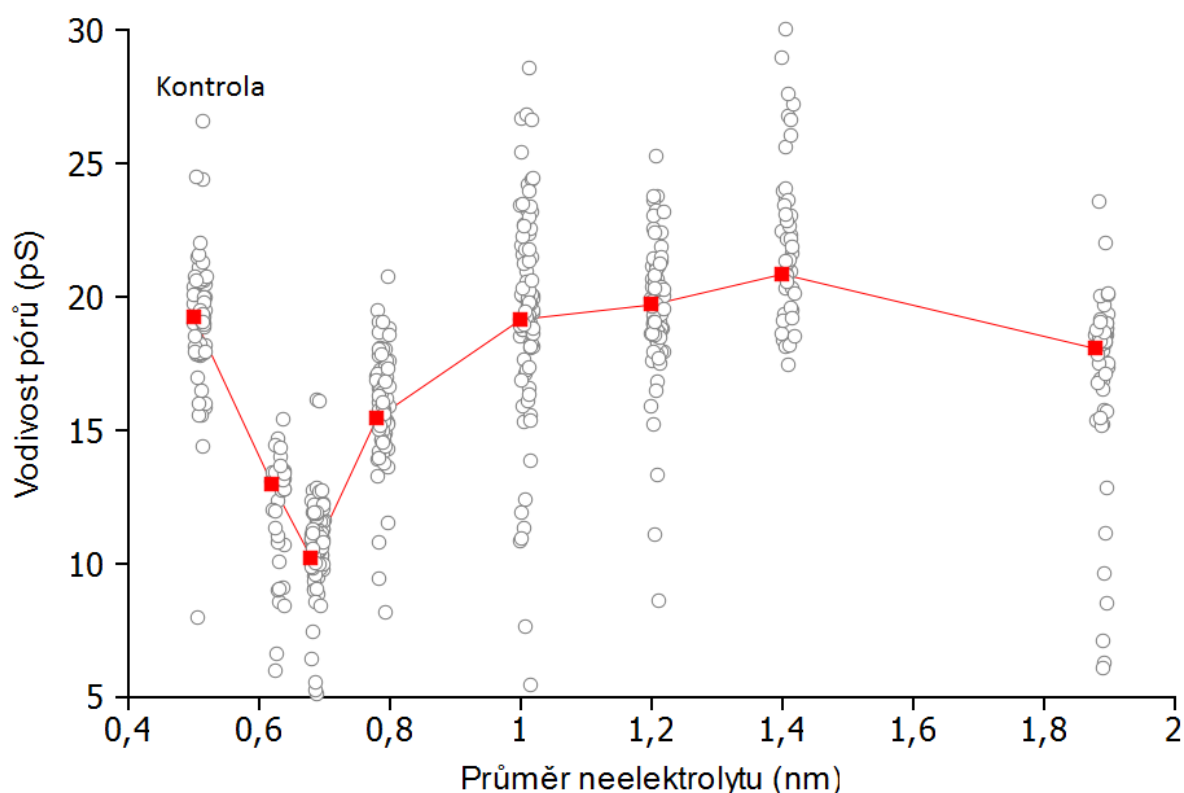


Obr. 27: Graf závislosti vodivosti pórů na zvyšujícím se poloměru procházejících kationtů. Vodivost pórů byla normalizovaná na vodivost v KCl. Hodnota r vyjadřuje hodnoty poloměrů při proložení modelových dat s daty reálnými. Měřeno v 1M chloridovém roztoku s různými kationty, 10 mM HEPES, pH 6, membrány z azolektinu, 10nM proteinu, 75 mV. Průměrná vodivost získána z minimálně 25 událostí.

4.1.7. Stanovení průměru pórů s využitím různých neelektrolytů

Vzhledem k tomu, že předešlé stanovení průměru póru je velmi nepřesné, rozhodla jsem se ověřit zjištěný průměr pomocí další metody, která vyplývá z podobného modelu, kdy pórem procházejí molekuly o různých velikostech a ovlivňují tak vodivost pórů. V tomto případě to jsou ale molekuly nevodivé, které se běžně nazývají neelektrolyty. Mezi tyto molekuly patří například glycerol, arabinóza a také molekuly polyethylenglykolu o různých

velikostech. Tyto molekuly, pokud jsou dostatečně malé pro průchod pórem, snižují jeho vodivost tím, že jím prochází a brání tak volnému průchodu iontů (zvyšuje se mikrovizkozita v kanálu). Zatímco pokud jsou molekuly neelektrolytu příliš velké, nejsou schopny pórem projít a neovlivňují tak jeho vodivost. Měření byla opět prováděna na černých lipidových membránách za standardních podmínek pouze navíc byl do roztoku přidán neelektrolyt do jeho výsledné koncentrace 20% (w/v) v roztoku, a to takovým způsobem, aby výsledný roztok obsahoval 1M KCl, 10mM HEPES a měl stále pH 6. Pro tato měření jsem zvolila molekuly již dříve využívané v podobných pracích (Bárcena-Uribarri et al., 2013; Krasilnikov et al., 1998) v rozmezí průměru molekul 0,62 – 1,88 nm (Tab. 10). Jak je z tabulky i grafu (Obr 28.) patrné při použití molekul glycerolu a arabinózy došlo ke snížení vodivosti póru téměř na polovinu, což znamená, že jsou zřejmě tyto molekuly dostatečně malé na to, aby prošly pórem a ovlivnily jeho vodivost. Zatímco molekuly maltózy a různě velkých polyethylenglykolů vodivost příliš neovlivnily. Můžeme tedy předpokládat, že jsou už příliš velké na to, aby pórem prošly. Výjimečnou se zdá molekula sorbitolu, která ovlivňuje vodivost póru jen částečně na 16 pS, tato molekula má tedy zřejmě podobnou velikost jako je průměr póru a proto jím prochází pouze velmi neochotně.



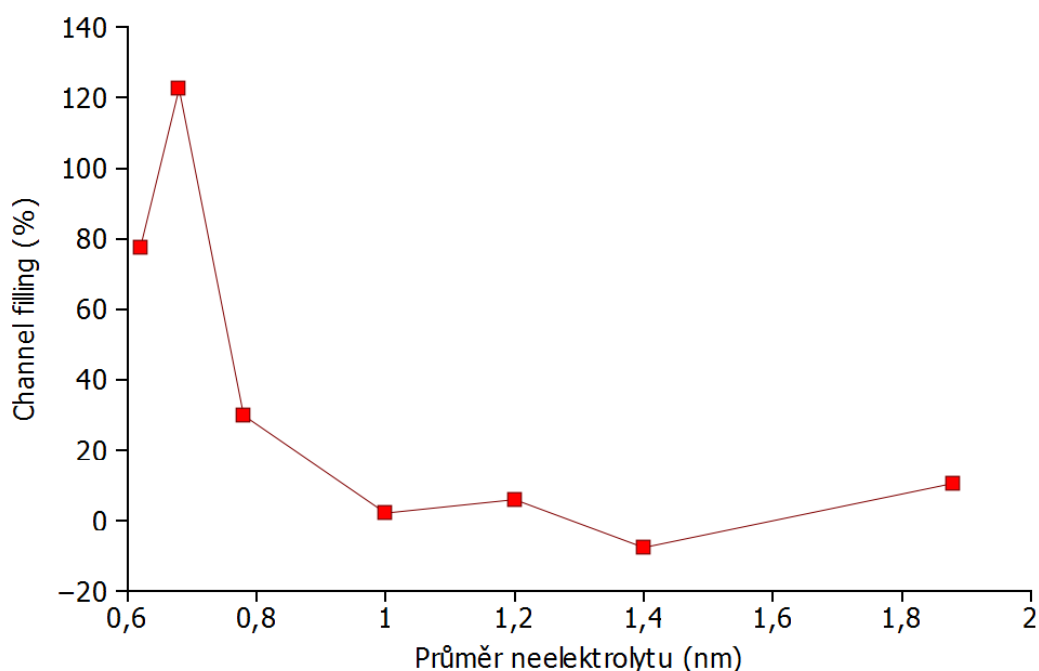
Obr. 28: Graf závislosti vodivosti pórů na průměru použitých molekul neelektrolytu. Každý nevyplněný kroužek vyjadřuje vodivost jednotlivých pórů naměřených při níže zmíněných podmínkách. Každý červený bod vyjadřuje medián z těchto vodivostí. První bod v grafu vyjadřuje vodivost pórů získanou bez přidaného neelektrolytu - kontrola. Měřeno v 1M KCl, 20% (w/v) příslušného neelektrolytu, pH 6, 10 nM kolicin U, azolektin, 75 mV.

Pro lepší a přesnější vyjádření toho, jak tyto molekuly ovlivňují vodivost pórů, se využívá speciální veličina nazvaná channel filling (tedy naplnění kanálu). Tato veličina nám podává informaci o tom, jak moc je který neelektrolyt schopen vyplnit lumen póru a na základě této informace určit nejen průměr póru, ale také jeho profil v rámci membrány. Výpočty byly prováděny na základě rovnic v kapitole 3.2.5.

Tab. 10: Kromě průměru molekul neelektrolytů a naměřených průměrných vodivostí vyjádřených i v grafu, je v tabulce zapsaná zjištěná konduktivita roztoků obsahujících příslušný neelektrolyt. Průměry molekul převzaty z Krasilnikov, (1998).

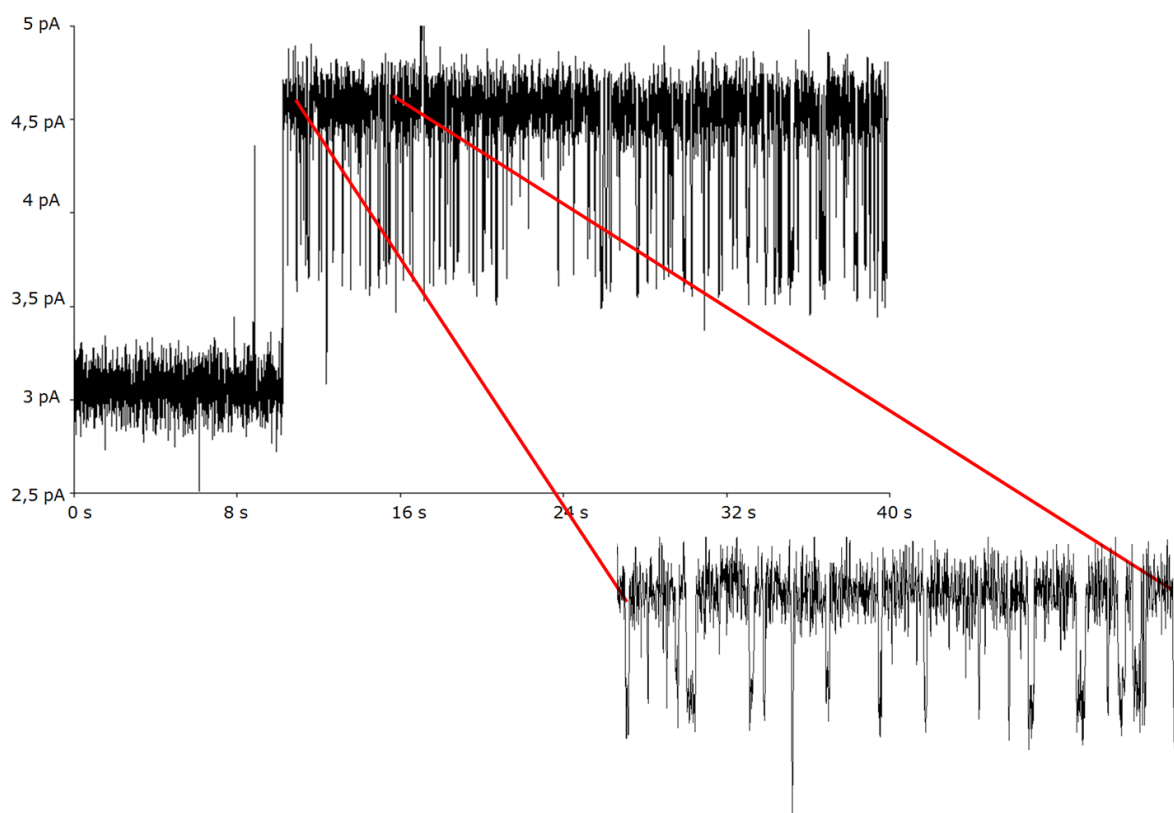
20 % (w/v) Neelektrolyt v 1M KCl	Průměr molekuly neelektrolytu (nm)	Vodivost (pS)	Konduktivita roztoků (mS/cm)
Kolicin U	0	20	102,5
Kolicin U+ glycerol	0,62	13	71,3
Kolicin U + arabinóza	0,68	10,2	71,1
Kolicin U + sorbitol	0,78	15,5	70,2
Kolicin U + maltóza	1	19,2	69,3
Kolicin U + PEG 300	1,2	19,7	56,5
Kolicin U + PEG 400	1,4	20,9	66,8
Kolicin U + PEG 1000	1,88	18	62,3

Z grafu (Obr. 29) je patrné, že molekuly maltózy a polyethylenglykolu nejsou schopny zaplnit lumen póru, zatímco molekuly glycerolu zaplnily lumen z téměř 80 %. Molekula arabinózy zaplnila lumen ze 120 % .



Obr. 29: Závislost zaplnění póru (channel filling) neelektrolytem vyjádřené v procentech na průměru molekul neelektrolytu. Zaplnění póru bylo vypočítáno na základě rovnic popsanych v kapitole 3.2.5.

Jak jsem již zmiňovala výše, velikost sorbitolu by mohla být velmi blízká poloměru póru, což je patrné z obou grafů. Dále tomu nasvědčují i občasné blokace pórů sorbitolem (Obr. 30). V tomto případě tedy dochází k blokaci pórů ze zhruba na 50 % vodivosti póru.



Obr. 30: Ukázkový záznam blokace póru kolicinu U sorbitolem a přibližný ukázkový záznam. Měřeno v 1M KCl, 10 mM HEPES, pH 6, 20% sorbitol (w/v), azolektinové membrány, 10nM proteinu, 75 mV, data filtrována na 40 Hz.

4.2. Cysteinová mutagenese kolicinu U

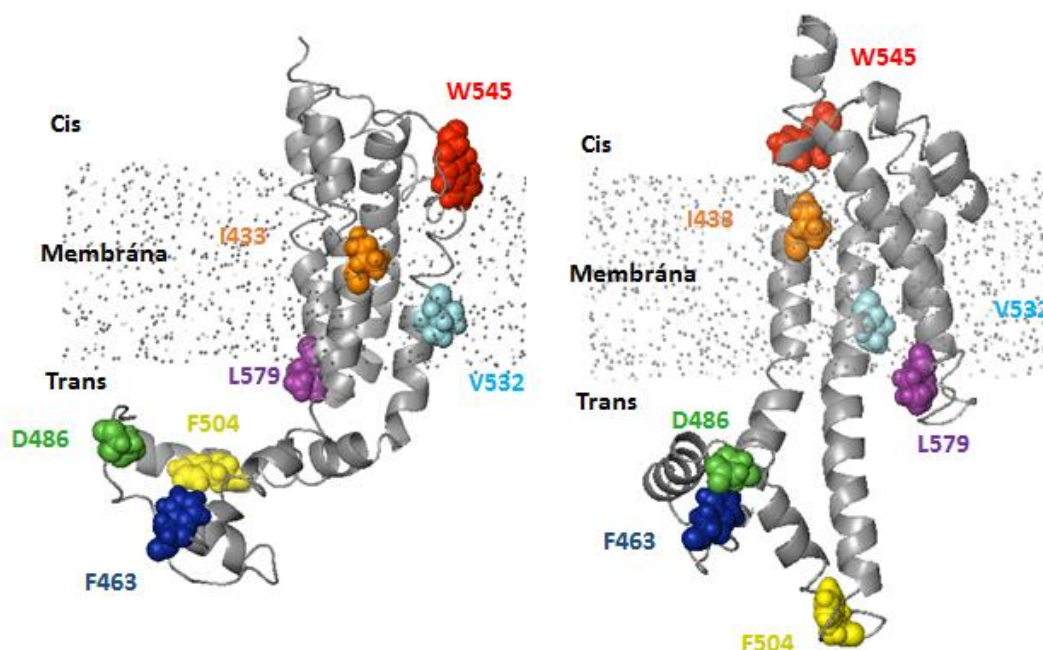
4.2.1. *Návrh pozic mutací*

Konkrétní pozice aminokyselin nahrazovaných cysteiny jsem stanovila s využitím několika predikčních programů. Snažila jsem se vkládat mutace tak abych co nejméně ovlivnila strukturu a následně i funkčnost proteinu. Proto, pokud to bylo možné, držela jsem se pravidla, vkládat mutace do nestrukturovaných částí proteinu (mezi helixy pokud to bylo možné), dále jsem se vyhnula nahrazování některých aminokyselin důležitých pro zachování struktury póru, jako jsou glycin (mohl by být klíčový pro flexibilitu některých částí proteinu) a arginin či lysin (mohly by být v určitých případech nutné pro interakci s fosfolipidy). Upřednostňovala jsem větší a hydrofobní aminokyseliny a využila jsem také alignmentů

kolicinu U s příbuznými koliciny, což mi umožnilo vybírat pro záměnu z nejméně konzervovaných aminokyselin (Obr. 31). Zvolila jsem aminokyseliny na pozicích I433, F463, D486, F504, V532, W545 a L579. Pozici I433 jsem zvolila, protože na základě predikcí programů zmíněných v metodické části (kapitola 3.3.1.) by tato aminokyselina měla být součástí α -helixu 1, který by potencionálně mohl být součástí stěny otevřeného póru. Pozice F463, D486 a F504 by se podle predikcí mohly nacházet na loopech mezi α -helixy 2-3, 3-4 a 4-5, u všech těchto helixů předpokládám, že by se při otevření póru mohly translokovat na trans stranu membrány (tedy dovnitř buňky). Pozice V532 a W545 jsou dle predikcí součástí α -helixů 6 a 7, u kterých existuje šance, že budou také součástí stěny otevřeného póru. Nakonec aminokyselina L579, která by se měla nacházet na vrcholku hydrofobní vlásenky tvořené α -helixy 8 a 9, byla vybrána, protože bych s její pomocí chtěla objasnit strukturu C-terminální domény kolicinu U v zavřeném stavu. Pozice vybraných aminokyselin byly vyznačeny také na modelu struktury póru kolicinu U v otevřeném stavu (Obr. 32)

MPGFNYGGHGDGTGWSSERGDGPAPGGGMQGNGGGHSGNNDSGSNSVSQQISAIQNDQKL
 KQKVVNMLIAARKMNPDAKMILGSIAPSGVMQVTIEGVTSTQARQLGLGGLVMGYNASGVI
 GAVGEIDTGHRLNASGASTPGSETSVDSFVNGQKPAEEWHAVAKDSWTGAGPVNTGLVNNA
 IKSVRIIKKGYVTGVLTPPEVMNKA EYKAMRQAFDSLPLAKQGEAVRQIVAAWSLAYQDFPV
 NLKKEMGRVTERIVDAINLALILNQTESRLSESQKNVDVANQIISDTVKAINDVNKKIAEKRN
 QQVSLTDLMNKKQKEVEDLKKIFKNHSYHRIRDAQREYDDARNKYALLASDINALQAQVSG
 LTARKQQA EQNKAAAEKAKADAAAKAAAEKAAAEAKAKAEAEKARKEAEE **KANDEKAV**
LTKASE **I**ISVGDKAGEYLGDKYKVL SREIADNIKN **F**QGKTIRSYDEAMASVNKL MANP
DLKINAADRDAIVNAWKA **F**DAEDMGNKFAALGKTFKAADYVMKANN **V**REKSIEGYQT
GN **W**GPLMLEIESWVLSGIAVAALSFESAIFGTFAM **L**GVFSTSLAGILAVILAGLVGALI
DDNFVDKLNNEIIRPAY

Obr. 31: Sekvence kolicinu U s barevně vyznačenými místy mutací a tučně vyznačenou pórotvornou doménou.



Obr. 32: Modely hypotetické struktury C-terminální domény kolicinu U v membráně vygenerované softwarem Rosetta membrane. Tyto dva modely byly náhodně vybrány. Vybrané nahrazované aminokyseliny byly barevně označeny a popsány. Označení Cis, Trans – vyjadřuje vnější a vnitřní strany membrány.

4.2.2. *Cílená PCR mutageneze*

Cílenou PCR mutagenezi spolu s následnou expresí a purifikací proteinu jsem prováděla na Masarykově univerzitě v Brně, v laboratoři bakteriální genetiky a genomiky vedené prof. MUDr. Davidem Šmajsem Ph.D.

Pro stanovení pozic zaměňovaných aminokyselin jsem navrhla konkrétní primery o průměrné délce 30 nt se zaměněním 1 - 3 nukleotidy ve středu sekvence, okraje primerů jsem ponechala homologní s původní aminokyselinovou sekvencí, tak aby co nejlépe dosedaly na templátovou DNA.

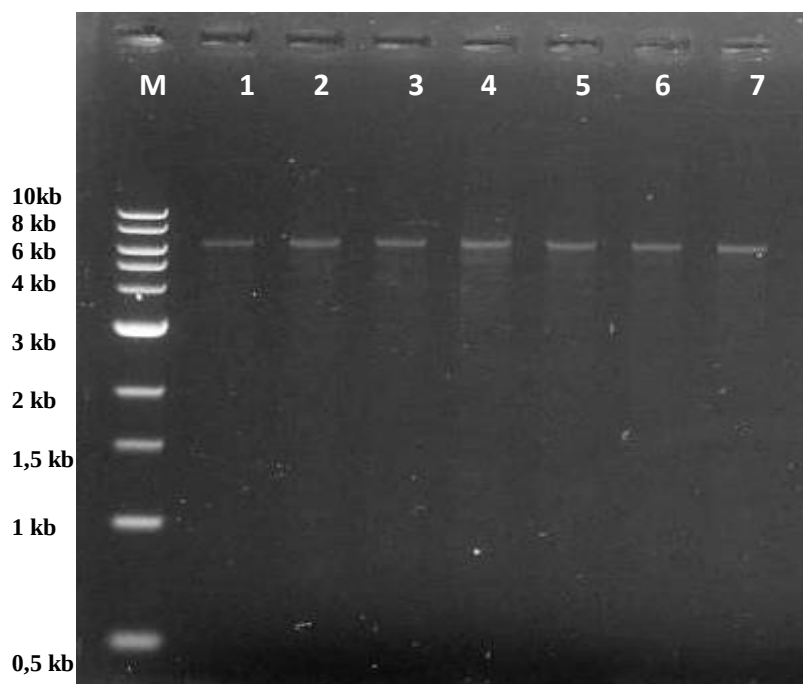
Tab. 11: Navržené primery. Sekvence jsou zapsány ve směru od 5'→3'. Červeně jsou vyznačené zaměněné nukleotidy, tučně– součást tripletu.

	Mutace		Sekvence primeru	Počet nt
1	I433C	R	CAAAAGCCAGTGAAT GT TATCATCAGTGTTG	30
		F	CAACACTGATGATA CA TTCACTGGCTTTTG	30
2	F463C	R	GATAATATCAAAA ACTG TCAGGGCAAAACG	30
		F	CGTTTTGCCCTGA CA GTTTTTGATATTATC	30
3	D486	R	GATGGCTAATCCT GT TCTTAAAATTAATG	29
		F	CATTAATTTTAAGA CA AGGATTAGCCATC	29
4	F504C	R	GAAAGCAT GT GATGCAGAGG	20
		F	CCTCTGCATCA CA TGCTTTC	20
5	V532C	R	GAAGGCAAACA ACTG CCGGGAGAAGAGTATC	31
		F	GATACTCTTCTCCCG GCA GTTGTTTGCCTTC	31
6	W545C	R	CAGACCGGAA ACTG CGGGCCGCTGATGC	28
		F	GCATCAGCGGCC CGCA GTTTCCGGTCTG	28
7	L579C	R	GTACTTTTGCTATG TGCG GTGTTTTTCG	29
		F	CGAAAAAACAC CGCA CATAGCAAAAGTAC	29

Cílenou PCR mutagenezi jsem provedla pomocí templátového plazmidu pDS1066 obsahujícího vložený gen pro kolicin U stejně tak, jako pro jeho imunitní protein. V neposlední řadě také obsahuje gen araC, který umožňuje regulovat expresi kolicinu tak, že za nepřítomnosti L-arabinózy v roztoku vytváří araC proteiny, dimery vázající se na speciální místa v rámci araC oblasti a brání tak expresi zbytku plazmidu, zatímco v přítomnosti L-arabinózy dochází k aktivaci exprese.

Celý plazmid byl vytvořen z vektoru pBAD HisB (http://people.virginia.edu/~sf3bb/pbad_man.pdf), obsahuje tedy mimo jiné také gen pro histidinovou kotvu. PCR mutageneze probíhala pomocí polymerázy Pfu Turbo, která amplifikovala celý templátový plazmid. Připravené PCR směsi se lišily pouze různými primery, které měly homologní okrajové části, což zajistilo snadné nasedání na templátovou DNA. Původní templátový plazmid jsem následně odstranila přidáním enzymu Dpn1 do směsi. Tento enzym rozpoznává methylovanou DNA a degraduje ji. Následně jsem si pomocí gelové elektroforézy ověřila přítomnost fragmentů o přibližné velikosti 6,5 kbp, které

odpovídají velikosti amplifikovaných plazmidů (Obr. 33). I přes nízkou stringencitu způsobenou zvolenou relativně nízkou teplotou (37°C) při nasedání primerů, bylo všech 7 mutovaných plazmidů amplifikováno v dostatečném množství, což jsem si ověřila pomocí spektrofotometru ND-1000 a příslušného softwaru NanoDrop 3.0.1.



Obr. 33: Agarózový gel s amplifikovanými fragmenty plazmidu pDS1066.

M. DNA Marker 1 kbp

1. PCR směs s primery I433C

2. PCR směs s primery F463C

3. PCR směs s primery D486C

4. PCR směs s primery F504C

5. PCR směs s primery V532C

6. PCR směs s primery W545C

7. PCR směs s primery L579C

8. PCR směs s primery 7

Vzniklé plazmidové fragmenty jsem transformovala do předem připravených kompetentních buněk *E.coli* DH10B. Následně jsem náhodně vybrala vždy dva klony od každé mutace. Z vytvořených bakteriálních kultur jsem izolovala plazmidovou DNA. Stanovila jsem její koncentraci a čistotu, a pokud byla v dostatečném množství (≥ 30 ng/ μ l), poslala jsem ji na osekvenování (GATC Biotech). Po provedeném osekvenování jsem zkontrolovala, zda v konkrétním klonu došlo k záměně konkrétní aminokyseliny za cystein a také, zda nevznikla nežádoucí mutace v jiném místě sekvence. Pokud nebyly splněny tyto podmínky, vybrala jsem další z transformovaných klonů a opět jsem je poslala na osekvenování, dokud jsem od každé mutace nezískala jeden klon s vloženou mutací a jinak nezměněnou sekvencí. Z těchto vybraných a zkontrolovaných bakteriálních klonů jsem opět izolovala plazmidovou DNA a transformovala jsem ji do připravených chemokompetentních buněk *E.coli* TOP10F'. Takto transformované kmeny jsem již mohla použít pro následnou produkci a purifikaci mutovaných proteinů.

4.2.3. *Ověření produkce funkčních variant kolicinu U*

Ještě před purifikací mutovaných proteinů jsem se rozhodla zjistit, zda jsou produkční kmeny po indukci arabinózou schopny inhibovat růst citlivých bakterií. Provedla jsem tedy stanovení citlivosti kmene *E. coli* 5K k produkčnímu kmeni *E. coli* TOP10F'. Toto stanovení jsem prováděla vpichem jednotlivých kmenů *E. coli* TOP10F' produkujících kolicin do agarové plotny s přidanou arabinózou, která by měla indukovat produkci kolicinů. Po noční inkubaci byly narostlé bakterie zabity vystavením parám chloroformu a následně převrstveny soft agarem obsahujícím citlivý kmen *E. coli* 5K, po dvanáctihodinové inkubaci byly odečteny výsledky. Zóny vzniklé v okolí produkčních kmenů měly velmi nepravidelný tvar, i přesto z nich ale bylo možné stanovit, zda produkční kmen vytváří zóny, a tudíž produkuje funkční toxický protein nebo ne (Příloha 3).

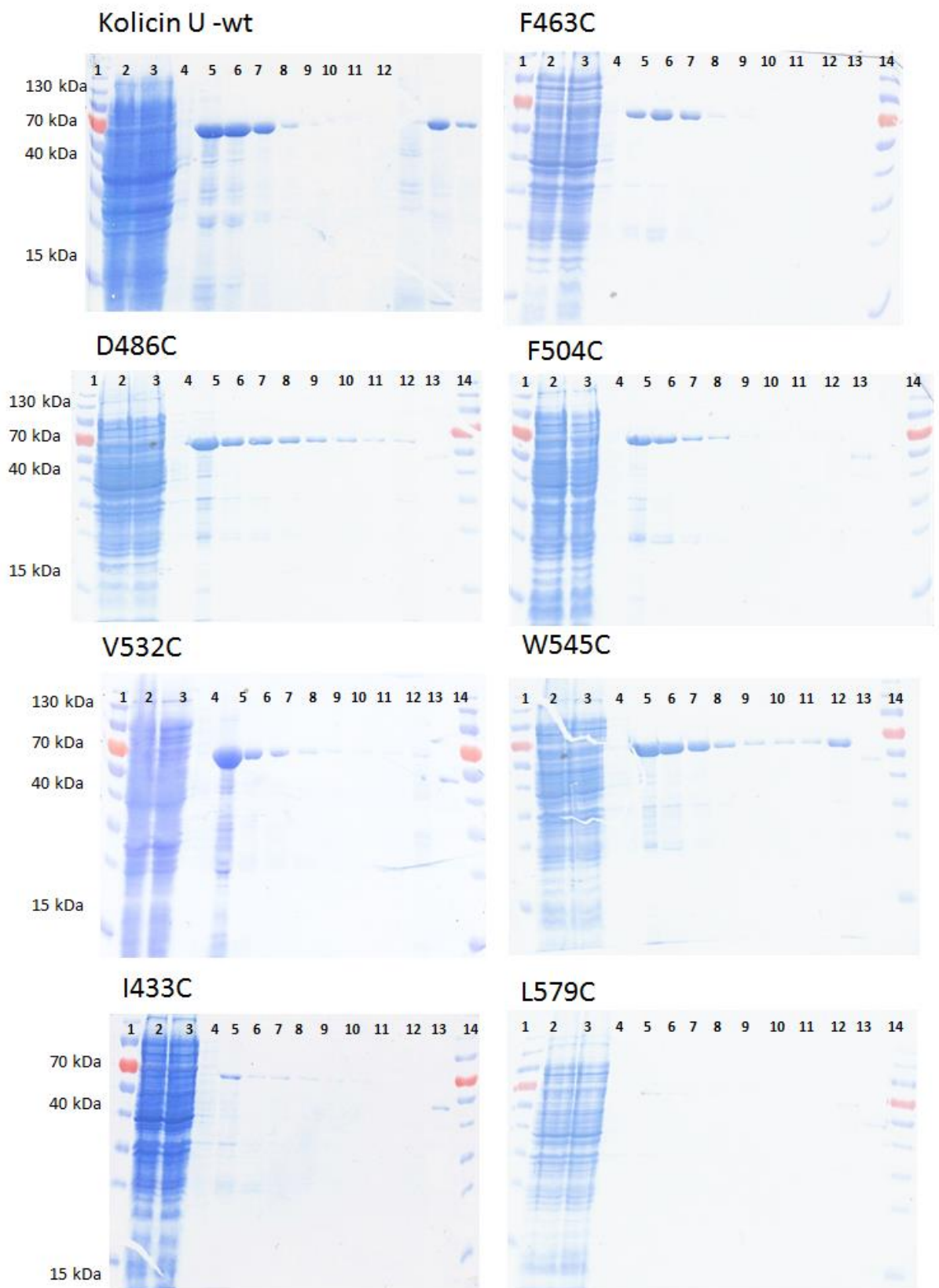
4.2.4. *Produkce a purifikace kolicinu U a jeho mutantních variant*

4.2.4.1. *Purifikace proteinu na NiNTA agaróze*

Exprese kolicinu U a jeho mutovaných variant byla indukována L-arabinózou. Produkované proteiny poté byly vázány na speciální NiNTA agarózové kuličky pomocí hexahistidinové kotvy, která byla součástí vyprodukovaných proteinů. Nakonec byly vázané proteiny vyvazovány pomocí pufru s přidaným imidazolem.

Nejdříve jsem vyzkoušela produkci proteinu v malém objemu, abych si ověřila, že dále není třeba tuto metodu optimalizovat a že došlo k nadprodukci sledovaného proteinu a že se podařila i celá produkce a purifikace proteinu. Následně jsem přešla k velkoobjemové produkci kolicinu U a jeho mutovaných variant (viz kapitola 3.3.9.2.).

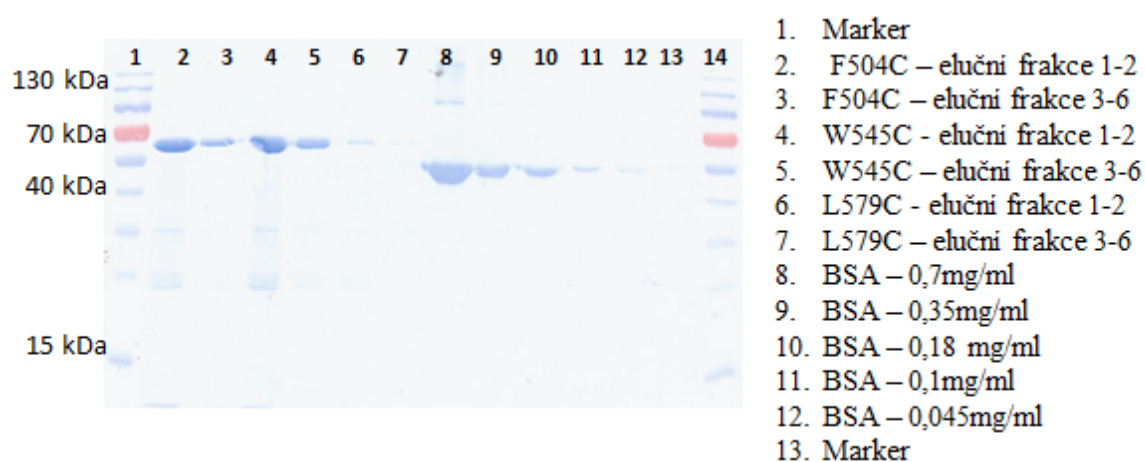
Tímto způsobem jsem provedla produkci wt kolicinu U a jeho 7 mutovaných variant (I433C, F436C, D468C, F504C, V532C, W545C, L579C). I přesto, že jsem prováděla všech 8 purifikací stejně, pouze 5 ze 7 mutantních proteinů se podařilo získat v dostatečném množství, jak je patrné z obrázků xy, které byly získány provedeným SDS-PAGE a následného přebílení na speciální nitrocelulózové membrány, které byly následně obarveny barvou Naphtol Blue Black (Obr. 34-41).



1. **Marker** (Page Ruler prestained protein ladder, 10 – 180 kDa)
2. **Lyzát** – obsahující produkovaný kolicin
3. **Flow through** - frakce prokapaná po vazbě kolicinu na kuličky
4. **Wash** - frakce získaná po promytí kuliček promývacím (Wash) pufrem
5. **Kuličky před elucí** – kuličky odebrané před elucí prvním elučním pufrem
6. **1. Eluční frakce** – promyta elučním pufrem s 0,25M imidazolem
7. **2. Eluční frakce** - promyta elučním pufrem s 0,25M imidazolem
8. **3. Eluční frakce** - promyta elučním pufrem s 0,5M imidazolem
9. **4. Eluční frakce** - promyta elučním pufrem s 0,5M imidazolem
10. **5. Eluční frakce** - promyta elučním pufrem s 1M imidazolem
11. **6. Eluční frakce** - promyta elučním pufrem s 1M imidazolem
12. **Kuličky po eluci** - kuličky odebrané po eluci elučními pufry
13. **Pozitivní kontrola** – kolicin Fy o známé molekulární hmotnosti i koncentraci
14. **Marker**

Obr. 34 – 41: Výsledky izolace a první fáze purifikace kolicinu U a jeho mutantních variant. Provedena SDS-PAGE, přebílotovaná na nitrocelulozovou membránu a obarvena pomocí Naphtol Blue Black. Jednotlivé frakce izolace vyjmenovány výše.

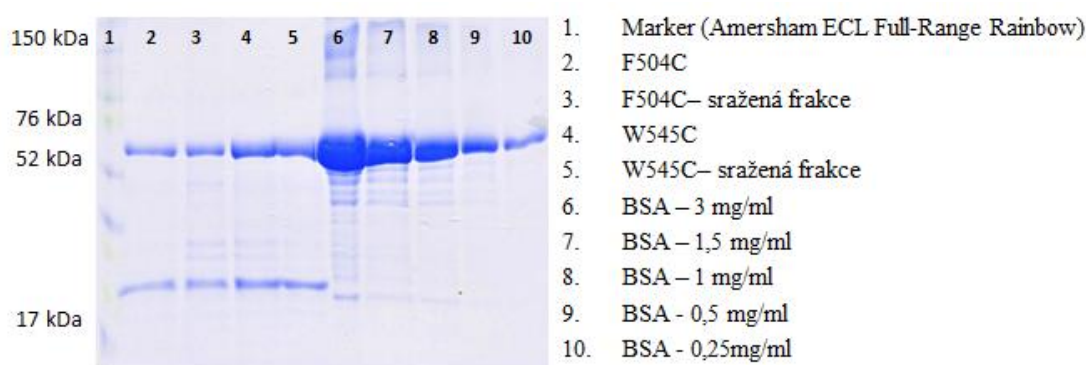
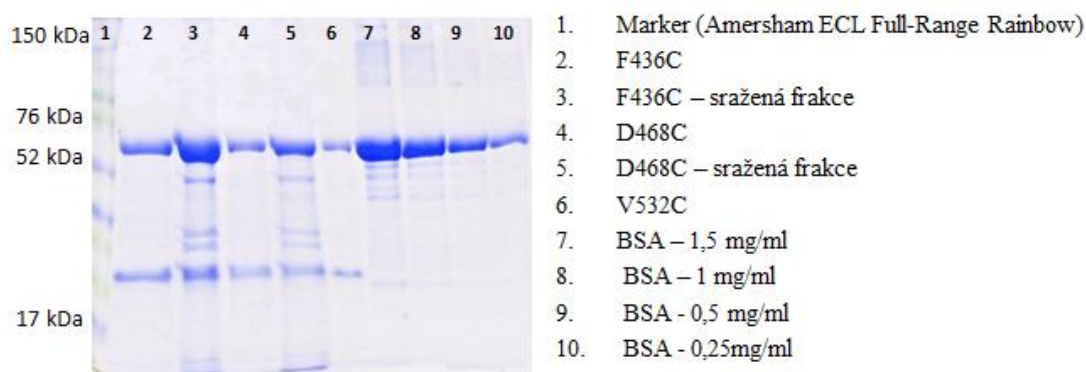
Přibližnou koncentraci výsledných elučních frakcí jsem odhadla z gelu porovnáním s koncentrační řadou proteinu BSA. Jak je patrné z výsledných gelů (Obr. 42 a 43), koncentrace proteinů v první eluční frakci se u podařených purifikací pohybovala okolo 0,35mg/ml, zatímco druhá eluční frakce u většiny proteinů měla koncentraci okolo 0,18 mg/ml. U nepodařených purifikací mutanty I433C a L579C byla přibližná koncentrace 0,045 mg/ml. Na gelech není zastoupena mutanta V532C ani purifikovaný wt kolicinu U, koncentrace těchto dvou proteinů byly stanoveny separátně, ale obdobným způsobem i s podobným výsledkem.



Obr. 42 a 43: Předběžné stanovení koncentrace proteinu porovnáním s koncentrační řadou proteinu BSA. Provedena SDS-PAGE, přebílená na nitrocelulózovou membránu a obarvena pomocí Naphtol Blue Black.

4.2.4.2. *Dialýza a zakoncentrování proteinů*

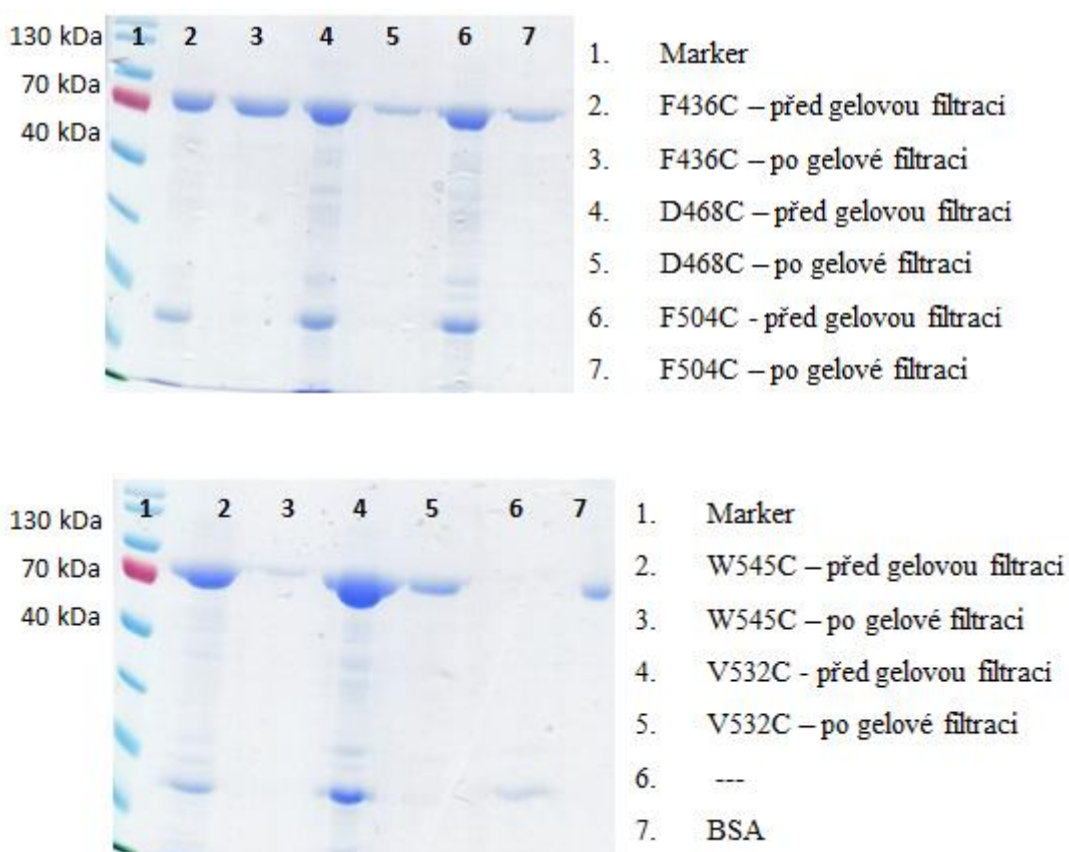
V další fázi jsem provedla dialýzu a zakoncentrování získaných frakcí. Oba tyto kroky jsem provedla zároveň pomocí Amicon stirred ultrafiltration cell (Millipore), metodou diafiltrace. Tato metoda umožňuje přefiltrováním relativně velkých objemů roztoků přes speciální membránu, která nepropustí konkrétní proteiny, takže dochází k zakoncentrování proteinu i dialýze roztoku zároveň. Původní koncentrace imidazolu byla zředěna 300×. V tomto kroku ovšem došlo ke sražení a ztrátě značného množství proteinu (Obr. 44 a 45).



Obr. 44 a 45: Výsledná koncentrace proteinu po zakoncentrování a dialýze. Patrné snížení výsledné koncentrace proteinu v roztoku kvůli značné části degradace proteinu. Provedena SDS-PAGE, obarvena pomocí Commassie Brilliant Blue.

4.2.4.3. *Purifikace gelovou filtrací na koloně Superdex 75*

Následně jsem přistoupila k dalšímu purifikačnímu kroku, gelové permeační chromatografii, kterou jsem provedla v laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů na AV ČR. Používala jsem soustavu *AKTA Purifier* (GE Healthcare, USA) FPLC (Fast protein liquid chromatography) a kolonu Superdex 75 10/300 GL. Z provedené gelové elektroforézy je patrné, že došlo k velkému vyředění proteinu během tohoto purifikačního kroku, v případě mutovaného proteinu V532C zřejmě i ztrátě proteinu (Obr. 46).



Obr. 46: SDS-PAGE provedená po gelová filtraci, kdy je patrná ztráta nebo vyředění proteinu z roztoku. Obarvena Commassie Brilliant Blue.

4.2.4.4. *Zakoncentrování proteinů na podobnou výslednou koncentraci*

Vzhledem k nízké a rozdílné koncentraci purifikovaných proteinů jsem se rozhodla je více zakoncentrovat. K tomu byl použit vakuový koncentrátor SpeedVac Savant. Vzorky jsem zakoncentrovala na podobnou koncentraci, což jsem si ověřila pomocí stanovení koncentrace denzitometrií. Před zvolením této metody jsem použila jiné běžnější a přesnější metody stanovení koncentrace proteinů jako je spektrofotometrické stanovení při 280 nm, nebo stanovení pomocí NanoDrop. Ale vzhledem ke stále příliš nízké koncentraci proteinů nebylo možné tyto metody použít a proto jsem dále zvolila denzitometrickou analýzu proteinů z SDS-PAGE.

4.2.4.5. *Stanovení koncentrace proteinů pomocí denzitometrie*

Provedla jsem stanovení koncentrace proteinu denzitometrií podle návodu (kapitola 3.3.15.). Výsledná koncentrace jednotlivých proteinů se pohybovala od 50 do 130 ug/ml (tab.

12). I přesto, že výsledná koncentrace proteinů je nízká, byla dostačující pro další charakterizaci mutovaných variant kolicinu U.

Tab. 12: Vypočítaná výsledná koncentrace proteinů prostřednictvím denzitometrie bandů z SDS-PAGE.

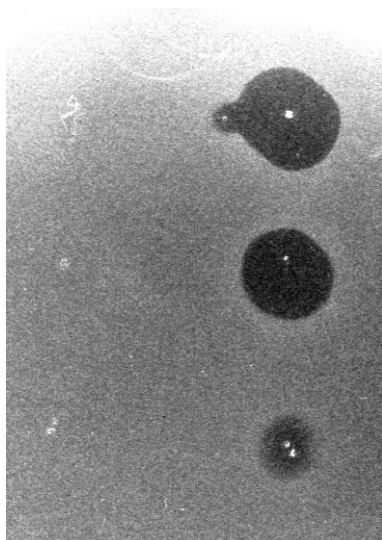
	Integrovaná denzita	%	Vypočítaná koncentrace mg/ml
BSA (0,1)	6550,00	100,00	0,10
BSA (0,05)	3886,10	59,33	0,06
F436C	8719,42	133,12	0,13
D468C	5040,81	76,96	0,08
F504C	5008,71	76,47	0,08
V532C	3130,64	47,80	0,05
W545C	8025,30	122,52	0,12
Wt	4182,05	63,85	0,06

4.2.5. *Kontrola funkčnosti mutovaných proteinů*

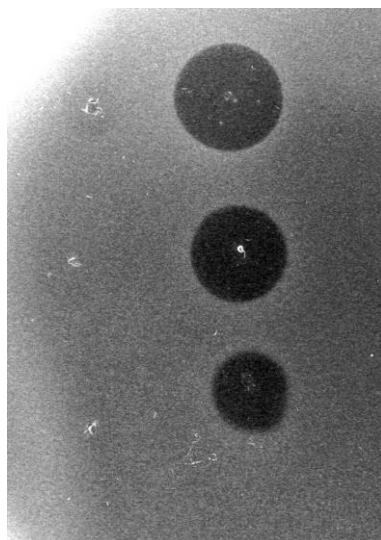
4.2.5.1. *Test citlivosti kmene E.coli 5K ke kolicinu U a jeho mutacím*

V dalších krocích jsem se pokusila ověřit funkčnost mutovaných proteinů prostřednictvím in vivo (test citlivosti kmene *E. coli* 5K ke kolicinu U) i in vitro metody (BLM). Nejdříve jsem ověřovala, zda jsou vyprodukované a koncentrované mutantní proteiny schopny zabít buňky citlivého kmene bakterií. Což jsem ověřovala kapkovou metodou, kdy jsem 3 ul proteinu nakapala na citlivý kmen bakterií (kmen *E. coli* 5K) na agarové plotně a odečetla zóny vzniklé po 24 hodinách působení při 37°C. Výsledky jsou patrné jak z obrázků (Obr. 47.) tak i z tabulky (Tab. 13).

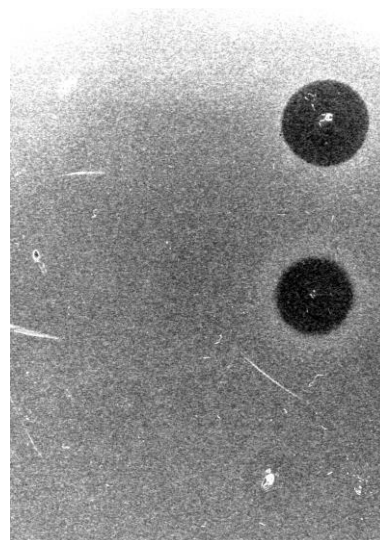
Účinnost jednotlivých mutantních variant proteinů byla vyjádřena koncentrací kolicinu potřebnou pro vytvoření zóny o konkrétní ploše. Na základě hodnot vypočítané plochy zón vytvořených jednotlivými koliciny jsem stanovovala koncentraci kolicinu potřebnou pro vytvoření inhibiční zóny o určité ploše. Tuto hodnotu jsem získala vynesemím stanovených hodnot ploch zón a koncentrace kolicinu do grafu (Obr. 48) Tato data jsem proložila logaritmickou křivkou a v místě protnutí konkrétní vybrané plochy a logaritmické křivky jsem stanovila koncentraci kolicinu potřebnou pro vytvoření zóny o konkrétní ploše (stupeň účinnosti).



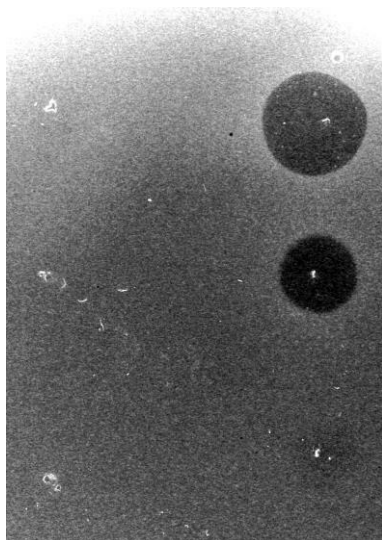
WT



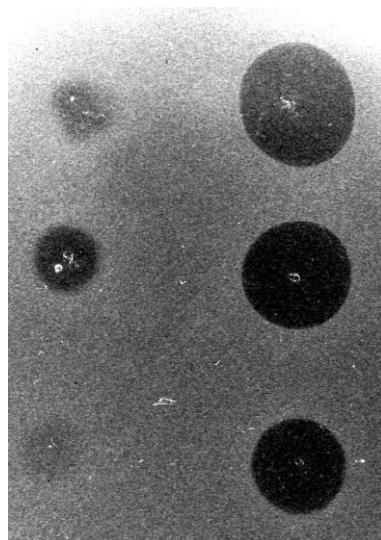
F463C



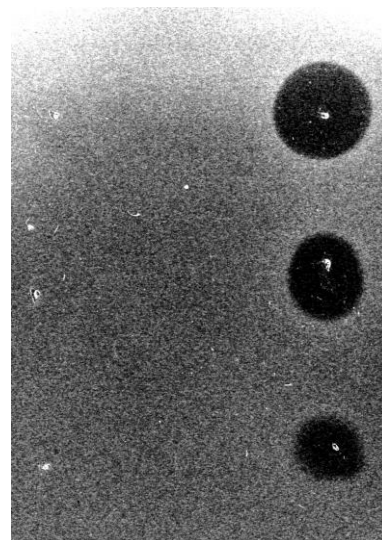
D486C



F504C

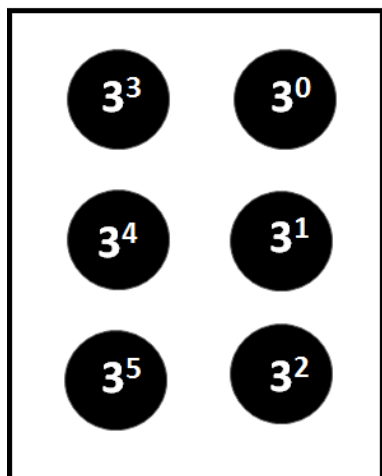


V532C

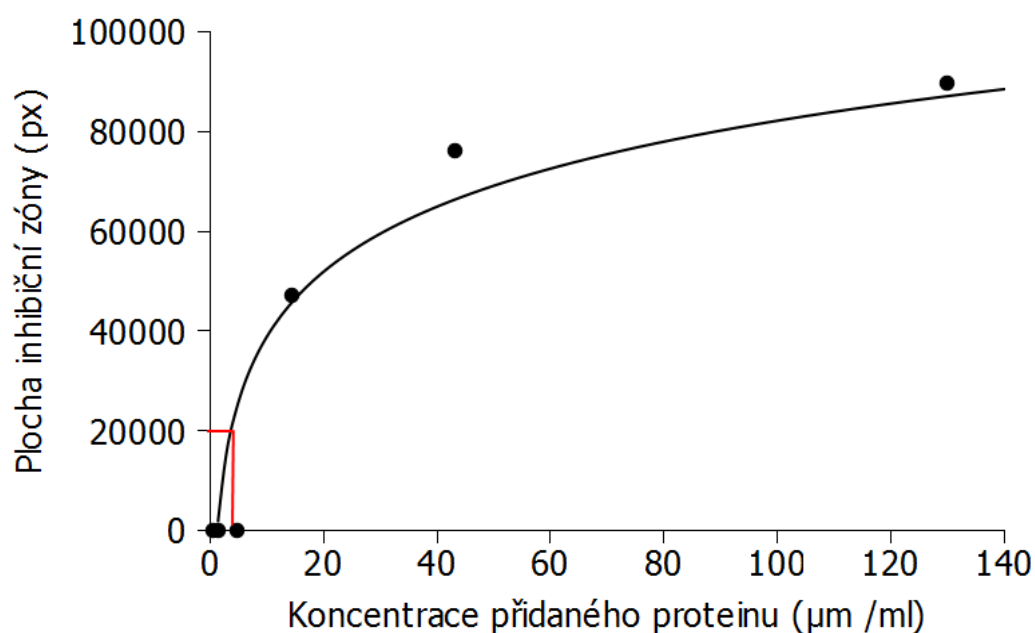


W545C

Schéma ředění



Obr. 47: Inhibiční zóny po titraci kolicinu a jeho mutantních variant u bakteriálního kmene *E. coli* 5K. Titrace provedena trojkovým ředěním. Schéma ředění odpovídající všem pokusům je zobrazeno pod obrázky.



Obr. 48: Ukázkový graf pro výpočet koncentrace potřebné pro vytvoření konkrétní plochy inhibiční zóny. Červeně vyznačena hledaná koncentrace pro vybranou plochu.

Tab. 13: Zjištěná koncentrace kolicinu potřebná pro vytvoření inhibiční zóny. Plocha inhibiční zóny pro počítanou koncentraci byla 87 mm² (20000 px²).

Varianta kolicinu	Koncentrace kolicinu na konkrétní plochu zóny (µg/ml)	Pořadí účinnosti jednotlivých proteinů
F463C	3,5	5
D486C	3	3
F504C	0,9	1
V532C	3,1	2
W545C	4	5
Kolicin U – wild type	5	6

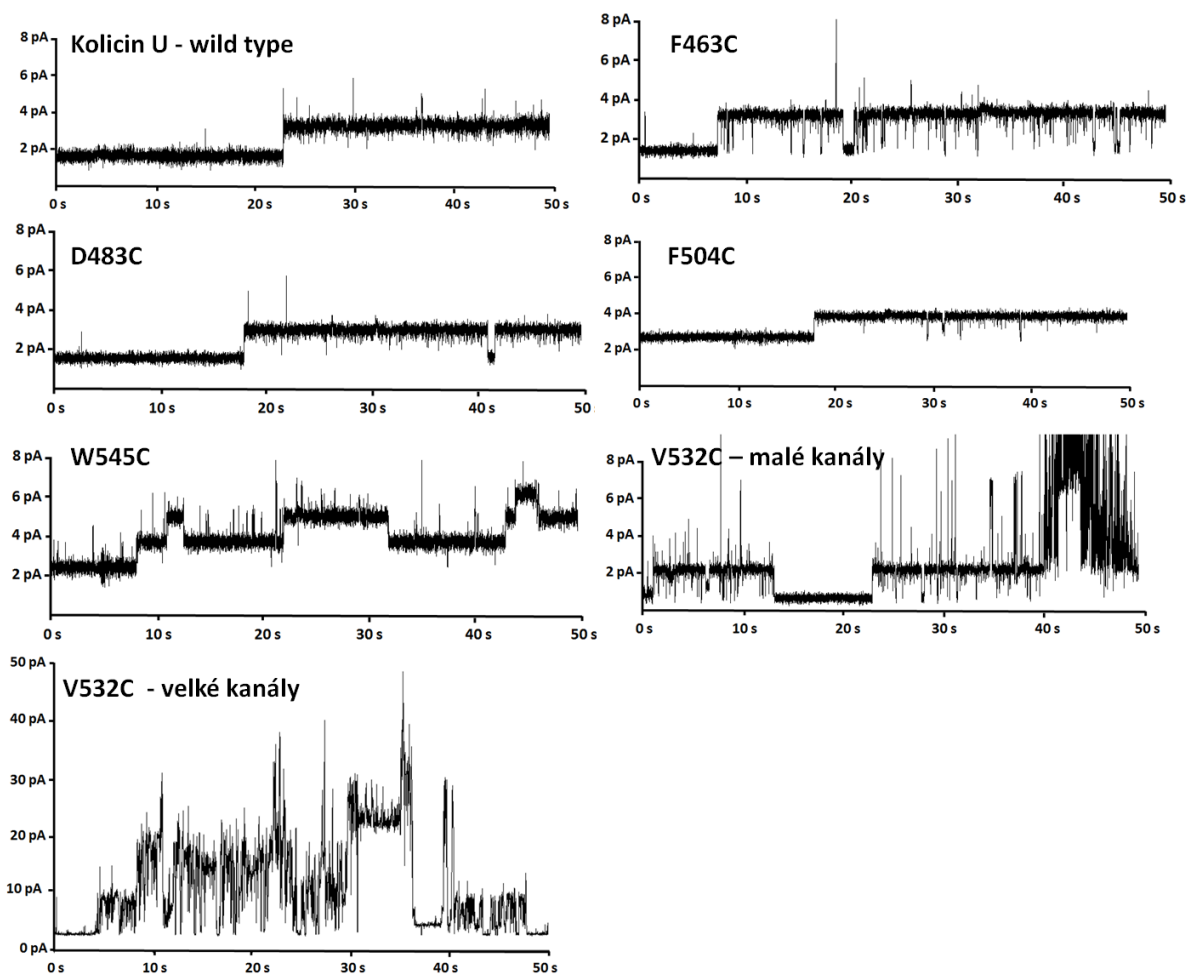
4.2.5.2. *BLM charakteristika mutovaných proteinů a jejich odlišnosti*

V další fázi jsem ověřovala funkčnost mutovaných proteinů a jejich fenotyp na planárních membránách. Měření jsem prováděla za standardních podmínek, tedy v 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6, membrány z azolektinu s přidaným proteinem ve finální koncentraci 10nM. Na obrázcích níže (Obr. 49) jsou ukázkové záznamy z měření s jednotlivými mutantními proteiny. Jak je z těchto obrázků patrné, některé mutované formy mají odlišný

fenotyp. Například póry s mutací F463C mnohem častěji fluktuují mezi zavřeným a otevřeným stavem. Mutantní kolicin W545C vytváří póry o dvou typech vodivosti a mutantní kolicin V532C má dokonce zcela jiný fenotyp, kdy vytváří na rozdíl od stabilních a uniformních pórů, póry o různých vodivostech od 4 pS po 250 pS (Obr. 49). Tyto vlastnosti jsou shrnuty v tabulce (Tab. 14).

Tab. 14: Shrnutí vlastností jednotlivých mutantních variant získané při měření na černých lipidových membránách při standardních podmínkách – 1M KCl, 10mM HEPES, pH 6, azolektin, 10mM koncentrace příslušné varianty proteinu, 75 mV. Vodivost vypočítaná z minimálně 30 událostí.

	Vodivost (pS)	Směrodatná odchylka vodivosti	Aktivita (# otevření/min)
Kolicin U - wt	19	3,8	2,58
F463C	19,8	2,2	0,35
D486C	15,5	2,3	0,2
F504C	16	1,5	0,29
V532C	4 - 250	-	-
W545C	9,5 / 17,2	4,4 / 2,8	0,18



Obr. 49: Ukázkové záznamy měření na planárních membránách při standardních podmínkách – 1M KCl, 10 mM HEPES, pH 6, azolektin, 80mV, vždy s 10nM koncentrací příslušného mutantního proteinu či wt kolicinu U.

5 DISKUZE

Koliciny se vědci zabývají již od počátku 20. století, kdy byly objeveny. Z počátku byly zkoumány jejich vlastnosti v rámci základního výzkumu. V pozdějších letech se výzkum přesunul, k využití kolicinů především kvůli jejich specifické interakci s různými receptory vnější membrány (OmpF, BtuB a další) a proteinovými komplexy v periplazmě (TonB systém, Tol-Pal systém). Nicméně v dnešní době, kdy přibývá množství multirezistentních bakteriálních kmenů se nad nimi čím dál tím více uvažuje i jako o alternativě antibiotik. K tomu ale nemůže dojít bez důkladného prozkoumání kolicinů, především pak mechanismu jejich účinku. Z toho důvodu jsem se v rámci své diplomové práce zaměřila na prozkoumání mechanismu účinku kolicinu U, který je typickým zástupcem pórtvorných kolicinů ze skupiny A, a který budu porovnávat s ostatními pórtvornými koliciny.

Vytyčila jsem si dva hlavní cíle. Prvním cílem bylo podrobně charakterizovat vlastnosti pórů tvořených C-terminální doménou kolicinu U měřením na planárních membránách. Druhým cílem bylo vyprodukovat několik variant kolicinu U s mutacemi vloženými na konkrétních pozicích důležitých pro strukturu póru, tak aby bylo možné je dále využít pro stanovení membránové topologie pórů kolicinu U.

Pro většinu svých pokusů jsem zvolila metodu elektrofyziologických měření na černých lipidových membránách. Tato metoda nám umožňuje změřit elektrické vlastnosti jednotlivých pórů kolicinu U (přechody různých iontů těmito póry) a tyto vlastnosti dále porovnat s póry jiných kolicinů. Její výhodou je možnost zkoumat vlastnosti na jednotlivých molekulách a sledovat tak přímo jejich kinetické parametry, odhalovat někdy i málo vzácné stavy a konformace, apod. Nevýhodou této metody je, že v mnoha případech jsou podobné pokusy prováděny za třeba i jen mírně odlišných podmínek (pH, membránové složení, apod.), které mohou ale vézt ke zcela jiným výsledkům. Navíc je to metoda *in vitro*, je tedy v některých případech těžké získané poznatky zobecňovat nebo je považovat za fyziologicky relevantní.

V rámci prvního cíle jsem si stanovila standardní podmínky, při jejichž použití jsem dosahovala dostatečné aktivity kolicinu a kdy byla získaná vodivost dobře sledovatelná. Zjistila jsem, že v těchto podmínkách jsou póry kolicinu U velmi stabilní a uniformní (19 pS), což odpovídá například pórům tvořeným kolicinem B, který je sekvenčně velmi blízký kolicinu U. Naopak to neodpovídá chování pórů dalšího blízkce příbuzného kolicinu A, který vytvářel stabilní póry pouze za přítomnosti kationtů Ca^{2+} v roztoku (Pressler et al., 1986), nicméně tyto pokusy s kolicinem A a B byly prováděny na membránách ze syntetických lipidů (DPhPS:DPhPC-1:4) ne z azolektinu, proto je těžké tyto výsledky porovnávat.

Vodivost pórů, ochota těchto kolicinů se zabudovávat do membrány a otevírat se, může být ovlivňována mnoha proměnnými, jako je složení membrány (její náboj, tloušťka, atd.), pH roztoku, napětí vkládané na membránu, přítomnost různých iontů a koncentrace iontů v roztoku, v in vivo podmínkách pak především přítomnost receptorů na vnější bakteriální membráně, atd. Proto jsem se rozhodla určit vliv některých těchto proměnných na chování pórů tvořených kolicinem U v několika krocích.

Vliv lipidového složení na vlastnosti pórů kolicinu U

V prvním kroku jsem sledovala vliv lipidového složení membrány na vodivost pórů a aktivitu zabudovávání kolicinu U do membrány. V rámci studia kolicinů bývají standardně používány azolektinové lipidy anebo různé definované směsi syntetických lipidů. Z výzkumů prováděných na membránách z různých syntetických směsí je patrné, že složení membrány může mít veliký vliv na chování pórů kolicinů. Například u kolicinu E1 Sobko et al. (2006b) sledovali vliv tloušťky, zakřivení a náboje membrány na vodivost a dobu otevření pórů. Používali syntetické lipidy a zjistili, že při větších tloušťkách membrány kolicin E1 vytvářel dva typy pórů o vodivostech 60 a 600 pS, při ztenčení membrány použitím jiného rozpouštědla nebo použitím kratších fosfolipidů kolicin E1 vytváří póry pouze o vodivosti 60 pS. Dále také zjistili, že při použití negativně nabitých fosfolipidů (DPhPG) se snižuje vodivost pórů.

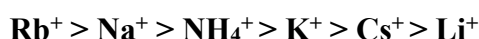
Vzhledem k tomu, že použití azolektinových membrán ze sóji vůbec neodpovídá složením bakteriálním membránám, provedla jsem kontrolní pokusy na membránách vytvořených z extraktu lipidů bakterie *E. coli*. V rámci těchto pokusů jsem si ověřila, že i na membránách z lipidů bakterie *E. coli* kolicin U vytváří stabilní a uniformní póry s podobnou frekvencí otevírání (= zabudovávání molekul do dvojvrstvy a následné otevírání pórů), ale s nižší vodivostí (14 pS). Extrakt z lipidů bakterie *E. coli* obsahuje z 67 % fosfatidyletanolamin (bez náboje), z 23,2 % negativně nabitý fosfatidylglycerol a z dalších téměř 10% obsahuje kardiolipin který disponuje dokonce dvěma negativními náboji na 1 molekulu, zbytek složení je neznámý (viz <http://avantilipids.com/>). Z tohoto výčtu složení vyplývá, že mají tyto membrány mírně vyšší negativní náboj oproti membránám z azolektinu, který obsahuje z 48 % fosfatidycholin (bez náboje), z 23 % také nenabitý fosfatidyletanolamin a z 29 % záporně nabitý fosfatidylinositol. Snižování vodivosti kolicinových pórů v těchto membránách oproti azolektinovým, by proto mohlo být způsobeno redukcí rychlosti difúze iontů roztoku v póru z toho důvodu, že náboje na fosfolipidech, které jsou možná součástí stěny pórů (model toroidního póru) mohou měnit náboj v póru a dělat ho

tak méně vodivým (znesnadňují průchod iontům) (Aguilella et al., 2014).

Pokud je mi známo, nebyly dosud prováděny pokusy s jinými koliciny na takových membránách, přestože jejich použití je relevantní vzhledem k tomu, že většina kolicinů je produkována bakteriemi *E. coli*. Proto v rámci své další práce mám v úmyslu sama chování pórů jiných kolicinů v těchto podmínkách ověřit.

Iontová selektivita

Iontová selektivita je důležitá vlastnost pórů. Udává nám, které ionty prochází pórem a může tím v mnoha případech naznačovat jaká je funkce póru in vivo. U pórů kolicinu U jsem zjistila velmi slabou kationtovou selektivitu (poloměr draselných kationtů a chloridových aniontů je 1,4), nicméně při změně hodnoty pH z 6 na 5 se selektivita mění a póry se stávají neselektivními (poloměr draselných kationtů a chloridových aniontů je 1). Podobný trend můžeme sledovat i u vlivu různých kationtů. Při měření iontové selektivity pórů v chloridovém roztoku s různými kationty jsem stanovila toto pořadí selektivit od nejvyšší kationtové selektivity až po neselektivní:



Eisenmann s pokusy na kation-selektivních skleněných elektrodách stanovil 11 nejběžnější selektivitních sekvencí na základě toho jak moc se v nich uplatňují elektrostatické síly (Eisenman, 1962, shrnuto v Diamond and Wright, 1969). Při porovnání této selektivitní sekvence se známými Eisenmannovými sekvencemi jsem zjistila, že kromě kationtů Na^+ , jsou selektivity pro ostatních kationty v pořadí sekvence odpovídající většímu póru, ve kterém se příliš neuplatňují elektrostatické interakce, ale spíše energie potřebná pro dehydrataci jednotlivých iontů. Vyšší selektivita pro kationty Na^+ může být způsobena chybou měření kvůli nízkému počtu opakování, nebo může být způsobena nějakým typem specifické interakce tohoto kationtu s pórem.

Iontová selektivita byla stanovována i jinými autory i u dalších kolicinů. Například póry kolicinu N byly různě selektivní v závislosti na změně podmínek. Při nízkém pH tyto póry vykazovaly slabou aniontovou selektivitu, zatímco při vyšším pH byly naopak slabě kation selektivní. I zde je ovšem třeba zmínit, že i tyto pokusy byly prováděny v odlišných podmínkách (v roztoku NaCl na membránách ze syntetických lipidů) (Wilmsen et al., 1990). Zajímavá je studie zabývající se mimo jiné proteinem SARS-CoV E (jeden z obalových proteinů koronavirů), u tohoto proteinu se předpokládá vznik toroidních pórů. Z této studie je patrné, že iontová selektivita i vodivost jednotlivých pórů je silně ovlivňována jak hodnotou pH roztoku tak i fosfolipidovým složením membrány (náboj) (Aguilella et al., 2014), což by

mohlo vytvářet paralelu s chováním kolicinových pórů, které by také mohly odpovídat modelu toroidního póru (Sobko et al., 2006b). Kationtová selektivita pórů kolicinu U tedy může být způsobena i tím, že téměř 30 % azolektinové membrány je tvořeno negativně nabitými fosfolipidy, které mohou vézt k přednostnímu atrahování kationtů k membráně. Změna pórů při pH 5 ze slabě kation selektivních na neselektivní může být způsobena protonací negativně nabitých fosfolipidů na membráně, takže kationty už nejsou přitahovány (Hristova et al., 1997).

Jak je patrné z výše shrnutých pozorování selektivita pórů kolicinu U je snadno ovlivnitelná mnoha faktory. Na základě stanovení selektivní sekvence můžeme tvrdit, že se v pórech kolicinu U neuplatňuje jeho náboj, což je zřejmě příčina velmi slabé kationtové nebo žádné selektivity. Tato nízká selektivita pórů kolicinu U také značně snižuje přesnost a omezuje použitelnost některých mnou používaných modelů na určení průměru póru, jelikož vzhledem k nízké selektivitě nebyly splněny vstupní podmínky pro tyto modely.

Vliv pH roztoku a potenciálu

Dále jsem potvrdila svůj předpoklad, že póry kolicinu U jsou napětově ovládané, a že jsou aktivovány při napětí vyšším než 40 mV (pozitivní na straně přídavku proteinu). U všech porotvorných kolicinů, u kterých se napětově ovládání zkoumalo, bylo totiž také zjištěno, že jsou jejich póry napětově ovládané (Bullock et al., 1983, 1990; Slatin et al., 2004).

Další sledovanou proměnnou ovlivňující chování kolicinu U v membráně je pH roztoku. Z grafů sledujících závislost vodivosti či frekvenci otevírání pórů na pH roztoku je patrné (Obr. 23 a 24), že póry kolicinu U jsou na pH roztoku silně závislé. Snižování pH roztoku vedlo k téměř exponenciálnímu zvyšování pravděpodobnosti otevírání póru kolicinu U na membráně, ale zároveň vedlo ke snižování vodivosti jednotlivých pórů. Vliv pH se odrazil i na iontové selektivitu pórů v roztocích KCl s různým pH, kdy byl patrný posun od neselektivních pórů při pH 5 k mírně kation selektivním v roztoku o pH 6 a 7,4. Všechny tyto poznatky odpovídají studiím provedeným na jiných porotvorných kolicinech kdy u dosud zkoumaných kolicinů byla prokázána silná závislost na pH roztoku (Bourdineaud et al., 1990; Pressler et al., 1986; Raymond et al., 1985; Wilmsen et al., 1990). Což je patrné například u kolicinu N, u kterého byla dokonce vyslovena hypotéza, že se může vyskytovat ve dvou stavech, acidickém a bazickém, v závislosti na pH roztoku v kterém je (Wilmsen et al., 1990). Že jde o dva odlišitelné stavy, autoři dokazují tím, že jsou typy těchto kanálů uzavíratelné (channel switching) při různých napětích. Při hodnotách pH nižších než 5, se póry zavíraly až při vysokém záporném napětí, zatímco póry při pH 5 a vyšším se zavíraly už při nulovém

potenciálu. Nicméně rozlišovat toto chování pórů jako dva oddělené stavy může být zavádějící. Za odlišné stavy se v těchto typech pokusů častěji považují spíše různé stavy vodivostní a je poněkud zvláštní, že pro tyto dva stavy (acidický a bazický) oddělované pouze na základě uzavíratelnosti při určitém napětí, autoři nepozorovali i odlišné vodivostní stavy jednotlivých pórů. Zjištěná zvyšující se frekvence otevírání pórů kolicinu U se snižujícím se pH může být způsobena tím, že při protonaci membrány dochází k obsazení negativně nabitých míst na membráně, což může vézt k přitahování sledovaného proteinu k membráně kvůli negativnímu náboji na jeho povrchu usnadňujícímu interakci kolicinu s membránou (Davidson et al., 1985).

Kationty Ca^{2+}

Při měřeních prováděných na jiných kolicinech se běžně měří v roztocích s minimální koncentrací kationtů Ca^{2+} (Bullock et al., 1983; Collarini et al., 1987; Wilmsen et al., 1990)). Zřejmě se kationty Ca^{2+} přidávají do roztoků, protože se jsou schopny v některých případech interagovat s fosfolipidy dokonce i stabilizovat membránu (Cullis and de Kruijff, 1979; Seddon, 1990).

V případě měření s kolicinem U jsem prokázala, že nízká koncentrace kationtů Ca^{2+} v roztoku (2 mM) neovlivňuje chování jeho pórů (stabilitu ani vodivost), zatímco vyšší koncentrace okolo 25 mM sice stále neovlivňuje aktivitu kolicinu, ale způsobuje snížení vodivosti těchto pórů téměř na polovinu (z 19 na 11 pS), což si můžeme vysvětlit tím, že může docházet k interakci kationtů Ca^{2+} s negativně nabitými fosfolipidy a to může vézt k jejich vazbě dovnitř póru až k omezení jejich průchodnosti (Döbereiner et al., 1996). Podobný efekt byl sledován i u pórů gramicidinu A (Gambale et al., 1987). U příbuzného kolicinu B byl pozorován podobný trend, kdy po přidání CaCl_2 v koncentraci 5 mM došlo ke snížení vodivosti pórů, nicméně vliv na stabilitu či aktivitu pórů kolicinu B kationty Ca^{2+} neměly (Pressler et al., 1986). Naopak na druhý sekvenčně blízký kolicin A měly vápenaté kationty velký vliv, po jejich přidání do roztoku (5mM) došlo ke stabilizaci jinak velmi nestabilních pórů a zároveň i ke značnému snížení vodivosti z 26 pS na 16 pS (Pressler et al., 1986). Domnívám se ale, že i tento jev je spíše fyzikální, kdy interakce kationtů Ca^{2+} s nabitými fosfolipidy může vézt ke stabilizaci pórů kolicinu A, tedy za předpokladu, že i póry kolicinu A jsou toroidní a na jejich stavbě se přímo podílí membránové fosfolipidy.

Efekt náboje v okolí ústí póru

Poloměr pórů kolicinu U a efekt náboje v jeho okolí jsem se pokusila zjistit prostřednictvím aplikace modelu efektu náboje v okolí ústí póru, který nám umožňuje stanovit nejen množství náboje v okolí póru ale také poloměr pórů. Za předpokladu, že sledovaný pór je silně selektivní a že v jeho okolí k nějakému atrahování kationtů či aniontů dochází. Využila jsem měření na planárních membránách, kdy jsem stanovovala vodivost jednotlivých pórů v závislosti na koncentraci chloridu draselného v roztoku.

Na základě tvaru získané závislosti je možné určit, zda se ve sledovaném póru nějaké náboje vůbec uplatňují. Pokud je tato závislost lineární od nízkých koncentrací až po velmi vysoké – předpokládáme velký vodou naplněný kanál, ve kterém zřejmě nedochází k žádným významným elektrostatickým interakcím mezi ionty a pórem. Pokud je závislost ve velmi nízkých koncentracích nelineární (neklesala by rovnoměrně k nule) ale ve vysokých už potom lineární je, mohlo by to znamenat, že tam jsou jisté náboje, které zapříčiňují atrahování kationtů k ústí póru.

Zjištěná závislost vodivosti pórů kolicinu U na koncentraci roztoku je ale spíše mocinná (Obr. 25 a 26) a neodpovídá ani jedné z výše zmíněných variant. V nízkých koncentracích je zjištěná závislost téměř lineární a ve vysokých je značně nelineární, což značí, že k atrahování žádných iontů při nízkých koncentracích pravděpodobně nedochází a neuplatňují se tedy elektrostatické interakce mezi ionty a pórem, naopak ve vysokých koncentracích zřejmě dochází k saturaci póru, pro náš pór je tedy zřejmě limitující složkou velikost póru, který je asi v nějakém místě značně zúžený. Vzhledem ke specifickému charakteru zjištěné závislosti, model efektu náboje v okolí póru není na tato data použitelný, což může být z velké části způsobené i faktem, že tento model předpokládá vysoce selektivní pór, kde se uplatňuje především jeden druh iontů, což v našem případě není splněno.

Renkinův model

V rámci předešlého přístupu jsem nebyla schopna stanovit přibližnou velikost póru, proto jsem přešla k další metodě pro stanovení poloměru póru. Využila jsem Renkinova zjednodušujícího modelu póru, kdy se sledovaný pór představuje jako vodou naplněný válec a procházející ionty mají sférický tvar. Limitujícím faktorem je omezení difúze molekul případně iontů procházejících pórem. Vzhledem k tomu, že podle tohoto modelu je sledována vodivost pórů závislá pouze na velikosti buď kationtů či aniontů, je tato metoda nejlépe aplikovatelná na pórech silně selektivních. I přesto jsem se však rozhodla tento model ověřit i

pro slabě kation-selektivní póry kolicinu U. Stanovovala jsem vodivost póru kolicinu U měřených v roztoku chloridu s různými přidanými monovalentními kationty. Tato data jsem vynesla do grafu a danou závislost vodivosti pórů na hydratačním poloměru kationtu jsem co nejlépe proložila zmíněným modelem. Na základě tohoto proložení mých dat jsem určila, že průměr póru se pohybuje v rozmezí hodnot 1-1,4 nm.

Během těchto měření jsem si ověřila, že se zvyšujícím se hydratačním poloměrem kationtů se snižuje průměrná vodivost pórů. Výjimku tvoří kationty Cs^+ , které způsobily pokles vodivosti jednotlivých pórů na 10 pS, i přestože hydratační poloměr Cs^+ odpovídá poloměru kationtů K^+ či Rb^+ , které mají vodivost 19 pS. Podobný trend již byl sledován u kolicinů A a B (Pressler et al., 1986). Tato anomálie může být způsobena například interakcí Cs^+ se stěnami pórů, která může způsobovat jejich zdržení v ústí póru. Vzhledem k tomu, že je cesium těžký kov může být pokles vodivosti způsoben i jinými mechanismy, například bylo prokázáno, že cesium je schopné blokovat draselné kanály (Hagiwara et al., 1976). Dále pak při použití chloridového roztoku s Tris nebo TEA se neotevřely žádné kanály. I kdyby oba tyto kationty byly příliš velké, aby prošly sledovaným pórem, anionty Cl^- by procházet měly, což vyplývá ze zjištěné iontové selektivity. Nicméně z nějakého důvodu buď nedochází k zabudování kolicinu do membrány, nebo se koliciny zabudují, ale nejsou jimi schopny projít ani anionty, což by mohlo znamenat například to, že tyto kanály vyžadují přítomnost alespoň minimálního množství monovalentních kationtů pro své otevření. Tuto teorii bych chtěla ověřit v dalších pokusech.

Jak je patrné již ze stanovené iontové selektivity póru, velkou úlohu ve vodivosti pórů kolicinu U hrají i anionty. Zjištěná selektivita póru (1,4) jasně naznačuje, že sledované póry jsou jen slabě kation-selektivní, jsou tedy dobře propustné i pro anionty. Proto jsem měřila vodivost draselných roztoků s dalšími anionty o větším hydratačním poloměru, jako jsou acetát (0,202 nm) a citrát (0,38 nm). Při použití acetátu byla určena vodivost pórů 13 pS (pro KCl je to 19 pS) došlo tedy ke snížení vodivosti pravděpodobně způsobené tím, že anionty acetátu vzhledem ke svému poloměru už méně ochotně procházely pórem. Při použití citronanových aniontů došlo k ještě většímu snížení vodivosti na 10 pS, tento pokles mohl být opět způsobený většími hydratačními poloměry aniontů. Nicméně musíme zohlednit fakt, že použitý citronan draselný, pokud je plně disociovaný, obsahuje v roztoku v poměru tři draselné kationty na jeden aniont, tudíž by mohlo docházet k nerovnovážnému procházení kationtů na úkor aniontů. Pokles vodivosti při těchto měřeních by tedy mohl znamenat, že větší anionty v roztoku už pórem neprocházejí (nebo jen velmi neochotně) a sledovaná vodivost je způsobena především draselnými kationty. Tento výsledek koreluje s výsledky získanými

při měření s různými kationty, kdy při použití kationtů Li^+ o hydratačním poloměru 0,213 nm byla zjištěna vodivost 10 pS, což by mohlo značit, že v tomto případě se na vodivosti pórů z větší části podílí naopak anionty Cl^- . Tyto poklesy vodivosti, jak u měření s kationty, tak i anionty, odpovídají chování při velmi slabé selektivitě póru, kdy opravu pórem prochází zhruba 1 kationt na 1 aniont.

Stanovení průměru póru s využitím neelektrolytů

Kvůli nepřesnosti předešlého modelu jsem se rozhodla využít další metodu pro stanovení průměru póru kolicinu U. Využila jsem metody měření na planárních membránách v roztoku s přidanými neelektrolyty, která byla využita již dříve (Sabirov et al., 1993). Navíc už tato metoda byla aplikována i na pór vytvářený jedním z pórotvorných kolicinů, kolicinem Ia. Pro tento pór byl stanoven průměr póru v nejužším místě 0,7 nm a na vstupech póru 1 nm a 1,7 nm (Krasilnikov et al., 1998).

Průměr póru tvořeného kolicinem U se pohybuje v rozmezí 0,62-1 nm. Krajní hodnoty odpovídají průměru molekul glycerolu a molekul maltózy, přičemž z grafu (Obr. 28) je patrné, že molekuly maltózy stejně tak jako všechny molekuly polyethylenglykolu už na vodivost jednotlivých pórů neměly vliv, to znamená, že už byly zřejmě příliš velké na to, aby jím prošly. Významné by mohly být molekuly sorbitolu ($d = 0,78$ nm). Při měření s těmito molekulami došlo k zaplnění póru ze zhruba 30 %, což by mohlo znamenat, že mají velikost podobnou průměru póru v nejužším místě a nejsou jím schopny projít úplně, čemuž by mohl nasvědčovat i fakt, že při měření s touto molekulou občas dochází k částečné blokaci otevřených pórů na hodnotu vodivosti odpovídající 50 % běžné hodnoty po dobu až desítek milisekund. Mohlo by docházet k nějaké specifické interakci sorbitolu s pórem, která způsobuje jeho částečnou blokaci. Nicméně tyto blokace mohou mít také jiné příčiny, například by mohly být způsobeny specifickou změnou konformace póru. Molekuly arabinózy vykazovaly 120% zaplnění póru, což bylo sledováno i v případě měření s kolicinem Ia (Krasilnikov et al., 1998). Tato anomálie by mohla být způsobena nějakým specifickým druhem interakce molekul arabinózy s pórem. Zaplnění póru vyjádřené v procentech vypovídá o tom, jak moc je pór zaplněn neelektrolytem, nicméně 100% zaplnění nemusí znamenat, že je pór úplně plný. Získané hodnoty pro zaplnění jednotlivými neelektrolyty jsou totiž získávány s využitím známé konduktivity roztoku, která může být pro jednotlivé neelektrolyty velmi odlišná a významně tak může posouvat získané hodnoty zaplnění póru. Navíc v rámci výpočtu procentuálního zaplnění se počítá s hodnotami zaplnění pro dva

nejmenšími neelektrolyty jako s maximální hodnotou zaplnění, tudíž celé procentuální vyjádření je relativní v závislosti na prvních dvou nejmenších neelektrolytech. Za zmínku ještě stojí, že pro pokus s přidanými molekulami PEG 400 jsem zjistila zápornou hodnotu zaplnění lumen póru. Tato anomálie je zřejmě způsobena tím, že molekula PEG400 je schopna vázat vodu z roztoku (mimo pór) a zvyšovat tak jeho molaritu, pohyblivost iontů a tedy i vodivost (Bezrukov and Vodyanoy, 1993). Vliv neelektrolytu je tedy ovlivněn zvýšenou iontovou koncentrací a zjištěná hodnota zaplnění póru pro PEG 400 je tím ve výsledku velmi zkreslena, dokonce se může dostávat i do záporných hodnot.

Cílená mutagenese kolicinu U, produkce mutantních variant a ověření jejich funkčnosti

Struktura pórtvorné domény kolicinů v membráně je zatím stále zahalena tajemstvím. Existuje mnoho prací zabývajících se strukturou zavřeného póru této pórtvorné domény v membráně, kde je řešena především pravděpodobnost jednoho ze dvou navržených modelů pro tento stav, modely „umbrella“ nebo „penknife“. Nicméně pokud jde o strukturu otevřeného póru pórtvorné domény kolicinů v membráně, tak ta je zatím nejasná. Například u kolicinu Ia bylo zjištěno, že tvorby póru se mohou účastnit jen 4 α -helixy, protože α -helixy 2-5 jsou translokovány při otevření póru dovnitř buňky (Slatin et al., 1994). Podobná zjištění byla provedena i pro kolicin A (Nardi et al., 2001b). Nicméně jak tento pór opravdu vypadá a kolik helixů se ve skutečnosti na tvorbě póru podílí, není známo.

Proto jsem se v rámci druhé části své diplomové práce pokusila vytvořit několik cíleně mutovaných variant kolicinu U s cysteiny zaměňovanými za aminokyseliny na vybraných pozicích v rámci pórtvorné domény kolicinu U. Prostřednictvím jejich následného značení a další analýzy bych ráda v rámci svého doktorského studia vyřešila topologii pórtvorné domény kolicinu U v membráně.

Podařilo se mi úspěšně provést cílenou mutagenezi ve všech sedmi případech. Nicméně vyprodukovat a purifikovat mutovanou variantu kolicinu se mi podařilo pouze u pěti z nich, i přestože všechny varianty byly produkovány identickým postupem. Nízká produkce mutantních variant I433C a L579C byla nejspíš způsobena nedostatečným rozbitím buněk v rámci prvních kroků produkce kolicinu.

V průběhu purifikačních kroků došlo ke ztrátám proteinu, nejdříve při druhém purifikačním kroku, kdy byl produkován kolicin zamražen v roztoku koncentrovaného imidazolu a teprve poté byl dialyzován. V tomto kroku zřejmě došlo k největším ztrátám proteinu způsobeným působením imidazolu. Následně v dalším kroku v průběhu gelové filtrace došlo k vyředění proteinu a jeho dalším ztrátám. I přesto se mi ale nakonec podařilo

získat dostatek proteinu pro pilotní pokusy ověřování funkčnosti purifikovaných mutantních kolicinů.

Nejprve jsem prováděla testy citlivosti jednotlivých mutantních variant na citlivém kmeni bakterie *E. coli* 5K. Na základě těchto pokusů jsem si ověřila, že všechny vyprodukované varianty (F463C, D486C, F504C, V532C, W545C) jsou schopny zabít citlivé bakterie a dále jsem stanovila jejich relativní účinnost, kdy se překvapivě zdá, že všechny mutované varianty jsou účinnější než divoký typ kolicinu U (wild type, wt).

Nakonec jsem ověřovala schopnost těchto variant tvořit póry na planárních membránách při standardních podmínkách. Zjistila jsem, že kromě varianty V532C vykazují všechny varianty kolicinu jistou podobnost s wt kolicinem U. Varianta s mutací F463C vytváří póry o podobné vodivosti, nicméně častěji tyto póry fluktuují mezi otevřeným a zavřeným stavem. Tento vložený cystein se nachází mezi helixy 2 – 3, což je část proteinu, která by při otevření póru mohla být přenesena dovnitř buňky a změna v její konformaci by ve výsledku mohla vést k vyšší pohyblivosti této části, která by mohla způsobovat přivírání póru. Varianty D486C a F504C vykazují velkou stabilitu pórů podobnou wt kolicinu U, nicméně průměrná vodivost těchto pórů byla nižší (≈ 15 pS). Póry varianty W545C se vyznačují dvěma vodivostními stavy o vodivostech 10 a 17 pS. Varianta V532C má zcela jiných vodivostní charakter, na planárních membránách jsem sledovala vznik pórů o velice široké distribuci vodivostí od 4 do 250 pS, které byly velice nestabilní. Z toho se dá vyvozovat, že valin na pozici 532 byl významný pro tvorbu póru kolicinu U. Na základě modelů vytvořených softwarem Rosetta membrane je možné, že by tato aminokyselina mohla být součástí helixu 6, který by mohl být součástí stěny otevřeného póru a vložený cystein by tak mohl narušovat strukturu tohoto helixu. Kvůli významné změně fenotypu póru dále nebudu využívat variantu V532C. Nicméně ostatní vyprodukované varianty kolicinu U na BLM vykazují podobný fenotyp, navíc jsem si ověřila, že jsou schopny inhibovat růst citlivých buněk, proto tyto vyprodukované varianty použiji ve svých dalších pokusech, kdy ještě dále budu ověřovat jejich stabilitu při různých hodnotách pH, jejich selektivitu, apod.

Pokud vybrané varianty projdou i touto fází, budu na vložené cysteiny navazovat biotin a prostřednictvím biotin-streptavidinové interakce budu sledovat případný transport konkrétních aminokyselin na trans stranu membrány pomocí měření na planárních membránách. Dále budu na vložené cysteiny navazovat fluorescenční značky, jako je badan či akrylodan a prostřednictvím fluorescenční spektroskopie budu stanovovat konkrétní pozice značených aminokyselin v rámci membrány. Pomocí těchto metod bych tedy ráda určila helixy přenášené při otevření póru dovnitř buňky a polohu značených aminokyselin

v transmembránových helixech, případně bych stanovila jejich úlohu při tvorbě otevřeného póru. Na závěr mám v úmyslu opakovat nepodařenou produkci mutovaných variant I433C a L579C, případně optimalizovat postup jejich produkce. A i tyto mutantní varianty otestovat a dále využít k určení topologie póru kolicinu U.

6 SOUHRN

Ve své diplomové práci jsem se zbývala C-terminální doménou kolicinu U bakterie *Shigella boydii*, vlastnostmi pórů, které vytváří a jejich topologií.

Mým prvním cílem bylo charakterizovat vlastnosti pórů kolicinu U využitím elektrofyziologických metod. Nejdříve jsem sledovala vliv různých podmínek na chování pórů kolicinu U a zjistila jsem, že:

- Póry kolicinu U jsou při zvolených standardních podmínkách velmi stabilní a uniformní, jejich průměrná vodivost je 19 pS a jsou velmi slabě kation selektivní.
- Póry kolicinu U jsou napětově ovládané.
- Hodnota pH roztoku silně ovlivňuje vlastnosti pórů. Se zvyšujícím se pH se zvyšuje vodivost pórů a snižuje se aktivita zabudovávání a otevírání pórů. Dokonce i selektivita pórů se se změnou pH mění.
- Vliv iontů Ca^{2+} v roztoku o nízké koncentraci (2 mM) je zanedbatelný.

Dále jsem určovala velikost a tvar pórů kolicinu U a zjistila jsem, že:

- Model pro výpočet průměru póru a náboje v jeho okolí nelze aplikovat. Pór tedy musí být jiný, než tento model očekává. Je málo selektivní, zřejmě velmi malý a v jeho okolí nejsou náboje, které by způsobily atrahování iontů.
- Renkinův model pro výpočet průměru póru lze aplikovat na póry kolicinu U. Průměr póru by se měl pohybovat mezi 1 – 1,4 nm. Nicméně, přesnost tohoto modelu je malá, kvůli nízké iontové selektivitě pórů.
- Stanovení průměru póru prostřednictvím měření s neelektrolyty se podařilo. Průměr póru se pohybuje v rozmezí hodnot 0,6 - 1 nm. Klíčovou molekulou je sorbitol (0,8 nm), který má zřejmě velikost blízkou průměru póru v nejužším místě.

Mým dalším cílem bylo vytvořit 7 jednobodových mutací na specifických pozicích C-terminální domény kolicinu U. Připravit a purifikovat tyto mutované varianty kolicinu U a ověřit jejich funkčnost. Přičemž se mi podařilo:

- Úspěšně provést cílenou PCR mutagenezi ve všech sedmi případech.
- Připravit a purifikovat pět ze sedmi variant kolicinu U.
- Ověřit funkčnost všech pěti variant kolicinu U in vivo i in vitro a vybrat čtyři z nich pro mé budoucí pokusy vedoucí ke stanovení membránové topologie póru kolicinu U v rámci doktorského studia.

PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, J.D., and Shannon, R. (1958). A Method for Typing *Shigella sonnei*, using Colicine Production as a Marker. *J. Clin. Pathol.* *11*, 71–77.
- Aguilella, V.M., Queral-Martín, M., Aguilella-Arzo, M., and Alcaraz, A. (2011). Insights on the permeability of wide protein channels: measurement and interpretation of ion selectivity. *Integr. Biol.* *3*, 159–172.
- Aguilella, V.M., Verdiá-Báguena, C., and Alcaraz, A. (2014). Lipid charge regulation of non-specific biological ion channels. *Phys. Chem. Chem. Phys.* *16*, 3881–3893.
- Alcaraz, A., Nestorovich, E.M., Aguilella-Arzo, M., Aguilella, V.M., and Bezrukov, S.M. (2004). Salting Out the Ionic Selectivity of a Wide Channel: The Asymmetry of OmpF. *Biophys. J.* *87*, 943–957.
- Anderluh, G., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Pungerčar, J., Gubenšek, F., Zecchini, M.L., Serra, M.D., and Menestrina, G. (1999). Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone. *Eur. J. Biochem.* *263*, 128–136.
- Antonov, V.F., Anosov, A.A., Norik, V.P., and Smirnova, E.Y. (2005). Soft perforation of planar bilayer lipid membranes of dipalmitoylphosphatidylcholine at the temperature of the phase transition from the liquid crystalline to the gel state. *Eur. Biophys. J. EBJ* *34*, 155–162.
- Apelblat, A. (2014). *Citric Acid* (Springer).
- Arnold, T., Zeth, K., and Linke, D. (2009). Structure and Function of Colicin S4, a Colicin with a Duplicated Receptor-binding Domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 6403–6413.
- Bárcena-Uribarri, I., Thein, M., Maier, E., Bonde, M., Bergström, S., and Benz, R. (2013). Use of Nonelectrolytes Reveals the Channel Size and Oligomeric Constitution of the *Borrelia burgdorferi* P66 Porin. *PLoS ONE* *8*, e78272.
- Bardhan, P., Faruque, A.S.G., Naheed, A., and Sack, D.A. (2010). Decreasing Shigellosis-related Deaths without *Shigella* spp.-specific Interventions, Asia. *Emerg. Infect. Dis.* *16*, 1718–1723.
- van den Beld, M.J.C., and Reubsaet, F. a. G. (2012). Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* *31*, 899–904.
- Bénédetti, H., Llobès, R., Lazdunski, C., and Letellier, L. (1992). Colicin A unfolds during its translocation in *Escherichia coli* cells and spans the whole cell envelope when its pore has formed. *EMBO J.* *11*, 441–447.
- Benz, R., Janko, K., Boos, W., and Läuger, P. (1978). Formation of large, ion-permeable membrane channels by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *511*, 305–319.
- Benz, R., Janko, K., and Läuger, P. (1979). Ionic selectivity of pores formed by the matrix protein (porin) of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *551*, 238–247.

- Benz, R., Schmid, A., Wagner, W., and Goebel, W. (1989). Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect. Immun.* 57, 887–895.
- Benz, R., Hardie, K.R., and Hughes, C. (1994). Pore formation in artificial membranes by the secreted hemolysins of *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii*. *Eur. J. Biochem.* 220, 339–347.
- Bezrukov, S.M., and Vodyanoy, I. (1993). Probing alamethicin channels with water-soluble polymers. Effect on conductance of channel states. *Biophys. J.* 64, 16–25.
- Böckmann, R.A., de Groot, B.L., Kakorin, S., Neumann, E., and Grubmüller, H. (2008). Kinetics, Statistics, and Energetics of Lipid Membrane Electroporation Studied by Molecular Dynamics Simulations. *Biophys. J.* 95, 1837–1850.
- Bourdineaud, J.P., Boulanger, P., Lazdunski, C., and Letellier, L. (1990). In vivo properties of colicin A: channel activity is voltage dependent but translocation may be voltage independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 1037–1041.
- Brenner, D.J., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., Ørskov, I., and Ørskov, F. (1972). Polynucleotide Sequence Relatedness Among Three Groups of Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *Infect. Immun.* 6, 308–315.
- Brunen, M., Engelhardt, H., Schmid, A., and Benz, R. (1991). The major outer membrane protein of *Acidovorax delafieldii* is an anion-selective porin. *J. Bacteriol.* 173, 4182–4187.
- Bullock, J.O., Cohen, F.S., Dankert, J.R., and Cramer, W.A. (1983). Comparison of the macroscopic and single channel conductance properties of colicin E1 and its COOH-terminal tryptic peptide. *J. Biol. Chem.* 258, 9908–9912.
- Bullock, J.O., Armstrong, S.K., Shear, J.L., Lies, D.P., and McIntosh, M.A. (1990). Formation of ion channels by Colicin B in planar lipid bilayers. *J. Membr. Biol.* 114, 79–95.
- Bullock, J.O., Kolen, E.R., and Shear, J.L. (1992). Ion selectivity of colicin E1: II. Permeability to organic cations. *J. Membr. Biol.* 128, 1–16.
- Butala, M., Podlesek, Z., and Žgur-Bertok, D. (2008). The SOS response affects thermoregulation of colicin K synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 283, 104–111.
- Carr, S., Penfold, C.N., Bamford, V., James, R., and Hemmings, A.M. (2000). The structure of TolB, an essential component of the tol-dependent translocation system, and its protein–protein interaction with the translocation domain of colicin E9. *Structure* 8, 57–66.
- Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 158–229.
- Castellan, G. W. 1983. The ionic current in aqueous solutions, p. 769–780. *In* Physical chemistry. Addison Wesley, Reading, Mass
- Cavard, D. (1991). Synthesis and functioning of the colicin E1 lysis protein: comparison with the colicin A lysis protein. *J. Bacteriol.* 173, 191–196.
- Cavard, D. (1995). Effects of temperature and of heat shock on the expression and action of the colicin A lysis protein. *J. Bacteriol.* 177, 5189–5192.

- Cavard, D. (2004). Role of Cal, the colicin A lysis protein, in two steps of colicin A release and in the interaction with colicin A-porin complexes. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3867–3875.
- Cavard, D., Lloubès, R., Morlon, J., Chartier, M., and Lazdunski, C. (1985). Lysis protein encoded by plasmid ColA-CA31. Gene sequence and export. *Mol. Gen. Genet. MGG* 199, 95–100.
- Cavard, D., Sauve, P., Heitz, F., Pattus, F., Martinez, C., Dijkman, R., and Lazdunski, C. (1988). Hydrodynamic properties of colicin A. *Eur. J. Biochem.* 172, 507–512.
- Christensen, H., Nordentoft, S., and Olsen, J.E. (1998). Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 Pt 2, 605–610.
- Cleveland, M.V., Slatin, S., Finkelstein, A., and Levinthal, C. (1983). Structure-function relationships for a voltage-dependent ion channel: properties of COOH-terminal fragments of colicin E1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 3706–3710.
- Collarini, M., Amblard, G., Lazdunski, C., and Pattus, F. (1987). Gating processes of channels induced by colicin A, its C-terminal fragment and colicin E1 in planar lipid bilayers. *Eur. Biophys. J.* 14.
- Cullis, P.R., and de Kruijff, B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559, 399–420.
- Cursino, L., Šmarda, J., Chartone-Souza, E., and Nascimento, A.M.A. (2002). Recent updated aspects of colicins of Enterobacteriaceae. *Braz. J. Microbiol.* 33, 185–195.
- Cutler, S.A., Lonergan, S.M., Cornick, N., Johnson, A.K., and Stahl, C.H. (2007). Dietary Inclusion of Colicin E1 Is Effective in Preventing Postweaning Diarrhea Caused by F18-Positive *Escherichia Coli* in Pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3830–3835.
- Diamond, J.M., and Wright, E.M. (1969). Biological Membranes: the Physical Basis of ION and Nonelectrolyte Selectivity. *Annu. Rev. Physiol.* 31, 581–646.
- Döbereiner, A., Schmid, A., Ludwig, A., Goebel, W., and Benz, R. (1996). The Effects of Calcium and Other Polyvalent Cations on Channel Formation by *Escherichia coli* α -Hemolysin in Red Blood Cells and Lipid Bilayer Membranes. *Eur. J. Biochem.* 240, 454–460.
- Donovan, J.J., Simon, M.I., Draper, R.K., and Montal, M. (1981). Diphtheria toxin forms transmembrane channels in planar lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 172–176.
- Duche, D., Baty, D., Chartier, M., and Letellier, L. (1994). Unfolding of colicin A during its translocation through the *Escherichia coli* envelope as demonstrated by disulfide bond engineering. *J Biol Chem* 269, 24820–24825.
- Duché, D., Izard, J., González-Mañas, J.M., Parker, M.W., Crest, M., Chartier, M., and Baty, D. (1996). Membrane Topology of the Colicin A Pore-forming Domain Analyzed by Disulfide Bond Engineering. *J. Biol. Chem.* 271, 15401–15406.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24, 708–734.
- Eisenman, G. (1962). Cation Selective Glass Electrodes and their Mode of Operation. *Biophys. J.* 2, 259–323.

- Elkins, P., Bunker, A., Cramer, W.A., and Stauffacher, C.V. (1997). A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 5, 443–458.
- El Kouhen, R., Fierobe, H.-P., Scianimanico, S., Steiert, M., Pattus, F., and Pages, J.-M. (1993). Characterization of the receptor and translocator domains of colicin N. *Eur. J. Biochem.* 214, 635–639.
- Ewing, W.H. (1949). *Shigella* Nomenclature. *J. Bacteriol.* 57, 633–638.
- Falke, J.J., and Koshland, D.E. (1987). Global Flexibility in a Sensory Receptor: A Site-Directed Cross-Linking Approach. *Science* 237, 1596–1600.
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan. Med. Bull.* 46, 183–196.
- F Antonov, V.V.P. V (1980). The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature. *Nature* 283, 585–586.
- Ferry, J.D. (1936). Statistical Evaluation of Sieve Constants in Ultrafiltration. *J. Gen. Physiol.* 20, 95–104.
- Frederico, P. (1957). Colicins. *Annu. Rev. Microbiol.* 11, 7–22.
- Fredericq, P. (1948). Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae (Duculot).
- Gambale, F., Menini, A., and Rauch, G. (1987). Effects of calcium on the gramicidin A single channel in phosphatidylserine membranes. Screening and blocking. *Eur. Biophys. J. EBJ* 14, 369–374.
- García-Sáez, A.J., Coraiola, M., Dalla Serra, M., Mingarro, I., Menestrina, G., and Salgado, J. (2005). Peptides Derived from Apoptotic Bax and Bid Reproduce the Poration Activity of the Parent Full-Length Proteins. *Biophys. J.* 88, 3976–3990.
- van Geest, M., and Lolkema, J.S. (2000). Membrane Topology and Insertion of Membrane Proteins: Search for Topogenic Signals. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 13–33.
- Ghachi, M.E., Bouhss, A., Barreteau, H., Touzé, T., Auger, G., Blanot, D., and Mengin-Lecreulx, D. (2006). Colicin M Exerts Its Bacteriolytic Effect via Enzymatic Degradation of Undecaprenyl Phosphate-linked Peptidoglycan Precursors. *J. Biol. Chem.* 281, 22761–22772.
- Ghazaryan, L., Tonoyan, L., Ashhab, A.A., Soares, M.I.M., and Gillor, O. (2014). The role of stress in colicin regulation. *Arch. Microbiol.* 196, 753–764.
- Ghosh, P., Mel, S.F., and Stroud, R.M. (1993). A carboxy-terminal fragment of colicin Ia forms ion channels. *J. Membr. Biol.* 134, 85–92.
- Gillespie, D., and Eisenberg, R.S. (2002). Physical descriptions of experimental selectivity measurements in ion channels. *Eur. Biophys. J.* 31, 454–466.
- Gillor, O., Vriezen, J.A.C., and Riley, M.A. (2008). The Role of SOS Boxes in Enteric Bacteriocin Regulation. *Microbiology* 154, 1783–1792.

- Glaser, R.W., Leikin, S.L., Chernomordik, L.V., Pastushenko, V.F., and Sokirko, A.I. (1988). Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta* *940*, 275–287.
- Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H., and Pattus, F. (1992). Brominated phospholipids as a tool for monitoring the membrane insertion of colicin A. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 7294–7300.
- Gratia, J.-P. (2000). André Gratia: A Forerunner in Microbial and Viral Genetics. *Genetics* *156*, 471–476.
- Griko, Y.V., Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2000). Structural stability and domain organization of colicin E1. *J. Mol. Biol.* *302*, 941–953.
- Grozdanov, L., Raasch, C., Schulze, J., Sonnenborn, U., Gottschalk, G., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2004). Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia coli* Strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* *186*, 5432–5441.
- Hagiwara, S., Miyazaki, S., and Rosenthal, N.P. (1976). Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* *67*, 621–638.
- Hale, T.L., and Keusch, G.T. (1996). *Shigella*. In *Medical Microbiology*, S. Baron, ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston),.
- Hardy, K.G., Meynell, G.G., Dowman, J.E., and Spratt, B.G. (1973). Two major groups of colicin factors: Their evolutionary significance. *Mol. Gen. Genet. MGG* *125*, 217–230.
- Heimburg, T. (2010). Lipid Ion Channels. *Biophys. Chem.* *150*, 2–22.
- Hilsenbeck, J.L., Park, H., Chen, G., Youn, B., Postle, K., and Kang, C. (2004). Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution. *Mol. Microbiol.* *51*, 711–720.
- Ho, D., Lugo, M.R., Lomize, A.L., Pogosheva, I.D., Singh, S.P., Schwan, A.L., and Merrill, A.R. (2011). Membrane Topology of the Colicin E1 Channel Using Genetically Encoded Fluorescence. *Biochemistry (Mosc.)* *50*, 4830–4842.
- Hodgkin, A.L., and Katz, B. (1949). The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* *108*, 37–77.
- Hofmann, K., Wood, S.W., Brinton, C.C., Montibeller, J.A., and Finn, F.M. (1980). Iminobiotin affinity columns and their application to retrieval of streptavidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 4666–4668.
- Holz, R., and Finkelstein, A. (1970a). The Water and Nonelectrolyte Permeability Induced in Thin Lipid Membranes by the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* *56*, 125–145.
- Holz, R., and Finkelstein, A. (1970b). The Water and Nonelectrolyte Permeability Induced in Thin Lipid Membranes by the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* *56*, 125–145.

- Horak, V. (1994). 70 Colicin Types of *Shigella-Sonnei* and an Indicator System for Their Determination. *Zentralblatt Bakteriolog.-Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 281, 24–29.
- Howarth, M., Chinnapen, D.J.-F., Gerrow, K., Dorrestein, P.C., Grandy, M.R., Kelleher, N.L., El-Husseini, A., and Ting, A.Y. (2006). A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. *Nat. Methods* 3, 267–273.
- Hristova, K., Selsted, M.E., and White, S.H. (1997). Critical Role of Lipid Composition in Membrane Permeabilization by Rabbit Neutrophil Defensins. *J. Biol. Chem.* 272, 24224–24233.
- Jacobson, K., and Papahadjopoulos, D. (1975). Phase transitions and phase separations in phospholipid membranes induced by changes in temperature, pH, and concentration of bivalent cations. *Biochemistry (Mosc.)* 14, 152–161.
- Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2010). The colicin Ia receptor, Cir, is also the translocator for colicin Ia. *Mol. Microbiol.* 75, 567–578.
- Jakes, K.S., and Zinder, N.D. (1984). Plasmid ColE3 specifies a lysis protein. *J. Bacteriol.* 157, 582–590.
- James, R., Jarvis, M., and Barker, D.F. (1987). Nucleotide sequence of the immunity and lysis region of the ColE9-J plasmid. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1553–1562.
- James, R., Penfold, C.N., Moore, G.R., and Kleanthous, C. (2002). Killing of *E. coli* cells by E group nuclease colicins. *Biochimie* 84, 381–389.
- Jansen, G.J., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Waai, D. van der, and Degener, E. (1998). *Escherichia coli* as a probiotic? *Infection* 26, 232–233.
- Jeanteur, D., Pattus, F., and Timmins, P.A. (1994). Membrane-bound Form of the Pore-forming Domain of Colicin A: A Neutron Scattering Study. *J. Mol. Biol.* 235, 898–907.
- Johnson, C.L., Ridley, H., Pengelly, R.J., Salleh, M.Z., and Lakey, J.H. (2013). The unstructured domain of colicin N kills *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 89, 84–95.
- Kadner, R.J., Wei, B.-Y., and Köster, W. (1992). Domains of the *Escherichia coli* BtuB Protein Involved in Outer Membrane Association and Interaction with Colicin Translocation Components. In *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, R. James, C. Lazdunski, and F. Pattus, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 255–269.
- Kaufmann, K., and Silman, I. (1983). Proton-induced ion channels through lipid bilayer membranes. *Naturwissenschaften* 70, 147–149.
- Kienker, P.K., Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (2000). Protein Translocation across Planar Bilayers by the Colicin Ia Channel-Forming Domain. *J. Gen. Physiol.* 116, 587–598.
- Konisky, J., and Richards, F.M. (1970). Characterization of Colicin Ia and Colicin Ib PURIFICATION AND SOME PHYSICAL PROPERTIES. *J. Biol. Chem.* 245, 2972–2978.
- Kotloff, K.L., Winickoff, J.P., Ivanoff, B., Clemens, J.D., Swerdlow, D.L., Sansonetti, P.J., Adak, G.K., and Levine, M.M. (1999). Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.* 77, 651–666.

- Krasilnikov, O.V., Yuldasheva, L.N., Nogueira, R.A., and Rodrigues, C.G. (1995). The diameter of water pores formed by colicin Ia in planar lipid bilayers. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica A1* 28, 693–698.
- Krasilnikov, O.V., Da Cruz, J.B., Yuldasheva, L.N., Varanda, W.A., and Nogueira, R.A. (1998). A Novel Approach to Study the Geometry of the Water Lumen of Ion Channels: Colicin Ia Channels in Planar Lipid Bilayers. *J. Membr. Biol.* 161, 83–92.
- Kuhar, I., and Žgur-Bertok, D. (1999). Transcription Regulation of the Colicin KckA Gene Reveals Induction of Colicin Synthesis by Differential Responses to Environmental Signals. *J. Bacteriol.* 181, 7373–7380.
- Kuhar, I., Van Putten, J.P.M., Žgur-Bertok, D., Gaastra, W., and Jordi, B.J.A.M. (2001). Codon-usage based regulation of colicin K synthesis by the stress alarmone ppGpp. *Mol. Microbiol.* 41, 207–216.
- Lahey, J.H., Duche, D., Gonzáles-Mañas, J.-M., Baty, D., and Pattus, F. (1993). Fluorescence Energy Transfer Distance Measurements: The Hydrophobic Helical Hairpin of Colicin A in the Membrane Bound State. *J. Mol. Biol.* 230, 1055–1067.
- Lan, R., Alles, M.C., Donohoe, K., Martinez, M.B., and Reeves, P.R. (2004). Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect. Immun.* 72, 5080–5088.
- Letain, T.E., and Postle, K. (1997). TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 24, 271–283.
- Levisohn, R., Konisky, J., and Nomura, M. (1968). Interaction of Colicins with Bacterial Cells IV. Immunity Breakdown Studied with Colicins Ia and Ib. *J. Bacteriol.* 96, 811–821.
- Lloubès, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C., and Schnarr, M. (1988). LexA repressor induces operator-dependent DNA bending. *J. Mol. Biol.* 204, 1049–1054.
- Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A., and Journet, L. (2001). The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res. Microbiol.* 152, 523–529.
- Lodinová-Zádníková, R., Sonnenborn, U., and Tlaskalová, H. (1998). Probiotics and *E. coli* infections in man. *Vet. Q.* 20 Suppl 3, S78–S81.
- López, M.L., García-Giménez, E., Aguilera, V.M., and Alcaraz, A. (2010). Critical assessment of OmpF channel selectivity: merging information from different experimental protocols. *J. Phys. Condens. Matter* 22, 454106.
- Ludtke, S.J., He, K., Heller, W.T., Harroun, T.A., Yang, L., and Huang, H.W. (1996). Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 13723–13728.
- Maier, E., Reinhard, N., Benz, R., and Frey, J. (1996). Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* 64, 4415–4423.
- Martinez, M.C., Lazdunski, C., and Pattus, F. (1983). Isolation, molecular and functional properties of the C-terminal domain of colicin A. *EMBO J.* 2, 1501–1507.

- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996). An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 11361–11368.
- Mel, S.F., and Stroud, R.M. (1993). Colicin Ia inserts into negatively charged membranes at low pH with a tertiary but little secondary structural change. *Biochemistry (Mosc.)* 32, 2082–2089.
- Mende, J., and Braun, V. (1990). Import-defective colicin B derivatives mutated in the TonB box. *Mol. Microbiol.* 4, 1523–1533.
- Menestrina, G., and Antolini, R. (1981). Ion transport through hemocyanin channels in oxidized cholesterol artificial bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 643, 616–625.
- Mock, M., and Pugsley, A.P. (1982). The BtuB Group Col Plasmids and Homology Between the Colicins They Encode. *J. Bacteriol.* 150, 1069–1076.
- Muga, A., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H., Pattus, F., and Surewicz, W.K. (1993). pH-dependent stability and membrane interaction of the pore-forming domain of colicin A. *J. Biol. Chem.* 268, 1553–1557.
- Nardi, A., Corda, Y., Baty, D., and Duché, D. (2001a). Colicin A Immunity Protein Interacts with the Hydrophobic Helical Hairpin of the Colicin A Channel Domain in the *Escherichia coli* Inner Membrane. *J. Bacteriol.* 183, 6721–6725.
- Nardi, A., Slatin, S.L., Baty, D., and Duché, D. (2001b). The C-terminal half of the colicin A pore-forming domain is active in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* 307, 1293–1303.
- Nelson, A.P., and McQuarrie, D.A. (1975). The effect of discrete charges on the electrical properties of a membrane. I. *J. Theor. Biol.* 55, 13–27.
- Ng, C.L., Lang, K., Meenan, N.A.G., Sharma, A., Kelley, A.C., Kleanthous, C., and Ramakrishnan, V. (2010). Structural Basis for 16S Ribosomal RNA Cleavage by the Cytotoxic Domain of Colicin E3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1241–1246.
- Nikaido, H., and Rosenberg, E.Y. (1981). Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Physiol.* 77, 121–135.
- Niyogi, S.K. (2005). Shigellosis. *J. Microbiol. Seoul Korea* 43, 133–143.
- Niyogi, S.K. (2007). Increasing antimicrobial resistance—an emerging problem in the treatment of shigellosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1141–1143.
- Nogueira, R.A., and Varanda, W.A. (1988). Gating properties of channels formed by colicin Ia in planar lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.* 105, 143–153.
- Padmavathi, P.V.L., and Steinhoff, H.-J. (2008). Conformation of the Closed Channel State of Colicin A in Proteoliposomes: An Umbrella Model. *J. Mol. Biol.* 378, 204–214.
- Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., and Isac, I. (1973). Phase transitions in phospholipid vesicles Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 311, 330–348.

- Pappenheimer, J.R. (1953). Passage of Molecules Through Capillary Walls. *Physiol. Rev.* 33, 387–423.
- Pappenheimer, J.R., Renkin, E.M., and Borrero, L.M. (1951a). Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 167, 13–46.
- Pappenheimer, J.R., Renkin, E.M., and Borrero, L.M. (1951b). Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes; a contribution to the pore theory of capillary permeability. *Am. J. Physiol.* 167, 13–46.
- Parker, M.W., Pattus, F., Tucker, A.D., and Tsernoglou, D. (1989). Structure of the membrane-pore-forming fragment of colicin A. *Nature* 337, 93–96.
- Parker, M.W., Postma, J.P.M., Pattus, F., Tucker, A.D., and Tsernoglou, D. (1992). Refined structure of the pore-forming domain of colicin A at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 224, 639–657.
- Parzen, E. (1962). On Estimation of a Probability Density Function and Mode. *Ann. Math. Stat.* 33, 1065–1076.
- Pattus, F., Martinez, C., Dargent, B., Cavard, D., Verger, R., and Lazdunski, C. (1983). Interaction of colicin A with phospholipid monolayers and liposomes. *Biochemistry (Mosc.)* 22, 5698–5703.
- Pilsl, H., and Braun, V. (1995). Novel colicin 10: assignment of four domains to TonB- and TolC--dependant uptake via the Tsx receptor and to pore formation. *Mol. Microbiol.* 16, 57–67.
- Pilsl, H., and Braun, V. (1998). The Ton system can functionally replace the TolB protein in the uptake of mutated colicin U. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 363–367.
- Pilsl, H., Smajs, D., and Braun, V. (1998). The Tip of the Hydrophobic Hairpin of Colicin U Is Dispensable for Colicin U Activity but Is Important for Interaction with the Immunity Protein. *J. Bacteriol.* 180, 4111–4115.
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (2000). Sulfolobocins, Specific Proteinaceous Toxins Produced by Strains of the Extremely Thermophilic Archaeal Genus *Sulfolobus*. *J. Bacteriol.* 182, 2985–2988.
- Pressler, U., Braun, V., Wittmann-Liebold, B., and Benz, R. (1986). Structural and functional properties of colicin B. *J. Biol. Chem.* 261, 2654–2659.
- Prieto, L., and Lazaridis, T. (2011). Computational studies of colicin insertion into membranes: The closed state. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 79, 126–141.
- Pugsley, A.P. (1984). Genetic analysis of ColN plasmid determinants for colicin production, release, and immunity. *J. Bacteriol.* 158, 523–529.
- Qiu, X.Q., Jakes, K.S., Kienker, P.K., Finkelstein, A., and Slatin, S.L. (1996). Major Transmembrane Movement Associated with Colicin Ia Channel Gating. *J. Gen. Physiol.* 107, 313–328.
- Raymond, L., Slatin, S.L., and Finkelstein, A. (1985). Channels formed by colicin E1 in planar lipid bilayers are large and exhibit pH-dependent ion selectivity. *J. Membr. Biol.* 84, 173–181.

- Renkin, E.M. (1954). Filtration, Diffusion, and Molecular Sieving Through Porous Cellulose Membranes. *J. Gen. Physiol.* **38**, 225–243.
- Riley, M.A. (1993). Molecular Mechanisms of Colicin Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 1380–1395.
- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1992). A Survey of Col Plasmids in Natural Isolates of *Escherichia Coli* and an Investigation into the Stability of Col-Plasmid Lineages. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1345–1352.
- Riley, M.A., and Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol.* **7**, 129–133.
- Riley, M.A., and Wertz, J.E. (2002). BACTERIOCINS : Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 117–137.
- Rosenblatt, M. (1956). Remarks on Some Nonparametric Estimates of a Density Function. *Ann. Math. Stat.* **27**, 832–837.
- Sabirov, R.Z., Krasilnikov, O.V., Ternovsky, V.I., and Merzliak, P.G. (1993). Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes. A novel method of pore size determination. *Gen. Physiol. Biophys.* **12**, 95–111.
- Salles, B., and Weinstock, G.M. (1989). Interaction of the CRP-cAMP complex with the cea regulatory region. *Mol. Gen. Genet. MGG* **215**, 537–542.
- Schein, S.J., Kagan, B.L., and Finkelstein, A. (1978). Colicin K acts by forming voltage-dependent channels in phospholipid bilayer membranes. *Publ. Online* 09 Novemb. 1978 Doi101038276159a0276, 159–163.
- Schroeder, G.N., and Hilbi, H. (2008). Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 134–156.
- Scott, D.W. (1992). *Multivariate Density Estimation: Theory, Practice, and Visualization* (John Wiley & Sons).
- Seddon, J.M. (1990). Structure of the inverted hexagonal (HII) phase, and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* **1031**, 1–69.
- Seeger, H.M., Gudmundsson, M.L., and Heimburg, T. (2007). How Anesthetics, Neurotransmitters, and Antibiotics Influence the Relaxation Processes in Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. B* **111**, 13858–13866.
- Slatin, S.L. (1988). Colicin E1 in planar lipid bilayers. *Int. J. Biochem.* **20**, 737–744.
- Slatin, S.L., Qiu, X.Q., Jakes, K.S., and Finkelstein, A. (1994). Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel. *Nature* **371**, 158–161.
- Slatin, S.L., Duché, D., Kienker, P.K., and Baty, D. (2004). Gating Movements of Colicin A and Colicin Ia Are Different. *J. Membr. Biol.* **202**, 73–83.
- Schramm, E., Mende, J, Braun, V. and Kamp, R.M. (1987). Nucleotide sequence of the colicin B activity gene cba: consensus pentapeptide among TonB-dependent colicins and receptors. *J. Bacteriol.* **169**, 3350–3357.

- Šmajš, D., Pilsl, H., and Braun, V. (1997). Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *J. Bacteriol.* 179, 4919–4928.
- Šmarda, J., Petrželová, J., and Vyskot, B. (1987). Colicin Js of *Shigella sonnei*: classification of type colicin “7.” *Zentralblatt Für Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. Ser. Med. Microbiologie. Infect. Dis. Virol. Parasitol.* 263, 530–540.
- Sobko, A., Kotova, E., Zakharov, S., Cramer, W., and Antonenko, Y. (2006a). Lipid-mediated inactivation of colicin E1 channels by calcium ions. *Biochem. Mosc.* 71, 99–103.
- Sobko, A.A., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2004). Effect of lipids with different spontaneous curvature on the channel activity of colicin E1: evidence in favor of a toroidal pore. *FEBS Lett.* 576, 205–210.
- Sobko, A.A., Kotova, E.A., Antonenko, Y.N., Zakharov, S.D., and Cramer, W.A. (2006b). Lipid Dependence of the Channel Properties of a Colicin E1-Lipid Toroidal Pore. *J. Biol. Chem.* 281, 14408–14416.
- Taneja, N., Mohan, B., Khurana, S., and Sharma, M. (2004). Antimicrobial resistance in selected bacterial enteropathogens in north India. *Indian J. Med. Res.* 120, 39–43.
- Tatsumi, Y., Maejima, T., and Mitsuhashi, S. (1995). Mechanism of tonB-Dependent Transport of KP-736, a 1,5-Dihydroxy-4-Pyridone-Substituted Cephalosporin, into *Escherichia Coli* K-12 Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 613–619.
- Thumm, G., Ölschläger, T., and Braun, V. (1988). Plasmid pColBM-Cl139 does not encode a colicin lysis protein but contains sequences highly homologous to the D protein (resolvase) and the oriV region of the miniF plasmid. *Plasmid* 20, 75–82.
- Tien, H.T. (1966). Thickness and molecular organization of bimolecular lipid membranes in aqueous media. *J. Mol. Biol.* 16, 577–580.
- Tokuda, H., and Konisky, J. (1978). Mode of action of colicin Ia: effect of colicin on the *Escherichia coli* proton electrochemical gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2579–2583.
- Tokuda, H., and Konisky, J. (1979). Effect of colicins Ia and E1 on ion permeability of liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 6167–6171.
- Tory, M.C., and Merrill, A.R. (1999). Adventures in Membrane Protein Topology A STUDY OF THE MEMBRANE-BOUND STATE OF COLICIN E1. *J. Biol. Chem.* 274, 24539–24549.
- Trias, J., and Benz, R. (1993). Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. Demonstration of voltage gating and of negative point charges at the channel mouth. *J. Biol. Chem.* 268, 6234–6240.
- Trias, J., and Benz, R. (1994). Permeability of the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 14, 283–290.
- Tuckman, M., and Osburne, M.S. (1992). In vivo inhibition of TonB-dependent processes by a TonB box consensus pentapeptide. *J. Bacteriol.* 174, 320–323.

- Tyäuble, H., Teubner, M., Woolley, P., and Eibl, H. (1976). Electrostatic interactions at charged lipid membranes. I. Effects of pH and univalent cations on membrane structure. *Biophys. Chem.* 4, 319–342.
- Ud-Din, A., and Wahid, S. (2014). Relationship among *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and their differentiation. *Braz. J. Microbiol.* 45, 1131–1138.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S., and Palmer, M. (1996). Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *EMBO J.* 15, 1857–1864.
- Valeva, A., Siegel, I., Wylenzek, M., Wassenaar, T.M., Weis, S., Heinz, N., Schmitt, R., Fischer, C., Reinartz, R., Bhakdi, S., et al. (2008). Putative identification of an amphipathic alpha-helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation. *Biol. Chem.* 389, 1201–1207.
- Verdiá-Báguena, C., Nieto-Torres, J.L., Alcaraz, A., DeDiego, M.L., Enjuanes, L., and Aguilera, V.M. (2013). Analysis of SARS-CoV E protein ion channel activity by tuning the protein and lipid charge. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1828, 2026–2031.
- Vetter, I.R., Parker, M.W., Tucker, A.D., Lakey, J.H., Pattus, F., and Tsernoglou, D. (1998). Crystal structure of a colicin N fragment suggests a model for toxicity. *Structure* 6, 863–874.
- Davidson, V.L., Brunden, K.R. and Cramer, W.A. (1985). Acidic pH requirement for insertion of colicin E1 into artificial membrane vesicles: relevance to the mechanism of action of colicins and certain toxins., Acidic pH requirement for insertion of colicin E1 into artificial membrane vesicles: relevance to the mechanism of action of colicins and certain toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. Am.* 82, 1386, 1386–1390.
- Waleh, N.S., and Johnson, P.H. (1985). Structural and functional organization of the colicin E1 operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 8389–8393.
- Walker, R.I. (2015). An assessment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* vaccine candidates for infants and children. *Vaccine* 33, 954–965.
- Walker, D., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (2003). Thermodynamic Consequences of Bipartite Immunity Protein Binding to the Ribosomal Ribonuclease Colicin E3†. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 4161–4171.
- Wallis, R., Moore, G.R., James, R., and Kleanthous, C. (1995). Protein-Protein Interactions in Colicin E9 DNase-Immunity Protein Complexes. 1. Diffusion-Controlled Association and Femtomolar Binding for the Cognate Complex. *Biochemistry (Mosc.)* 34, 13743–13750.
- Wendt, L. (1970). Mechanism of Colicin Action: Early Events. *J. Bacteriol.* 104, 1236–1241.
- Wiener, M., Freymann, D., Ghosh, P., and Stroud, R.M. (1997). Crystal structure of colicin Ia. *Nature* 385, 461–464.
- Wilmsen, H.U., Pugsley, A.P., and Pattus, F. (1990). Colicin N forms voltage- and pH-dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Eur. Biophys. J.* 18, 149–158.

Yafuso, M., Kennedy, S.J., and Freeman, A.R. (1974). Spontaneous conductance changes, multilevel conductance states and negative differential resistance in oxidized cholesterol black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* 17, 201–212.

Yajima, S., Nakanishi, K., Takahashi, K., Ogawa, T., Hidaka, M., Kezuka, Y., Nonaka, T., Ohsawa, K., and Masaki, H. (2004). Relation between tRNase activity and the structure of colicin D according to X-ray crystallography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 966–973.

Yang, F., Yang, J., Zhang, X., Chen, L., Jiang, Y., Yan, Y., Tang, X., Wang, J., Xiong, Z., Dong, J., et al. (2005). Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. *Nucleic Acids Res.* 33, 6445–6458.

Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81, 1475–1485.

Zeth, K., Römer, C., Patzer, S.I., and Braun, V. (2008). Crystal Structure of Colicin M, a Novel Phosphatase Specifically Imported by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 283, 25324–25331.

Zuo G., Xu Z., Hao B. (2013) *Shigella* strains are not clones of *Escherichia coli* but sister species in the genus *Escherichia*. *Geno. Prot. Bioinfo.* 11: 61-65.