

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Radek Židek

Studium protein-proteinových interakcí v bakteriální pathogenesi: využití
metodiky PIXL (photo-induced cross-linking)

Study of protein-protein interaction in bacterial pathogenesis: PIXL
(photo-induced cross-linking) methodology

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracoval samostatně pod vedením mého školitele doc. RNDr. Miroslava Šulce, Ph.D. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. 5. 2017

Radek Žídek

Poděkování

Děkuji mému školiteli doc. RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. za jeho vedení, odborné konzultace a velkou trpělivost, kterou se mnou měl. Rovněž velké poděkování patří Mgr. Renatě Ptáčkové, Ph.D. za její rady a nápady, kterých nebylo nikdy dost.

Abstrakt

Gramnegativní bakterie druhu *Bordetella pertussis* jsou původci smrtelného lidského onemocnění označovaného jako pertuse, častěji jako černý kašel. Tyto bakterie produkují adenylátcyklázový toxin (ACT), který se váže na povrch makrofágů a umožňuje vpravit do cytosolu hostitelské buňky přes cytoplazmatickou membránu adenylátcyklázovou doménu (dAC). Abychom mohli studovat kovalentní interakce mezi proteiny pomocí fotochemického zesílení, byl náš studovaný protein exprimován s foto-methioninem (kyselinou L-2-amino-5,5-azi-hexanovou) v kultivačním médiu v bakteriálním kmenu *Escherichia coli* B834 (DE3). Foto-methionin je netoxickým analogem L-methioninu, takže je normálně inkorporován pomocí aminoacyl-tRNA syntház do struktury adenylátcyklázové domény. Maximální míry inkorporace foto-methioninu do struktury dAC bylo dosaženo po optimalizaci celého expresního protokolu. Celková míra inkorporace foto-methioninu do struktury proteinu po optimalizaci zjištěná hmotnostně-spektrometrickou analýzou byla až 80 %. Získaný protein s inkorporovaným foto-methioninem byl izolován. Byly provedeny síťovací experimenty s kalmodulinem a vláknitým hemaglutininem. Při těchto experimentech bylo provedeno jak fotochemické, tak i chemické zesílení. Vzniklé kovalentně zesílené produkty byly rozděleny pomocí SDS-PAGE a vizualizovány barvením stříbrem. Po trypsinizaci vybraných proteinových proužků z gelu byla analyzována jejich identita pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Nebyly pozorovány žádné produkty fotochemického zesílení adenylátcyklázové domény a kalmodulinu, což značí, že se methioniny nenachází na povrchu dAC. Naopak při použití chemického síťovacího činidla EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid) v přítomnosti roztoku Ca^{2+} , Mg^{2+} a ATP došlo ke specifické interakci dAC s CaM.

Klíčová slova: exprese a purifikace rekombinantního proteinu, interakce protein-protein, PIXL (photo-induced cross-linking)

Obsah

1	Seznam zkratk	7
2	Teoretický úvod	10
2.1	<i>Bordetella pertussis</i>	10
2.2	Virulentní faktory	10
2.2.1	Adenylátcyklázový toxin (ACT, CyaA)	11
2.2.1.1	Struktura ACT	12
2.2.2	Vláknitý hemaglutinin	13
2.3	Metody studia protein-proteinových interakcí	14
2.3.1	Metody přímé	14
2.3.1.1	Rentgenová krystalografie	14
2.3.1.2	Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie	15
2.3.1.3	Nativní hmotnostní spektrometrie	15
2.3.2	Metody nepřímé	16
2.3.2.1	Vodík/deuteriová výměna	16
2.3.2.2	Chemické zesíťení	17
2.3.2.3	Fotochemické zesíťení (PIXL)	18
2.3.2.4	Hmotnostní spektrometrie	20
3	Cíle práce	22
4	Materiál	23
4.1	Chemikálie	23
4.2	Bakteriální kmeny	25
4.3	Plazmidy	25
4.4	Přístroje	25
4.5	Materiál	26
5	Metody	27
5.1	Příprava kompetentních buněk	27
5.2	Transformace kompetentních buněk	27
5.3	Izolace plazmidu a stanovení koncentrace cDNA	28
5.4	Příprava média LM9	28
5.5	Příprava vzorků na SDS-PAGE	29
5.6	Příprava gelů na SDS-PAGE	29
5.7	Zobrazení proteinů na SDS-PAGE pomocí CBB-R250	30

5.8	Zobrazení proteinů na SDS-PAGE pomocí barvení stříbrem	30
5.9	Štěpení proteinů v gelu	31
5.10	MALDI-TOF MS.....	31
5.11	Zjištění míry inkorporace pomocí MALDI-TOF MS	32
5.12	Výběr nejvhodnějšího klonu pro expresi proteinu.....	32
5.13	Optimalizace inkorporace	33
5.13.1	Optimalizace teploty produkce	33
5.13.2	Optimalizace „hladovění“	33
5.14	Exprese proteinu.....	34
5.15	Izolace proteinu	34
5.16	Stanovení koncentrace proteinu.....	35
5.17	Síťovací experimenty (chemické zesílení a PIXL)	35
5.17.1	Interakce proteinů dAC-FHA	36
5.17.2	Interakce proteinů dAC-CaM.....	37
6	Výsledky.....	38
6.1	Transformace kompetentních buněk.....	38
6.2	Izolace plazmidu	38
6.3	Exprese proteinu.....	39
6.4	Stanovení míry inkorporace p-Met v buněčné kultuře	43
6.5	Izolace proteinu	45
6.5.1	Izolace proteinu dAC bez p-Met.....	45
6.5.2	Izolace proteinu dAC s p-Met.....	47
6.6	Analytická charakterizace finálního preparátu dAC proteinu..... Chyba! Záložka není definována.	
6.7	Síťovací experimenty.....	52
7	Diskuze.....	56
7.1	Optimalizace inkorporace p-Met do proteinu dAC	56
7.2	Izolace proteinu	57
7.3	XL experimenty	57
8	Závěr.....	59
9	Použitá literatura	60

1 Seznam zkratek

A	absorbance
Å	Ångström, jednotka délky
a. u.	absolutní jednotka (z angl. absolute unit)
AC	adenylátcykláza
ACT	adenylátcyklázový toxin
ADP/ATP	adenosindifosfát/adenozintrifosfát
c	koncentrace (mol.dm ⁻³ , není-li uvedeno jinak)
CaM	kalmodulin
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBB-R250	Coomassie Brilliant Blue-R250
<i>cyaA-E</i>	označení proteinových vzorů příslušný pro gen
CyaA-E	označení příslušného proteinu
Da	Dalton, hmotnostní jednotka
dAC	adenylátcyklázová doména
DTT	1,4-dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
FHA	vláknitý/fibrilární hemaglutinin
<i>fhaB</i>	označení proteinových vzorů pro gen <i>fhaB</i>
HDX	H/D výměna (z angl. H/D exchange)
Hly	hemolyzinová doména
Ile	isoleucin, kyselina 2-amino-3-methylpentanová
int	inteinová doména
IPTG	isopropyl-β-D-1-thiopyranogalaktosid
l	délka dráhy paprsku (cm, není-li uvedeno jinak)
Leu	leucin, kyselina 2-amino-4-methylpentanová
Lys	lysin, kyselina 2,6-diaminohexanová
λ	vlnová délka (nm, není-li uvedeno jinak)
MALDI	desorpce a ionizace laserem za asistence matrice (z angl. matrix)

	assisted laser desorption/ionization)
Met	methionin, kyselina 2-amino-4-(methylsulfanyl)butanová
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
n	látkové množství (mol, není-li uvedeno jinak)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektrometrie
OD₆₀₀	optická denzita měřená při 600 nm
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
Phe	fenylalanin, kyselina 2-amino-3-fenylpropanová
p-Met	foto-methionin, L-2-amino-5,5-azi-hexanová (z angl. photo-methionine)
PIXL	světlem iniciované chemické zesíťení (z angl. photo-induced cross-linking)
rpm	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
RTX toxin	skupina proteinů rozličných funkcí (z angl. repeat in toxin)
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis)
t	čas (s, není-li uvedeno jinak)
TEMED	tetramethylethylendiamin
Thr	threonin, kyselina 2-amino-3-hydroxybutanová
TOF	analyzátor měřící rychlost průletu částice používaný při hmotnostní spektrometrii (z angl. time of flight)
UV	ultrafialová část spektra elektromagnetického záření (z angl. ultraviolet)
V	objem (dm ³ , není-li uvedeno jinak)
Val	valin, kyselina 2-amino-3-methylbutanová
VIS	viditelná část spektra elektromagnetického záření (z angl. visible)
v/v	objemová procenta

w/v

hmotnostní procenta vztažená na objem

2 Teoretický úvod

2.1 *Bordetella pertussis*

Obecně rod *Bordetella* tvoří bakterie, které jsou gramnegativní, nesporulující, někdy polárně se barvící pravidelné kokobacily o velikosti 0,3 až 1,2 μm .¹ Konkrétně *Bordetella pertussis* je nepohyblivá aerobní bakterie. Jejím výhradním hostitelem je člověk, u něhož se projevuje onemocněním označovaným jako pertuse neboli dávivý či černý kašel.² Pertuse je tedy vážné onemocnění respiračního traktu se záchvatovitým (paroxysmálním) nezišitelným kašlem. Onemocnění se šíří při kašli, kýchání či smíchu kapénkovou infekcí. Postihuje především děti a mládívství ve věku mezi 11. a 18. rokem života. Po inkubační době 1-2 týdnů se projeví nejdříve jako běžné nachlazení- rýmou, mírným kašlem, kýcháním a teplotami. Tento stav se označuje jako tzv. katarální stádium. Pacient v tomto stádiu je pro své okolí nejvíce infekční. Po krátkém čase, asi sedmi dnů, dochází k přechodu do tzv. paroxysmálního stádia, jež se projevuje až několikátýdenním hýkavým kašlem. Záchvaty kašle s typickým sípáním při nádechu trvají až několik minut. U pacientů starších bývají projevy mírnější.³

Ochranu proti černému kašli poskytuje vakcína podávaná s protilátkami ještě proti záškrtu a tetanu. Podle odhadů umíralo na černý kašel v USA před zavedením vakcinace ročně 5 až 10 tisíc osob, po zavedení očkování klesl tento počet na 100 lidí ročně. Podle Světové zdravotnické organizace ve světě na černý kašel v roce 2000 zemřelo přes 297 tisíc lidí.² V České republice bylo na počátku listopadu roku 2013 evidováno 880 pacientů nemocných černým kašlem.⁴

Onemocnění je natolik závažné, protože *B. pertussis* má více virulentních faktorů: hemaglutinin, jenž má společně s fimbriemi funkci adhezinu, adenylátcyklázový toxin, hemolyzin a cytotoxin.³ Dokonce i rozpadlé bakterie uvolňují toxin (endotoxin), jenž vyvolává katarální příznaky a dráždí sliznice.⁵ Přímé prokázání přítomnosti *B. pertussis* v mikroskopickém preparátu se provádí imunofluorescenční technikou. Kultivace je oproti této rychlé diagnostické metodě méně spolehlivá.¹

2.2 Virulentní faktory

Virulentní faktory lze rozdělit do dvou skupin podle jejich funkce. Do první skupiny patří faktory ovlivňující invazivitu. Ty pomáhají patogenům v průniku a kolonizaci hostitelského organismu. Ve druhé skupině jsou bakteriální toxiny, jež působí proti imunitnímu systému hostitele.⁵ *B.*

pertussis disponuje celou řadou virulentních faktorů, které jí pomáhají infikovat a kolonizovat hostitelský organismus a interagovat s příslušnými buňkami. ⁶

Virulentní faktory *B. pertussis* lze rozdělit na adheziny a toxiny. Adheziny mají tu funkci, že umožní vazbu bakterie buď na povrch řasinkového epitelu, nebo na povrch fagocytujících makrofágů. Do této skupiny patří například vláknitý hemaglutinin (FHA), proteiny fimbríí a tracheální kolonizační faktor. Do skupiny toxinů patří adenylátcyklázový toxin (ACT), pertusový toxin a dermonekrotický toxin. ⁶

Působením toxinů, jako je pertusový a adenylátcyklázový toxin, dochází při onemocnění černým kašlem k destrukci sliznice dýchacích cest. To často vede až ke katarálnímu zánětu a nekróze sliznic. Pertusový toxin ovlivňuje imunitní mechanismy organismu. Dochází ke zvýšení produkce B a T lymfocytů kostní dřeni, lymfatickými uzlinami a slezinou, což vede k lymfocytóze. Ta je jedním z příznaků černého kašle. *B. pertussis* stimuluje hostitele jeho vlastní adenylátcyklázu právě prostřednictvím pertusového toxinu. Navíc dochází k produkci a uvolňování i vlastní adenylátcyklázy, která vstupuje do savčích buněk, inhibuje aktivitu fagocytů, což umožní rychlejší nástup onemocnění. ⁵ Pertusový toxin se skládá ze dvou podjednotek - z podjednotky A a podjednotky B. Podjednotka A je polypeptid o velikosti 25 kDa. Je to aktivní enzym, konkrétně adenosindifosfát-ribosyl (ADP-ribosyl) transferáza. Její aktivita se projeví až po navázání B podjednotky na buňku. Dochází k přenosu ADP-ribosylové skupiny nikotinamidadeninu (NAD) na inhibiční G-protein (G_i) navázaný na membránu. G_i za běžných podmínek inhibuje adenylátcyklázu, ovšem po ADP-ribosylaci G_i dojde k inaktivaci G_i a stimulaci endogenní adenylátcyklázy. To vede ke zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), které díky jeho funkci druhého posla ovlivňuje řadu signálních drah. ⁷

2.2.1 Adenylátcyklázový toxin (ACT, CyaA)

ACT patří do skupiny toxinů, jenž obsahují v C-koncové části molekuly opakující se sekvence tvořené nonapeptidy. Sekvence jsou bohaté na glycin a kyselinu asparagovou, která tvoří vazebná místa pro Ca^{2+} . Celá skupina takovýchto toxinů je označována jako proteiny rozličných funkcí, zkráceně RTX toxiny (z angl. repeat in toxin). Jejich biologická aktivace je závislá právě na vazbě Ca^{2+} . ⁸ Pro skupinu RTX toxinů je také typický sekreční mechanismus, který umožňuje rozpoznávat sekvenci signálu na C-konci toxinové molekuly. Zde je i nutné, aby došlo k posttranslační modifikaci toxinu pomocí zbytku mastné kyseliny pro jeho aktivaci. ⁹ Pro celou řadu RTX toxinů je typické vytváření pórů v cytoplasmatické membráně hostitelských buněk. ¹⁰

Adenylátcyklázový toxin může být buď vázán na povrchu bakterie pomocí FHA,¹¹ nebo může být secernován pomocí sekrečního aparátu z bakteriálního cytosolu na povrch buněk.¹²

Z lokusu *cya*, jenž je tvořen 5 strukturními geny, začíná exprese CyaA (ACT). Strukturní geny jsou na bakteriálním chromozomu umístěny těsně za sebou. Geny *cyaA*, *cyaB*, *cyaD* a *cyaE* jsou složeny do jednoho operonu. Jejich přepis ze společného promotoru do mRNA probíhá v jednom směru, zatímco přepis *cyaC* probíhá ve směru opačném.¹³ Překladem genu *cyaA* vzniká neaktivní protoxin proCyaA. Ten je aktivován až posttranslační modifikací mastnou kyselinou. Tato modifikace je zajištěna proteinem CyaC, což je produkt genu *cyaC*.¹⁴ CyaC funguje jako acyltransferáza, která přenáší acyl, konkrétně zbytek kyseliny palmitové, na neaktivní protoxin. Na něj je acyl vázán kovalentně přes amidovou vazbu k ε-aminoskupině lyzinů.⁹ Z genu *cyaB* vzniká ATPáza vnitřní membrány (CyaB), z dalších genů vzniká protein CyaD, což je membránový fúzní protein, a CyaE, jenž se podílí na vzniku kanálu membrány a je součástí sekrečního systému.

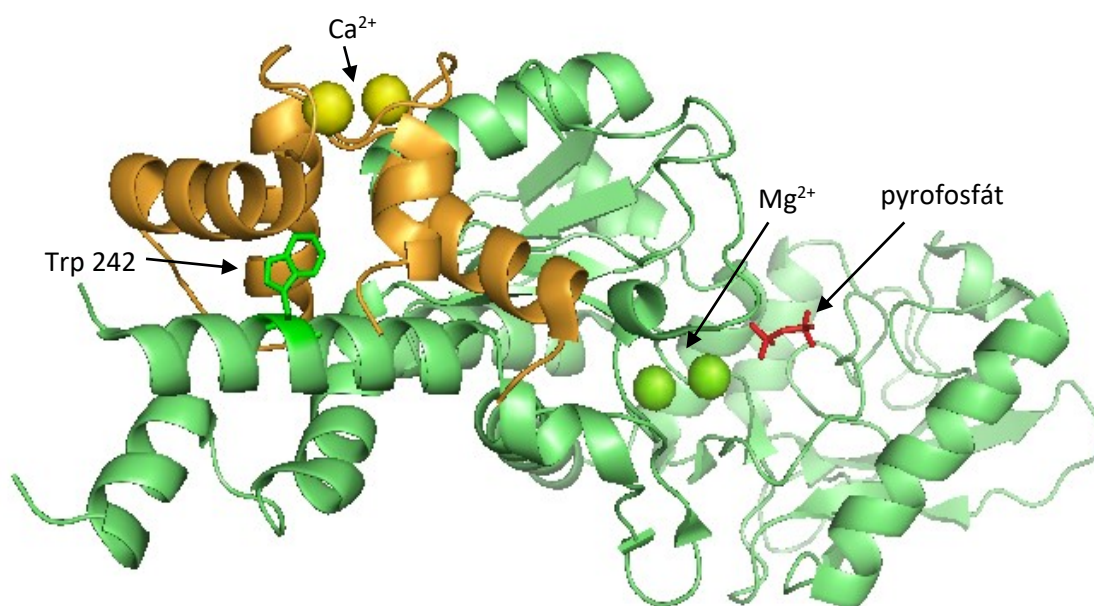
13

2.2.1.1 Struktura ACT

ACT je protein složený ze 1706 aminokyselinových zbytků o hmotnosti 177 kDa. ACT je funkčně rozdělen na dvě části- na adenylátcyklázovou (AC) doménu a na RTX hemolyzinovou doménu (Hly).¹⁵ AC doména (dAC) se nachází na N- konci řetězce CyaA a tvoří ji prvních 400 aminokyselinových zbytků. AC doména je velmi typická, protože se nenachází v žádném jiném RTX toxinu. ACT je schopen dopravovat tuto doménu přímo přes cytoplazmatickou membránu do hostitelských buněk. V okolí zbytku 242. aminokyseliny (tryptofanu) se nachází vazebné místo pro kalmodulin (CaM). Tento 16,7kDa protein je důležitý pro aktivaci adenylátcyklázy. Aktivita dAC se u eukaryotických buněk po navázání CaM zvyšuje více než 1000x.¹⁶ Po aktivaci adenylátcykláza katalyzuje přeměnu nitrobuněčného ATP na cAMP. Komplex AC domény s C-koncem kalmodulinu se podařilo krystalizovat a ze získaných strukturních dat navrhnout model interakce, viz Obr. 1. Aby došlo ke vzájemné interakci obou proteinů, je nutná přítomnost vápenatých a hořečnatých kationtů. Kalmodulin se dvěma navázanými vápenatými kationty je vázán čtyřmi samostatnými oblastmi CyaA s velkou styčnou plochou, která je skryta v této složité struktuře.¹⁷ Vysoká koncentrace cAMP a úbytek ATP vedou k vyřazení činnosti napadených buněk zajišťujících imunitu. Díky působení ACT mohou bakterie kolonizovat dýchací soustavu hostitele, množit se zde a způsobovat virulenci.¹⁸

C-koncová část řetězce CyaA je tvořena hemolyzinovou doménou (Hly). Ta se nachází v oblasti 400. - 1706. zbytku aminokyselin. Úkolem Hly je zabezpečit vazbu CyaA na cytoplazmatickou

membránu hostitelské buňky a umožnit tak transport AC domény do její cytoplasmy.¹⁵ Hly je rozdělena na několik subdomén. Hydrofobní doména obsahuje za sebou stojící hydrofobní aminokyseliny, které mohou vytvořit kationtový selektivní pór uvnitř membrány buňky, pomocí něhož dochází k vylučování draselných iontů z cytosolu, což může vést ke zvýšenému příjmu vody do buňky a následné lýze.¹⁵ Po hydrofobní doméně následuje doména acylační. Ta umožňuje posttranslační úpravu toxinu navázáním acylu.⁹ Mezi 1000. a 1600. zbytkem aminokyselin se nachází doména vázající vápník. Obsahuje 45 opakujících se (repetitivních) sekvencí skládajících se z nonapeptidů, kde se právě nachází vazebná místa pro Ca^{2+} .⁸ Navázáním Ca^{2+} dojde ke konformační změně molekuly CyaA, což je důležité pro přenesení dAC přes cytoplazmatickou membránu do buňky.¹² Vazebná místa pro Ca^{2+} lze rozdělit dle afinity do dvou tříd- na třídu míst s vysokou a nízkou afinitou. Obsazení míst s vysokou afinitou k Ca^{2+} , kam se tyto ionty váží téměř ireverzibilně, je nutné pro vmezeření toxinu do membrány hostitelské buňky. Vazebná místa s nízkou afinitou jsou nutná pro přenos AC domény do cytoplasmy.¹⁹



Obr. 1: **Struktura AC domény s kalmodulem.** C-konec kalmodulinu je znázorněn oranžově, AC doména tmavě zeleně, pyrofosfát červeně, hořečnaté kationty světle zeleně, vápenaté žlutě a tryptofan 242 zeleně. Převzato z PDB (2COL), upraveno v PyMOL.¹⁷

2.2.2 Vlákňitý hemaglutinin

Vlákňitý neboli filamentární hemaglutinin (FHA) je bazický protein nacházející se na povrchu bakterií *B. pertussis*, který může být také produkován do extracelulárního prostoru.

Tento 220kDa protein je produkován strukturním genem *fhaB*.²⁰ FHA podporuje adhezi bakterií na povrchu řasinkového epitelu sliznic horních cest dýchacích, průdušek a průdušnic pomocí adhezinů.⁵

Tripeptid složený z argininu, glycinu a kyseliny asparagové (RGD) nacházející se uvnitř řetězce FHA může mít adherentní charakter. Existenci adherentního charakteru potvrzuje např. jev, kdy po delecii v genu *fhaB*, která obsahovala RGD oblast, došlo ke ztrátě adhezivních vlastností *B. pertussis* k obrveným eukaryotickým buňkám, které nebyly infikovány.²⁰

Pokud osoba prodělala černý kašel v dětském věku, tak protilátky proti vláknitému hemaglutininu postupně mizí, zatímco protilátky proti samotnému toxinu přetrvávají až do dospělosti.⁵ Proto je FHA součástí nových vakcín proti černému kašli.²⁰

2.3 Metody studia protein-proteinových interakcí

Ve většině buněčných procesů hrají hlavní roli specifické nekovalentní komplexy tvořené proteiny. Mezi nekovalentní síly, které se v komplexech uplatňují, patří van der Waalsovy síly, vodíkové můstky a hydrofobní interakce. Proteiny jsou sice schopné fungovat samostatně, ale nejčastěji interagují a spolupracují s ostatními komplexy přes proteinové sítě (z angl. „interactome“), kdy jednotlivé vazby vznikají a znovu zanikají. Odhaduje se, že na jeden protein připadá až pět partnerů schopných interakce. Interakce mezi proteiny jsou důležité pro většinu biologických funkcí (např. buněčná signalizace). Právě výzkum těchto interakcí hraje důležitou roli pro objasnění průběhů nemocí a může být klíčovým impulzem pro nové metody léčby.²¹

2.3.1 Metody přímé

Mezi skupinu přímých metod pro výzkum protein-proteinových interakcí můžeme zařadit celou řadu technik- je to např. rentgenová krystalografie (Xray), nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (NMR) a nativní hmotnostní spektrometrie.

2.3.1.1 Rentgenová krystalografie

Rentgenová krystalografie (Xray) je hlavní technika strukturní biologie zaměřující se na určení prostorového uspořádání proteinu pomocí difrakce rentgenového záření na jeho monokrystalu. Určení 3D struktury (sekundární a terciární) proteinů vede k pochopení, jakým způsobem proteinové molekuly interagují v živých organismech samy se sebou, s nízkomolekulárními ligandy nebo s jinými makromolekulami. Zde Xray umožňuje rozlišení až 1,0 Å v případě

stabilních struktur proteinů (bez flexibilních částí či s nízkou hodnotou teplotního faktoru) a vhodného krystalu. Xray nám také slouží ke zjištění nových postupů při výzkumu mnoha chorob a při vývoji nových léčiv. Získání krystalu vhodného pro difrakční experimenty bývá často časově náročný, a to kvůli velkému množství podmínek, které krystalizaci ovlivňují (např. požadavky na vysokou koncentraci proteinu až 10 mg/ml). Samotnou krystalizaci proteinů navíc nelze předpovědět či simulovat, studium z tohoto důvodu proto trvá několik týdnů a dokonce i let. V proteinové krystalografii jsou důležité zdroje intenzivního rentgenového záření s ohledem na malou uspořádanost a malou velikost základní krystalové buňky. Aby krystaly nebyly velkou radiací poškozeny, provádí se měření za nízkých teplot (100- 150 K).²²

2.3.1.2 Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie

Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (z angl. nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR) patří do spektroskopických metod. Po vystavení atomových jader některých prvků v externím magnetickém poli působení vysokofrekvenčního elektromagnetického záření může dojít k absorpci záření o určitých vlnových délkách. Radiofrekvenční záření je absorbováno pouze atomy s nenulovým magnetickým momentem mající nenulový celkový jaderný spin. Vlnová délka absorbovaného záření závisí na typu vazby v molekule. To nám poskytuje jak kvantitativní, tak kvalitativní údaje. Pozorované spektrum nezávisí pouze na fyzikálních konstantách jádra atomu, ale vypovídá i o chemických vlastnostech okolí atomů v molekulách. Po rentgenové difrakci je NMR druhou nejpoužívanější metodou v oblasti strukturní biologie. Na rozdíl od krystalografie nám NMR přináší informace o struktuře proteinů přímo v roztoku, což je velkou výhodou, neboť lze takto zkoumat i proteiny, které nelze lehce krystalizovat. Pro měření NMR spekter se ale musí připravit značené proteiny ve vysoké koncentraci a ve značném množství, což významně komplikuje využití NMR spektroskopie.²³

2.3.1.3 Nativní hmotnostní spektrometrie

Nativní hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry, MS) je všestranná technika pro testování a charakterizaci různých interakcí. Využívá se jako spolehlivá metoda při výzkumu nekovalentních komplexů. Tato analytická technika, také označovaná jako nekovalentní, nenedenaturující nebo supramolekulární MS, využívá pro ionizaci elektrosprej a přenáší nekovalentní komplexy z roztoku do plynné fáze. Přesné určení molekulární hmotnosti celého a nijak nepozměněného komplexu poskytuje velmi cenné poznatky o interakci biomolekuly, včetně stechiometrie, reverzibility, afinity a polárním příspěvku do vazby. Nativní MS má širokou

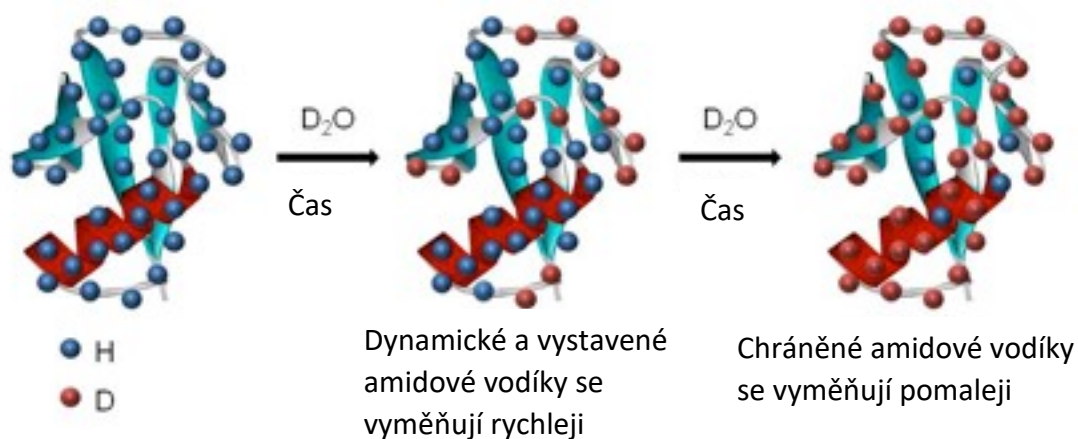
škálu uplatnění. Tuto techniku můžeme využít pro výzkum proteinových komplexů a komplexů proteinů s DNA, ale také pro malé molekuly v komplexu s proteiny či s nukleovými kyselinami. Doplnuje další metody, jako je NMR či rentgenová krystalografie. Ionizace elektrosprejem (ESI) je nejlepším a nejměkčím zdrojem iontů nekovalentních komplexů z vodných roztoků. Zdroje ESI jsou často kombinovány s analyzátory měřící rychlost průletu částice (z angl. time of flight, TOF). Dochází tak ke kombinaci rychlosti, citlivosti, rozlišení a ke zvýšení rozsahu detekovatelných hmotností.²⁴

2.3.2 Metody nepřímé

Metody nepřímé slouží ke studiu proteinů v roztocích za fyziologických podmínek (např. za nízkých koncentracích proteinů). Toto je jejich velkou výhodou oproti metodám přímým. Další výhodou je práce s proteiny o vyšších relativních molekulových hmotnostech. Například u NMR jsme schopni detekovat proteiny maximálně do 50 kDa (v závislosti na rozpustnosti studovaného proteinu a přístrojovém vybavení). Označení „nepřímé metody“ se používá, jelikož ke stanovení proteinů se využívá proces (např. výměny), který vede ke stanovení proteinu nepřímo, oklikou. Řadíme sem například vodík/deuteriovou výměnu, chemické nebo fotochemické zesílení ve spojení s hmotnostní spektrometrií a další.

2.3.2.1 Vodík/deuteriová výměna

Vodík/deuteriová (H/D) výměna (z angl. H/D exchange, HDX) spočívá v časově rozdílné výměně amidového vodíku (H) v závislosti na struktuře a uspořádanosti oblasti proteinu či její přístupnosti molekulám roztoku. V neuspořádaných oblastech, jenž postrádají stabilní vodíkové interakce, dojde k rychlé výměně H za deuterium (D) po vystavení proteinu těžké vodě (D₂O). U těsně složených proteinových struktur dochází k pomalejší výměně izotopů vodíku, viz Obr. 2. Mapování peptidů založené na MS je dobře zavedenou technikou pro měření změn hmotnosti jednotlivých proteinových segmentů. Nedávné pokroky též usnadnily použitelnost HDX-MS pro membránové proteiny a pro popis proteinů o krátké životnosti tvořících meziprodukty. Tato technika se stala významnou pro určení strukturních a dynamických vlastností proteinů v roztoku.²⁵



Obr. 2: Znárodnění H/D výměny, převzato z ²⁶, upraveno.

2.3.2.2 Chemické zesítnění

Metoda chemického zesítnění využívá při protein-proteinových interakcích tvorby kovalentních vazeb mezi proteiny. Ke vzniku kovalentních zesítnění mezi proteiny jsou důležitá mírně reaktivní činidla, jenž interagují nejčastěji s aminoskupinou nebo karboxylovou skupinou proteinů, pomocí níž může dojít k vazbě uvnitř molekuly nebo k propojení různých sousedních molekul. ²⁷ Používaná síťovací činidla lze rozdělit do několika skupin- podle typu reaktivit, ²⁸ podle délky vkládaného raménka (krátké, dlouhé a „s nulovou délkou“), podle typu iniciace (např. fotochemické reakce, chemické reakce atd.).

Do první zmíněné skupiny patří homobifunkční a heterobifunkční činidla. Homobifunkční činidla mají, na rozdíl od heterobifunkčních, stejnou reaktivní skupinu. ²⁸

Další skupinu lze rozdělit na základě délky raménka použitého síťovacího činidla. Tato činidla obsahují dvě reaktivní koncové skupiny, kde se každá skupina váže na jiné místo proteinu. Síťovací činidla s krátkým raménkem (4-8 Å) se obvykle používají při reakcích jako první. Tato činidla se uplatňují hlavně při studiích intramolekulárního zesítnění. Činidla s dlouhým raménkem se využívají při studiích intermolekulárních interakcí. Jejich opakem jsou tzv. činidla s nulovou délkou (z angl. zero length), která mezi jednotlivé složky účastníci se reakce nevkládají žádné raménko. Nejznámějšími činidly, která do této skupiny patří, jsou karbodiimidy- např. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC). U proteinů mohou činidla s nulovou délkou propojit funkční skupiny ve vzájemné vzdálenosti do 5 Å. ²⁹ Síťovací činidla jsou používána pro identifikaci vztahů mezi sousedními proteiny a interakcí mezi ligandy a receptory. ²⁸

Chemické síťování proteinů spojené s hmotnostní spektrometrií (z angl. cross-linking MS, XL-MS) představuje novou cestu ve výzkumu velkých proteinových systémů. Peptidové obohacování umožňuje získání více detailních informací. Během procesu dojde ke „zmrazení“ přechodné interakce tvorbou kovalentních vazeb. Kombinace metod XL-MS tedy poskytuje důležitý pohled jak pro výzkum struktury, tak i organizaci proteinů v široké škále podmínek.³⁰

2.3.2.3 Fotochemické zesíťení (PIXL)

Fotochemické zesíťení (PIXL, z angl. photo-induced cross-linking) lze využít ke studiu protein-proteinových interakcí v živých buňkách. I zde se využívá vzniku nových kovalentních vazeb uvnitř proteinu nebo mezi proteiny. Na rozdíl od chemického zesíťení zde dochází ke vzniku vysoce reaktivních intermediátů *in situ* během ozáření inertních prekurzorů. Hlavní výhodou PIXL je krátká životnost těchto excitovaných intermediátů snižující nespecifitu s následnou tvorbou nových kovalentních vazeb s jakoukoli funkční skupinou (nespecifická vazba vede ke zvýšení počtu XL). PIXL vyžaduje chemické zavedení fotoaktivovatelné skupiny do proteinu, nemusíme tedy přidávat chemické činidlo, jenž by se vázalo například na aminoskupinu proteinu. Další výhodou PIXL je, že umožňuje zachytit krátkodobé, tranzientní, interakce. Značnou nevýhodou je pak vysoká cena fotoaktivovaných aminokyselin, ale obdobně je tomu i u chemického činidla. Ta je kompenzována poměrně nízkým nárokem detekčních technik (např. MS) na množství použitého proteinu. Současně musíme zajistit co nejvyšší míru inkorporace (nahrazení kanonické aminokyseliny strukturálním analogem umožňujícím PIXL) do proteinu (navýšení výtěžku XL).

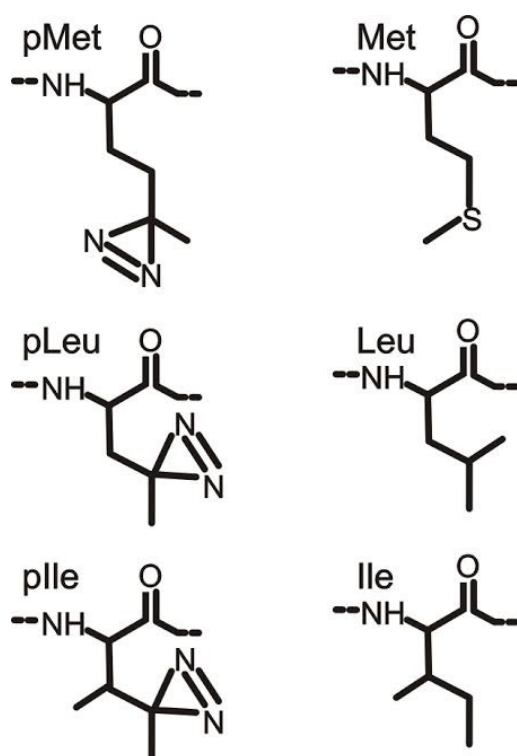
V praxi využíváme diazirinový strukturální analog methioninu, který patří do skupiny tří syntetických aminokyselin, kam patří foto-methionin (kys. L-2-amino-5,5-azi-hexanová, p-Met, z angl. photo-methionine), foto-leucin (kys. L-2-amino-4,4-azi-pentanová, p-Leu, z angl. photo-leucine) a foto-izoleucin (kys. L-2-amino-3-methyl-4,4-azi-pentanová, p-Ile, z angl. photo-isoleucine), viz Obr. 3. Tyto analogy byly pojmenovány podle přirozených aminokyselin, od kterých byly odvozeny. I když nejsou přírodní, tak pro buňky nejsou toxické. Při výzkumu se ukázalo, že nedostatek dvou esenciálních aminokyselin vedl ke snížení biosyntézy proteinů přibližně na 65 %, kultivace buď s p-Leu nebo p-Ile neměla významný efekt, ale kultivace s p-Met biosyntézu proteinů dokonce mohla zvýšit. Tyto aminokyseliny jsou vázány na tRNA a následně včleněny do sekvence proteinů.²⁷

Všechny tři obsahují ve své struktuře diazirinový kruh, který se po absorpci UV záření o vlnové délce 330-370 nm rozpadá, dochází tak k uvolnění molekuly dusíku. Vzniklý karben je

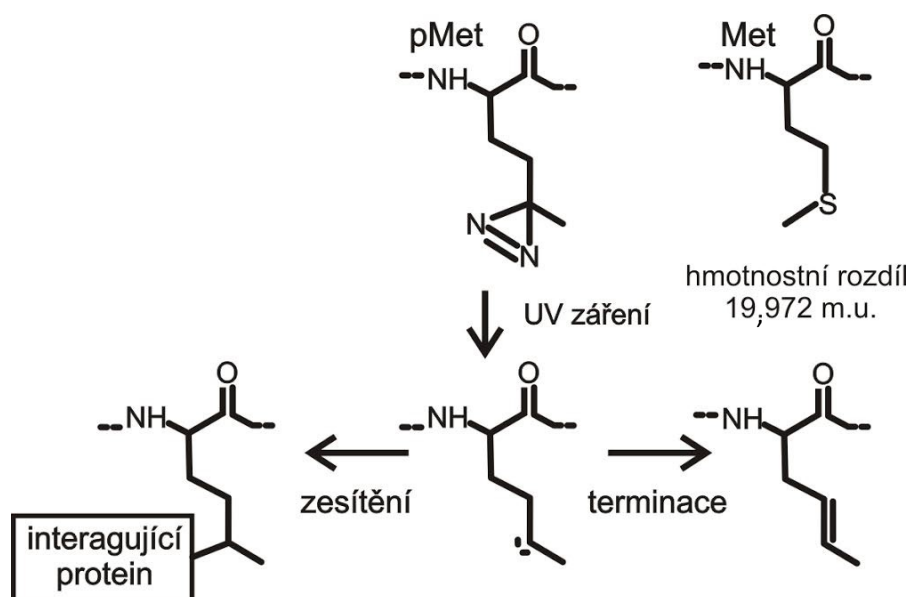
velmi reaktivní- dochází k ataku sousedních molekul nebo ke vzniku terminačního produktu s dvojnou vazbou, viz Obr. 4. Aplikace UV záření, tedy fotolýzy, na proteiny obsahující fotoaktivované aminokyseliny umožňuje tvorbu nových kovalentních vazeb, což vede k intramolekulovému či intermolekulovému zesíťení.²⁷

Produkty zesíťení lze následně analyzovat pomocí elektroforézy na polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE, z angl. sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis) a následným využitím techniky Western blot nebo hmotnostní spektrometrie pro detekci proteinů v kovalentních produktech fotosíťování.³¹

Strukturní analogy vykazují řádově nižší hodnoty disociační konstanty (K_D) pro aminoacyl-tRNA syntázy. Buňky tedy mnohem ochotněji inkorporují do struktury proteinu běžné formy aminokyselin, proto se při kultivacích využívají média (nejčastěji minerální limitní média), ve kterých tyto formy jsou plně nahrazeny strukturními analogy (např. p-Met).²⁷



Obr. 3: **Struktura tří fotoaktivovaných strukturních analogů aminokyselin v porovnání s přirozenými aminokyselinami po inkorporaci v proteinu, převzato a upraveno z²⁷.**



Obr. 4: Změna struktury fotoaktivované aminokyseliny po ozáření UV světlem, převzato a upraveno z ³¹.

2.3.2.4 Hmotnostní spektrometrie

Dostatečně citlivou metodu pro detekci proteinů s obsahem fotoaktivovaných aminokyselin představuje hmotnostní spektrometrie (MS). Ta se obecně používá pro analýzu jednoduchých i složitých vzorků v široké škále oborů. Analýza začíná převodem analytu do plynné fáze s jeho následnou ionizací v iontovém zdroji, pokračuje rozlišením těchto iontů na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) při průchodu magnetickým nebo elektrickým polem v analyzátoru a končí následnou detekcí a kvantifikací na detektoru. Výhodou je možnost jak kvantitativní, tak kvalitativní analýzy, dále nízká spotřeba vzorků pro analýzu a vysoká citlivost. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady a destrukce analyzované části vzorků.

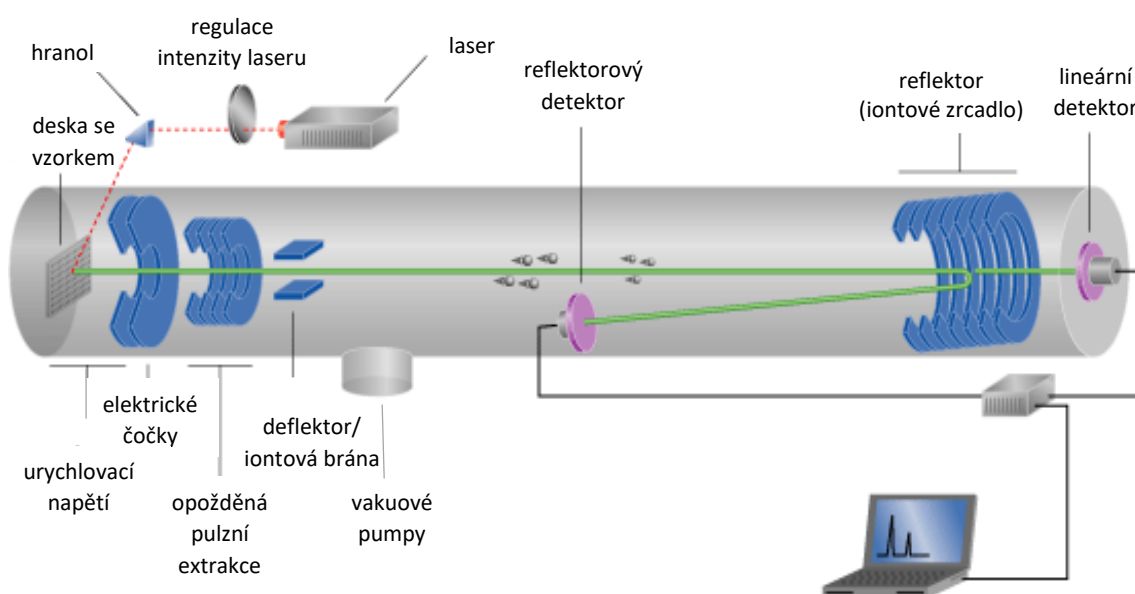
Pro analýzu biomolekul se dnes nejvíce využívají ESI (ionizace elektrosprejem) a MALDI (desorpce a ionizace laserem za asistence matrice, z angl. matrix assisted laser desorption/ionization). Tyto ionizační techniky jsou voleny i proto, že patří mezi nejšetrnější a nejměkčí (nejmenší míra fragmentace analytu).

MALDI je pulzní technika používaná nejčastěji ve spojení s analyzátozem TOF (analyzátoz měřící rychlost průletu částice, z angl. time of flight), viz Obr. 5, ale i s iontovou pastí či kvadrupólovým analyzátozem. Vzorek se u MALDI převrstvuje tzv. MALDI matricí. Ta musí absorbovat laserový pulz, aby mohlo dojít ke společné desorpci s analytem a jeho následné ionizaci. Nejčastěji používaným laserem pro UV MALDI ionizaci je dusíkový UV laser o vlnové délce emitovaného

záření 337 nm.³¹ Matrice pro tento typ laseru jsou nejčastěji aromatické karboxylové kyseliny, jako např. kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová, 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová a 2,5-dihydroxybenzoová.³² Dalšími používanými lasery jsou lasery infračervené. Ty jsou citlivější, ale dražší.

Analyzátoři lze rozdělit na iontové pasti a na průletové analyzátoři. Mezi nejpoužívanější průletové patří TOF a kvadrupólový analyzátor (z angl. quadrupole, Q), který se někdy kombinuje s TOF (qTOF). Princip TOF spočívá v měření času, který potřebují ionty s uděleným stejným momentem hybnosti k překonání vzdálenosti mezi iontovým zdrojem a detektorem. Čím jsou ionty těžší, tím později dopadnou na detektor.

Zvýšení rozlišení TOF analyzátoru provádíme dvěma způsoby. První z nich je použití tzv. pulzní extrakce, jež upravuje nerovnoměrný rozptyl počátečních kinetických energií iontů. Zde dochází k tomu, že extrakční napětí je vloženo až po určité velmi krátké době, během které dojde k jejich energetickému vyrovnání. Ionty o prvotně různých kinetických energiích, ale stejném poměru m/z , pak na detektor dopadnou současně. Druhým způsobem je použití iontového zrcadla (reflektoru). Zde dochází k vyrovnání celkové doby strávené v letové trubici pomocí průletu a ohybu iontového svazku v gradientu napětí/potenciálu v iontovém zrcadle, čímž dochází ke zvýšení rozlišení analyzátoru (účinnější separaci iontů).³¹



Obr. 5: Schéma kombinace MALDI a TOF, převzato a upraveno z³³.

3 Cíle práce

Vzhledem k častějšímu výskytu černého kašle v populaci má tato práce za cíl objasnění zásadních interakcí mezi adenylátcyklázovou doménou (dAC) a dalšími proteiny zodpovědnými za virulenci *B. pertussis*. Následně by mohly být produkovány účinnější vakcíny či léčiva, které by u pacientů působily specifitěji a rychleji, než je tomu v současnosti.

Prvním parciálním cílem je produkce dAC bakteriemi *Escherichia coli* B834 (DE3).

Druhým je inkorporace foto-methioninu do struktury AC domény v co nejvyšší míře.

Třetím krokem je využití proteinu dAC s foto-methioninem ve struktuře pro studium protein-proteinových interakcí pomocí fotochemického zesíťování (systémy dAC-kalmodulin, dAC-FHA).

Na základě strukturní analýzy Xray modelu dAC-CaM (2COL) nepředpokládáme participaci methioninových zbytků na interakci. Cílem je potvrzení tohoto předpokladu.

Posledním cílem je analýza vzniklých kovalentních produktů síťování pomocí kombinace elektroforetických technik (SDS-PAGE) a hmotnostní spektrometrie.

4 Materiál

4.1 Chemikálie

Voda HPLC grade (Merck)

Kvasničný extrakt (OXOID)

Trypton (OXOID)

Purifikovaný agar (OXOID)

Ampicilin, sodná sůl (Roth)

Tetracyklin (Roth)

NaCl (Fluka)

NH₄Cl (LACHEMA)

KH₂PO₄ (Lach-Ner)

Na₂HPO₄·12H₂O (PENTA)

KCl (LACHEMA)

Isopropyl-β-D-1-thiopyranogalaktosid (Sigma Aldrich)

Glycerol (LACHEMA)

Glukosa (Sigma Aldrich)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (Fluka)

CoCl₂·6H₂O (LACHEMA)

FeSO₄·7H₂O (Sigma Aldrich)

ZnSO₄·7H₂O (Fluka)

CuSO₄·5H₂O (LACHEMA, Sigma Aldrich)

MnCl₂·4H₂O (LACHEMA, Merck)

H₃BO₃ (LACHEMA)

CaCl₂·2 H₂O (Fluka)

MgSO₄ (Sigma Aldrich)

Thiamin hydrochlorid (Sigma Aldrich)

L-p-Methionin (Thermo Scientific)

L-Methionin (Sigma Aldrich)

L-Isoleucin (Sigma Aldrich)
L-Valin (United States Biochemical Corporation)
L-Leucin (United States Biochemical Corporation)
L-Lysin (Sigma Aldrich)
L-Fenylalanin (LACHEMA)
L-Threonin (United States Biochemical Corporation)
Dodecylsulfát sodný (Sigma Aldrich)
Peroxidisíran amonný (Sigma Aldrich)
Akrylamid (Roth)
Bis-akrylamid (Serva)
Tetramethylethylendiamin (Serva)
Tris(2-karboxyethyl)fosfin-hydrochlorid (Fluka)
Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific)
TrizmaTH base (Sigma Aldrich)
Coomassie Brilliant Blue-R250 (Sigma Aldrich)
Kyselina octová (LACHEMA)
Acetonitril HPLC grade (Merck)
Ethylmorfolin (Fluka)
Trypsin (Promega)
Jodacetamid (Sigma Aldrich)
Trifluorooctová kyselina (Sigma Aldrich)
 α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (Bruker Daltonics)
Sacharosa (Lach-Ner)
Methanol HPLC grade (Merck)
Hydroxid sodný (PENTA)
1,4-dithiothreitol (Roth)
MgCl₂ (LACHEMA)
Směs inhibitorů proteáz cOmplete, EDTA-free (Roche)
Močovina (LACHEMA)
Kyselina bicinchoninová (BCA solution, Sigma Aldrich)

Hovězí sérový albumin (Sigma Aldrich)

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (Thermo Scientific)

Pyridin (Sigma Aldrich)

Na₂S₂O₃·5H₂O (Sigma Aldrich)

AgNO₃ (Sigma Aldrich)

Formaldehyd (Sigma Aldrich)

Na₂CO₃ (LACHEMA)

K₃Fe(CN)₆ (Sigma Aldrich)

Kalmodulin (Sigma Aldrich)

Adenosintrifosfát (Serva)

4.2 Bakteriální kmeny

Escherichia coli XL-1 (NovagenTH)

Escherichia coli B834 (DE3) (NovagenTH)

4.3 Plazmidy

pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD (New England Biolabs) obsahující gen kódující rezistenci na ampicilin (poskytnut Ing. Adrianou Osičkovou, Ph.D. z Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ AV ČR, v. v. i.)

PMM100 obsahující gen kódující rezistenci na tetracyklin (poskytnut Ing. Radimem Osičkou, Ph.D. z Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů, MBÚ AV ČR, v. v. i.)

4.4 Přístroje

Pipety Eppendorf, Pipetman, Gilson

Spektrofotometr DeNovix DS-11+ Spectrophotometer

Předvážky OHAUS ScoutTH Pro

Laboratorní váhy OHAUS Discovery

Sonikátor ElmaTH ECB

Vakuový rotační koncentrátor LABCONCO CentriVap micro IR

Elektroforetické soupravy BIO-RAD MINI PROTEAN IITH a HoeferTH Dual Gel Caster

Míchačka Variomag Mono Komet

Míchačka IKATH MS1 Minishaker
Stolní minicentrifuga Eppendorf F-45-12-11
Centrifuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R
Třepačka IKATH ROCKER 2D basic
Inkubátor Ultimate Dry Bath Incubator
Inkubátor Gallenkamp economy incubator size 1
Třepačka s inkubátorem IKATH KS 4000i/ic control
Elektrický zdroj Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 (Pharmacia)
Prosvětlovací pult HamaTH LP 555
Sběrač frakcí Fraction Collector Frac-100
Sonikátor Bandelin Sonopuls
Pumpa Gilson Minipuls evolution
MALDI-TOF/TOF Ultra FLEX III (Bruker Daltonics)
Fotolyzační aparatura (Oriol)

4.5 Materiál

QIAPrepTH Spin Miniprep Kit (Qiagen)
Nosič Chitin-Sepharosa (New England Biolabs)
Koncentrátor Amicon Ultra s membránou s „cut off“ 10 kDa (Millipore)
Gradientový gel Mini-PROTEAN TGXTM (4-15 %)
SOC médium (2% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂ a 20mM glukosa)
PBS (10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4)

5 Metody

5.1 Příprava kompetentních buněk

LB médium (0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) trypton a 1% (w/v) NaCl, rozpuštěno v destilované vodě a autoklávováno) o objemu 3 ml ve sterilní 15ml plastové lahvičce bylo zaočkováno zásobní bakteriální suspenzí *Escherichia coli* B834 (DE3) z buněčné konzervy (15% (v/v) glycerol, uskladněno při -80 °C) a inkubováno v inkubátoru IKATH KS 4000i/ic control přes noc při 37 °C a 180 rpm. Do 25 ml LB média bylo přidáno 250 µl této noční kultury a inkubováno při 37 °C do optické hustoty (OD₆₀₀) minimálně 0,5 (měřeno při 600 nm spektrofotometrem DeNovix DS-11+ Spectrophotometer). Následovala inkubace na ledu po dobu 10 min a sklizení buněk na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320 R při 4 °C, 5000 rpm po dobu 5 min. Peleta byla resuspendována v 10 ml sterilního 100mM roztoku CaCl₂ v 10mM Tris-HCl (pH 7,4) a inkubována 10 min na ledu. Pak byl vzorek opět centrifugován při 4 °C, ale tentokrát při 2000 rpm po 10 min. Peleta byla resuspendována v 1 ml sterilního roztoku 50mM CaCl₂, 15% (v/v) glycerolu v 10mM Tris-HCl (pH 7,4) na ledu. Vzorky kompetentních buněk byly zamrazeny po 200µl alikvotách při -80 °C.

Bylo připraveno 250 ml LB agaru (1,5% (w/v) purifikovaný agar, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) trypton a 1% (w/v) NaCl, rozpuštěno v destilované vodě) a sterilizováno v autoklávu. Před přípravou agarových ploten byl tuhý LB agar rozpuštěn ve vodní lázni, ochlazen na 60 °C (při vyšší teplotě může dojít k degradaci teplotně labilního antibiotika), k němu přidáno příslušné množství sodné soli ampicilinu (zásobní koncentrace 100 mg/ml) a tetracyklinu (zásobní koncentrace 5 mg/ml), aby bylo dosaženo koncentrace finální 100 µg/ml u ampicilinu, 5 µg/ml u tetracyklinu, a potřebné množství této směsi rozlito do jednotlivých Petriho misek.

5.2 Transformace kompetentních buněk

Transformace kompetentních buněk proběhla formou teplotního šoku. Vzorky kompetentních buněk v mikrozkrumkách byly volně rozmrazeny na ledu. K 50 µl buněk bylo přidáno 0,5 µl roztoku plazmidů (pTYB2 *cyaA-1-384-int-CBD* obsahující gen kódující rezistenci na ampicilin nebo PMM100 obsahující gen kódující rezistenci na tetracyklin). Následovala inkubace 30 min na ledu, teplotní šok při 42 °C po dobu 90 s v inkubátoru Ultimate Dry Bath Incubator a pak rychlé umístění na led na 3 min. Poté k buňkám bylo přidáno 0,5 ml LB média a vzorky umístěny do třepačky s inkubátorem při 37 °C a 180 rpm na 110 min. 200 µl vzorků bylo vyseto na agarové

plotny s antibiotiky a po vsáknutí byly plotny inkubovány přes noc v inkubátoru Gallenkamp economy incubator size 1 při 37 °C. Agarové plotny s narostlými bakteriálními koloniemi byly skladovány při 4 °C v temnu.

5.3 Izolace plazmidu a stanovení koncentrace cDNA

Plazmid pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD byl izolován pomocí sady QIAprep[™] Spin Miniprep Kit. Bylo postupováno podle návodu dodaného výrobcem. Koncentrace finálního preparátu plazmidové DNA byla stanovena spektrofotometrem DeNovix DS-11+ Spectrophotometer, kde bylo nastaveno měření koncentrace z mikroobjemu, což znamená, že na místo k tomu určené byla nanesena kapka vzorku o objemu 2 µl. Na přístroji byla pro stanovení koncentrace dvouvláknové DNA nastavena vlnová délka 260 nm. Dále byl určen poměr A_{260}/A_{280} pro zjištění čistoty preparátu. Jako slepý vzorek posloužila deionizovaná voda.

5.4 Příprava média LM9

LM9 je označení pro limitní médium, někdy označované i jako minerální médium, které tvoří devět skupin látek či látek samotných. K tomuto médiu se methionin nebo jeho strukturní analog p-Met přidává až později. Médium o celkovém objemu 300 ml bylo připraveno smícháním 60 ml M9 (42mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 18mM NH₄Cl, 8,6mM NaCl, sterilizace v autoklávu), 6 ml 0,4% (w/v) glukosy (rozpuštěno ve sterilní vodě, filtrováno přes bakteriální filtr GE Healthcare Life Sciences Whatman[™] Syringe Filter 13 mm), 1,5 ml 5mM MgSO₄ (rozpuštěno ve sterilní vodě, sterilizace v autoklávu), 3 ml 0,01% (w/v) vitamínu B₁ (thiamin hydrochlorid, rozpuštěno ve sterilní vodě, filtrováno přes bakteriální filtr GE Healthcare Life Sciences Whatman[™] Syringe Filter 13 mm), 30 ml směsi aminokyselin (50 mg/l L-Ile, L-Val, L-Leu, 100 mg/l L-Lys, L-Phe, L-Thr, rozpuštěno ve sterilní vodě, filtrováno přes bakteriální filtr GE Healthcare Life Sciences Whatman[™] Syringe Filter 13 mm), 300 µl 1000x koncentrovaného roztoku kovů (80,6mM EDTA, 2,15mM CoCl₂x6H₂O, 92,5mM FeSO₄x7H₂O, 1,56mM ZnSO₄x7H₂O, 13,5mM CuSO₄x5H₂O, 10,6mM MnCl₂x4H₂O, 1,62mM H₃BO₃, pH 7,5, sterilizace v autoklávu) a 300 µl ampicilinu o zásobní koncentraci 100 mg/ml (rozpuštěno ve sterilní vodě, filtrováno přes bakteriální filtr GE Healthcare Life Sciences Whatman[™] Syringe Filter 13 mm). Celý roztok byl následně doplněn na 300 ml sterilní deionizovanou vodou.

5.5 Příprava vzorků na SDS-PAGE

Vzorky na SDS-PAGE z rostoucí expresní buněčné kultury byly asepticky odebrány po 0,5 ml vzorku do mikrozkuřavky. Vzorek byl centrifugován na stolní minicentrifuze Eppendorf F-45-12-11 po dobu 5 min při 5000 rpm. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, peleta resuspendována v 50 μ l destilované vody a vzorek uskladněn při -20 °C. Po rozmrazení bylo k suspenzi přidáno 12,5 μ l 5x koncentrovaného redukujícího pufru (0,25% (w/v) bromfenolová modř, 10% (w/v) SDS, 10% (w/v) 2-merkaptoethanol, 20% (v/v) glycerol, 30mM Tris-HCl, pH 6,8), suspenze byla povařena 5 min a krátce centrifugována. Do každé jamky na 8% (resp. 12%) polyakrylamidovém gelu bylo následně pipetováno po 20 μ l vzorku. 4x ředěný Page Ruler Broad Range Unstained Protein Ladder sloužil jako standard. Do neobsazených jamek byl pipetován roztok vody a redukujícího pufru, jenž sloužil jako slepý vzorek. Na přístroji Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 byl nastaven limitní proud 20 mA na jednu desku gelu a limitní napětí 200 V.

5.6 Příprava gelů na SDS-PAGE

Gely pro SDS-PAGE byly připraveny o různých koncentracích (6, 8, 10 nebo 12%). Očištěná skla byla pro nalití gelu vložena do stojánku a upevněna. V kádince byl podle Tab. 1 připraven dělicí gel (zásobní roztoky byly destilovaná voda, 30% (w/v) směs akrylamidu a bis-akrylamidu, 1,5M Tris-HCl (pH 8,8), 10% (w/v) dodecylsulfát sodný (SDS), tetramethylethylendiamin (TEMED) a 10% (w/v) peroxidisíran amonný), který byl následně napipetován mezi skla. Dělicí gel byl převrstven destilovanou vodou. Po zatuhnutí gelu byla destilovaná voda odstraněna. V kádince byl podle návodu připraven 3% zaostřovací gel (destilovaná voda, směs 28,2% (w/v) akrylamidu a 1,8% (w/v) bis-akrylamidu, 1,0M Tris-HCl (pH 6,8), 10% (w/v) dodecylsulfát sodný, TEMED a 10% (w/v) peroxidisíran amonný) a poté napipetován na gel dělicí. Do zaostřovacího gelu byla zasunuta šablona hřebenu vzorkových jamek. Po zatuhnutí gelu byla šablona vyjmuta, jamky propláchnuty destilovanou vodou a skla s gelem umístěna do elektroforetické aparatury BIO-RAD MINI PROTEAN IITH nebo HoeferTH Dual Gel Caster. Do aparatury byl nalit elektroforetický pufr (14,4 g/l glycinu, 3g/l Tris-HCl a 10 ml 10% (w/v) dodecylsulfátu sodného).

Tab. 1: Složení 5 ml dělicího a 1 ml zaostřovacího gelu.

druh gelu (%)	H ₂ O (ml)	1,5M Tris-HCl (pH 8,8) (ml)	1,0M Tris-HCl (pH 6,8) (ml)	směs akrylamidu a bis- akrylamidu (ml)	10% SDS (μl)	TEMED (μl)	10% peroxidisíran amonný (μl)
3	0,68	-	0,13	0,17	10	1	10
6	2,6	1,3	-	1,0	50	4	50
8	2,3	1,3	-	1,3	50	3	50
10	1,9	1,3	-	1,7	50	2	50
12	1,6	1,3	-	2,0	50	2	50

5.7 Zobrazení proteinů na SDS-PAGE pomocí CBB-R250

Po ukončení elektroforézy byl gel přenesen do barvicího roztoku Coomassie Brilliant Blue-R250 (0,5 g Coomassie Brilliant Blue-R250, 90 ml vody, 90 ml methanol, 20 ml kyselina octová) a inkubován na kývačce IKATH ROCKER 2D basic jednu hodinu. Následně byl barvicí roztok odstraněn a nahrazen odbarvovacím roztokem (10% (v/v) kyselina octová, 35% (v/v) ethanol, 55% (v/v) voda) a umístěn znovu na kývačku. Po dostatečném odbarvení pozadí byl gel umístěn do 1% (v/v) roztoku kyseliny octové a uložen do temna a chladu.

5.8 Zobrazení proteinů na SDS-PAGE pomocí barvení stříbrem

Další možností citlivějšího zobrazení proteinů na SDS-PAGE je postup využívající dusičnan stříbrný. Gel po elektroforéze byl vložen do 50 ml fixačního roztoku (50% (v/v) methanol, 12% (v/v) kyselina octová, 25 μl 37% (v/v) formaldehydu). Následně byl gel promýván 3x po 5 min 50% (v/v) ethanolem, pak bylo přidáno na 1 min Na₂S₂O₃.5H₂O (0,1 g/50 ml) a gel promyt 3x po dobu 20 s vodou. Na 20 min byl přidán roztok AgNO₃ (0,1 g/50 ml) s 37% formaldehydem (37,5 μl/50 ml). Tento roztok byl odstraněn a gel promyt 2x po 20 s vodou. Vyvíjení gelu bylo provedeno roztokem Na₂CO₃ (3 g/50 ml) s 37% formaldehydem (25 μl/50 ml) a Na₂S₂O₃.5H₂O (2 mg/50 ml). Gel byl poté rychle promyt vodou a vyvíjení zastaveno 1,5% (w/v) roztokem EDTA.

5.9 Štěpení proteinů v gelu

K lepšímu rozlišení proužků byl gel na skleněné desce umístěn na prosvětlovací pult HamaTH LP 555. Příslušný proteinový proužek AC domény s p-Met byl z polyakrylamidového gelu vyříznut skalpelem, podélně rozříznut a nakrájen na kostičky o objemu 1-2 mm³. Ty byly přeneseny do 0,5ml mikrozkušavky s 50 µl acetonitrilu a 50 µl 100mM ethylmorfolinu (pH 8,1) pro odbarvení Coomassie Brilliant Blue-R250. Mikrozkušavky byly vloženy na 10 min do sonikátoru ElmaTH ECB, následně krátce centrifugovány. Takto bylo postupováno dvakrát za sebou. Po barvení gelu pomocí stříbra byly kostičky gelu přeneseny do odbarvovacího roztoku K₃Fe(CN)₆ (10 mg/ml) a Na₂S₂O₃ (25 mg/ml) smíchaného v poměru 1:1 a zde inkubovány po dobu 10 min. Následovalo promývání destilovanou vodou 3x po 5 min a sonikace do úplného odstranění odbarvovacího roztoku. Následně byly již všechny vzorky promyty 100 µl acetonitrilu. Pro modifikaci cysteinů bylo přidáno 50 µl roztoku 30mM tris(2-karboxyethyl)fosfinhydrochloridu ve 100mM ethylmorfolinu (pH 8,1), inkubováno 20 min při 70 °C. Po inkubaci byly vzorky opláchnuty 100 µl acetonitrilu, bylo přidáno 50 µl roztoku 30mM jodacetamidu ve 100mM ethylmorfolinu (pH 8,1) a vzorky byly inkubovány 60 min v temnu při laboratorní teplotě. Následovalo částečné odstranění solí a nízkomolekulárních kontaminantů trojitým promytím 100 µl acetonitrilu a pak stejným objemem vody, nakonec 100 µl acetonitrilu a stejným objemem 50% (v/v) roztoku acetonitrilu. Vzorky byly vysušeny 10 min při 37 °C na vakuovém rotačním koncentrátoru LABCONCO CentriVap micro IR. Ke vzorkům bylo přidáno 20 µl roztoku 25mM ethylmorfolinu (pH 8,1) a 5% (v/v) acetonitrilu s 0,5 µl trypsinu (zásobní koncentrace 100 µg/ml). Vzorky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

5.10 MALDI-TOF MS

Po štěpení proteinu trypsinem přes noc došlo k zastavení reakce přidáním roztoku acetonitrilu (finální koncentrace 30 % (v/v)) a kyseliny trifluoroctové (finální koncentrace 0,1 % (v/v)), následovala 15min sonikace a krátká centrifugace na stolní minicentrifuze Eppendorf F-45-12-11. Na terč MALDI-TOF bylo nanášeno 0,5 µl vzorku v 30% (v/v) acetonitrilu a 0,1% (v/v) kyselině trifluoroctové. Po zaschnutí byl vzorek převrstven 0,5 µl roztoku kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové. Ten byl připraven rozpuštěním 5 mg/ml kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové v 50% (v/v) acetonitrilu a 0,05% (v/v) kyselině trifluoroctové. Hmotnostní spektra vzorků byla změřena pomocí MALDI-TOF Ultra FLEX III v programu flexControl v reflexním modu s dusíkovým laserem (suma 2000 pulzů laseru). Spektra vzorků byla měřena v rozsahu 580-5000 *m/z* s deflexí

iontů do 600 Da. Monoizotopy standardu PepMix II (Bruker Daltonics) byly měřeny v rozmezí od 757 do 3147 m/z s využitím kvadratické kalibrace. Nastavení parametrů přístroje: napětí na čočce 1 bylo 25 kV, na čočce 2 21,6 kV, na reflektoru 1 26,3 kV a na reflektoru 2 14,05 kV.

5.11 Zjištění míry inkorporace pomocí MALDI-TOF MS

Použitím MALDI s dusíkovým laserem (337 nm) k analýze inkorporace fotoaktivovaných aminokyselin v řetězci proteinu došlo k rozpadu diazirinového kruhu za uvolnění molekuly dusíku. Vzniklý terminační produkt je o 19,972 hmotnostních jednotek (m. u.) menší, než produkt s přírodní aminokyselinou, viz Obr. 4. Porovnání ploch pod křivkou odpovídajících oběma signálům v součtu všech uložených spekter bylo použito ke stanovení relativní míry inkorporace fotoaktivovaných aminokyselin do daného proteinu.³¹

5.12 Výběr nejvhodnějšího klonu pro expresi proteinu

Pro expresi proteinu byl použit bakteriální klon *Escherichia coli* B834 (DE3) se samotným plazmidem pTYB2 *cyaA-1-384-int-CBD* s rezistencí na ampicilin (klon 1). Druhým použitým klonem byl také klon *E. coli* B834 s plazmidy pTYB2 a PMM100 s rezistencí na ampicilin a tetracyklin (klon 2 a 3). Tři Erlenmeyerovy baňky s 30 ml LB média s ampicilinem (finální koncentrace 100 $\mu\text{g/ml}$) a dvě ještě s tetracyklinem (5 $\mu\text{g/ml}$) byly zaočkovány 300 μl příslušné noční kultury a kultivovány při 37 °C a 180 rpm v třepačce s inkubátorem IKATH KS 4000i/ic control do OD_{600} přibližně 1,0. Z nočních kultur byly připraveny glycerolové konzervy (140 μl buněčné kultury a 60 μl 50% (v/v) glycerolu) a zamraženy při -80 °C. Následně byly kultury centrifugovány 5 min při 5000 rpm a 19 °C, supernatant slit, pelety resuspendovány a promyty v 30 ml fosfátového pufru (PBS, z angl. phosphate buffered saline). Po další centrifugaci byl supernatant slit a pelety resuspendovány v 30 ml M9 média s příslušnými antibiotiky. V plastové nádobce bylo ponecháno 5 ml kultury s M9 médiem, 25 ml kultury s médiem bylo převedeno do Erlenmeyerovy baňky a vše vloženo na 15 min do inkubátoru „hladověť“ při 37 °C. Následovně byl k 5 ml kultury přidán roztok Met (finální koncentrace 50 mg/l), k 25 ml kultury byl přidán roztok p-Met (30 mg/l), po dalších 15 min kultivace byl přidán roztok isopropyl- β -D-1-thiopyranogalaktosid (IPTG), jehož konečná koncentrace byla 0,5mM. Z kultur byly ve stanovenou dobu odebírány vzorky pro elektroforézu. U vzorků byla měřena OD_{600} . Po inkubaci byly kultury centrifugovány 5 min při 8000 rpm a 4 °C. Pelety byly zamraženy při -20 °C.

5.13 Optimalizace inkorporace

5.13.1 Optimalizace teploty produkce

Z agarové plotny s kmenem *E. coli* B834 (DE3) transformovaným plazmidem pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD byly náhodně špičkou vypíchnuty 3 kolonie a zaočkovány do 15 ml LB média s 15 μ l ampicilinu (zásobní koncentrace 100 mg/ml) ve třech plastových lahvičkách. U druhé agarové plotny se stejným kmenem transformovaným plazmidy pTYB2 a PMM100 bylo postupováno stejně, do LB média bylo kromě ampicilinu přidáno navíc antibiotikum tetracyklin (zásobní koncentrace 5 mg/ml). Po noční kultivaci při 37 °C a 180 rpm bylo z každé plastové lahvičky odebráno po 1 ml bakteriální kultury a zaočkováno vždy do jedné 500ml Erlenmeyerovy baňky se 100 ml LB média a 100 μ l ampicilinu. U druhé kultury bylo postupováno stejně, akorát navíc bylo do LB média přidáno antibiotikum tetracyklin. Takto bylo kultivováno do OD₆₀₀ přibližně 1,0. Následovala indukce exprese přidáním roztoku IPTG (finální koncentrace 0,5mM) pro indukci exprese proteinu. Kultury byly kultivovány již při 30 °C přes noc. Průběžně z nich byly odebírány vzorky po 0,5 ml na SDS-PAGE. Kultury byly centrifugovány a pelety zamrazeny při -20 °C.

Posledním postupem optimalizace „hladovění“ (odstranění methioninu) bylo zvýšení počtu promytí buněčné pelety PBS na 3x před resuspendací buněk v 30 ml M9 média. Produkce proteinu a 15min „hladovění“ před přidávkem p-Met a IPTG probíhaly při 30 °C. Průběžně byly odebírány vzorky na SDS-PAGE. Po 25 hodinách byly kultury centrifugovány (5 min, 8000 rpm, 4 °C) a pelety resuspendovány v roztoku A s 20% (w/v) sacharosou a kultivovány při 4 °C 20 min. Po centrifugaci byly pelety zamrazeny a uskladněny při -20 °C.

5.13.2 Optimalizace „hladovění“

Dvě 250ml Erlenmeyerovy baňky s 30 ml LB média a antibiotiky byly zaočkovány noční kulturou jako v 5.13.1 a kultivovány při 37 °C do OD₆₀₀ přibližně 1,0. Následně byly kultury centrifugovány 5 min při 5000 rpm a 21 °C. Pelety byly 2x promyty PBS a pak resuspendovány v 30 ml média M9. V 250ml Erlenmeyerových baňkách kultury „hladověly“ (v rostoucím médiu bez methioninu) přes noc při 30 °C a 180 rpm. Po přidání roztoku p-Met byly kultivovány ještě 30 min před přidávkem IPTG. Produkce probíhala při 37 °C. Průběžně byly odebírány vzorky na elektroforézu. Kultury byly sklizeny po cca 25 hod a zamrazeny.

5.14 Exprese proteinu

Po optimalizaci produkce dAC s p-Met (teplota produkce 30 °C, 15min „hladovění“, klon *E. coli* B834 (DE3) s plazmidem pTYB2) mohl být protein produkován ve větším množství pro jeho izolaci. Z noční kultury bylo zaočkováno 50 ml LB média s ampicilinem v šesti 250ml Erlenmeyerových baňkách. Kultury ve 3 baňkách byly kultivovány po celou dobu pouze v LB médiu. Při OD₆₀₀ okolo 1,0 byly sklizeny kultury ze zbylých 3 baňek, 3x promyty 30 ml PBS a centrifugovány 5 min při 4 °C a 5000 rpm. Pelety byly resuspendovány v 50 ml M9 média s antibiotikem. Po 15min inkubaci při 30 °C byl přidán roztok p-Met a po dalších 15 min bylo přidáno IPTG. Průběžně byly odebírány vzorky na SDS-PAGE. Kultury byly centrifugovány 5min při 4 °C a 8000 rpm po 6 hodinách produkce proteinu. Pelety byly resuspendovány v roztoku A (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4) s 20% (w/v) sacharosou a kultivovány při 4 °C po dobu 20 min. Následně byly kultury znovu centrifugovány a pelety zamraženy a uskladněny při -20 °C.

5.15 Izolace proteinu

Bakteriální pelety s exprimovaným proteinem získané 5min centrifugací při 4 °C a 8000 rpm na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320 R byly rozmraženy za laboratorní teploty, následně k první z nich bylo přidáno 20 ml 0,5mM roztoku MgCl₂, do kterého byla nejprve přidána jedna tableta směsi inhibitorů proteáz cOMplete (EDTA-free). Pelety byly postupně resuspendovány v roztoku, slity do jedné plastové nádoby a uloženy cca na 10 min na led. Zbytky pelet byly vymyty 20 ml roztoku A (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4) a přidány k předchozím 20 ml. Vzniklá suspenze byla následně sonikována na ledu po dobu 30 s a 1minutovými pauzami sonikátorem Bandelin Sonopuls celkem 4x při nastaveném výkonu 60 W. Po rozbití buněk byla suspenze centrifugována na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320 R po dobu 10 min při 4 °C a 9000 rpm. Z pelety a supernatantu byly pipetou odebrány vzorky po 50 µl pro elektroforézu. Vzniklý supernatant byl znovu za stejných podmínek centrifugován. Kolona o průměru 0,8 cm a délce 6 cm naplněná 7 ml Chitin-Sepharosy (New England Biolabs) byla nejprve promyta vodou, ekvilibrována 50 ml roztoku A (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4) a následně na ni byl nanesen vzorek. Pomocí pumpy Gilson Minipuls evolution s průtokem 0,7 ml za minutu. Exprimovaný protein by se měl na koloně zachytit, protože se jedná

o fúzní protein dAC a domény vázající chitin (CBD, z angl. chitin binding domain). Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml roztoku A. Na kolonu bylo následně naneseno cca 6 ml 100mM 1,4-dithiothreitolu (DTT) v roztoku A. Kolona byla umístěna přes noc do 4 °C. Následující den byl z kolony eluován roztok s proteinem pomocí 50mM DTT v roztoku A. Frakce byly jímány pomocí sběrače frakcí Fraction Collector Frac-100 po 1,5 ml. Po eluci asi 30 ml roztokem DTT byla kolona promyta 50 ml roztoku A, 50 ml deionizované vody a následně cca 50 ml 0,3M NaOH. Z frakcí byly odebrány vzorky na elektroforézu. Podle výsledku SDS-PAGE byly frakce s nejvyšším obsahem dAC spojeny a koncentrovány na centrifuze Hettich Zentrifugen Universal 320 R pomocí koncentrátoru Amicon Ultra s membránou s „cut off“ 10 kDa. Vzorek o objemu 7 ml byl následně dialyzován proti přibližně 800 ml roztoku B (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,4) s mícháním po dobu tří hodin. Po této době byl preparát dialyzován proti 1,2 l nového roztoku B přes noc. Po dalším koncentrování byl finální preparát zamražen při -80 °C.

5.16 Stanovení koncentrace proteinu

Stanovení koncentrace proteinu bylo provedeno pomocí bicinchoninové kyseliny. Nejprve byly připraveny standardy, k jejichž přípravě posloužil hovězí sérový albumin (BSA). Zvolené koncentrace BSA v roztocích byly 0,1, 0,2, 0,5 a 1,0 mg/ml. Na mikrotitrační destičku bylo naneseno 5 µl vody (slepý vzorek), naředěných vzorků a standardů vždy ve dvojicích. Do každé jamky bylo přidáno 95 µl reakčního činidla, které bylo připraveno smícháním roztoku bicinchoninové kyseliny (BCA solution I, Sigma Aldrich) a 4% (w/v) roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (BCA solution II, Sigma Aldrich) v poměru 49:1. Takto připravené vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C v inkubátoru Gallenkamp economy incubator size 1. Absorbance vzorků byla měřena na spektrofotometru DeNovix DS-11+ Spectrophotometer při vlnové délce 562 nm. Hodnoty stanovené A_{562} roztoků BSA posloužily pro tvorbu kalibrační křivky pro stanovení koncentrace proteinu ve vzorcích.

5.17 Síťovací experimenty (chemické zesíťení a PIXL)

Preparát proteinu dAC s p-Met byl dále použit pro výzkum interakcí s proteiny, konkrétně s vláknitým hemaglutininem (FHA) a kalmodulinem (CaM).

5.17.1 Interakce proteinů dAC-FHA

Nejprve proběhl experiment, kdy FHA (o zásobní koncentraci 0,7 mg/ml) byl smíchán s dAC s p-Met v molárním poměru 1:1, 1:2 a 1:5, viz Tab. 2. K reakční směsi bylo přidáno ještě 10 μ l roztoku B (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, pH 7,4). Fotolýza probíhala 3 min fotolyzační aparaturou Oriol, kdy byl vzorek v křemenné kapiláře umístěné v pyrexové kyvetě a chlazen vodou. Ze všech vzorků byla připravena 6% SDS-PAGE.

Tab. 2: Složení směsi pro fotolýzu.

voda (μ l)	FHA (μ l)	dAC s p-Met (μ l)	roztok B (μ l)
3,5	6,5	-	10
9	-	0,75	10
3	6,5	0,75	10
1,5	6,5	1,42	10
0	6,5	3,57	10

Jako kontrola bez fotolýzy posloužila směs FHA a dAC s p-Met v poměru 1:2. Mimo fotochemického zesílení bylo použito i zesílení chemické, kdy jako síťovací činidlo sloužil 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid (EDC, zásobní koncentrace 20 mg/ml). Nakonec bylo spojeno použití EDC, se kterým byla reakční směs kultivována jednu hodinu při laboratorní teplotě, a fotolýzy, jenž probíhala opět 3 min. K reakční směsi bylo přidáno 10 μ l 100mM pyridinu (pH 6,0). Reakční směsi byly připraveny podle Tab. 3.

Tab. 3: Složení reakční směsi. U prvních tří reakčních směsí neproběhla fotolýza (slouží jako kontrola) nebo chemické zesílení EDC, u čtvrté bylo použito EDC a zároveň byla provedena fotolýza (3 min).

voda (μ l)	FHA (μ l)	dAC s p-Met (μ l)	roztok B (μ l)	100mM pyridin (μ l)	20mg/ml EDC (μ l)
-	6,5	1,42	10	-	-
1,3	6,5	1,42	-	10	0,2
0,5	6,5	1,42	-	10	1,0
0,5	6,5	1,42	-	10	1,0

5.17.2 Interakce proteinů dAC-CaM

Následně byl proveden experiment studia interakce dAC s kalmodulinem (CaM), který byl o zásobní koncentraci 1,6 mg/ml. Kromě roztoků proteinů dAC, CaM v roztoku B byl navíc přidán roztok C (Ca^{2+} a Mg^{2+} ionty s ATP (100mM)) nebo voda, viz Tab. 4. Finální koncentrace Ca^{2+} ve vzorcích byla $10\mu\text{M}$ CaCl_2 , Mg^{2+} 10mM MgCl_2 a ATP 5mM. U vzorků v Tab. 3 probíhala fotolýza po dobu 1 min.

Tab. 4: Složení reakční směsi dAC a CaM, u které probíhala fotolýza.

voda (μl)	roztok C (μl)	CaM (μl)	dAC s p-Met (μl)	roztok B (μl)
3	4	3	-	10
3	4	-	3	10
-	4	3	3	10
4	-	3	3	10

K dalším vzorkům již nebyl přidán roztok B, ale 100mM pyridin a EDC (20 mg/ml), viz Tab. 5. Tyto vzorky nebyly ozařovány vůbec. Ze všech vzorků byla připravena 12% SDS-PAGE, která byla následně barvena stříbrem.

Tab. 5: Složení reakční směsi dAC a CaM bez fotolýzy s chemickým zesílením EDC.

voda (μl)	roztok C (μl)	CaM (μl)	dAC s p-Met (μl)	100mM pyridin (μl)	20mg/ml EDC (μl)
-	4	3	3	10	-
-	4	3	3	10	0,5
3	4	-	3	10	0,5
3	4	3	-	10	0,5
4	-	3	3	10	0,5

6 Výsledky

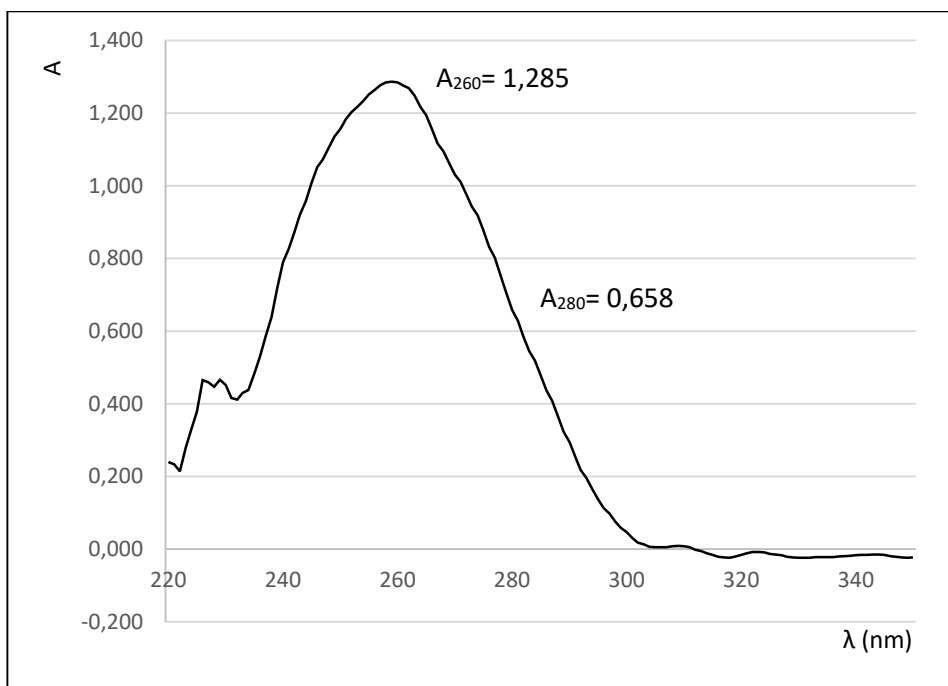
6.1 Transformace kompetentních buněk

První transformace plazmidu pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD do bakteriálního kmene *E. coli* B834 (DE3) proběhla formou teplotního šoku. Stejným způsobem jako u kmene *E. coli* B834 (DE3) bylo postupováno u kmene *E. coli* XL-1. Plazmid nese rezistenci na ampicilin. Na agarových plotnách s antibiotikem narostly přes noc při 37 °C kolonie obou bakteriálních kmenů u buněk s přidavkem plazmidu. Kolonie *E. coli* B834 (DE3) byly přerostlé a v malém počtu (cca 20). Kolonií *E. coli* XL-1 bylo okolo 200. Kontroly vyšly negativní (přídavek deionizované vody k buňkám místo plazmidu). Tímto jsme připravili transformovaný bakteriální kmen *E. coli* B834 (DE3) plazmidem pTYB2 pro další práci.

Bakteriální kmen *E. coli* B834 (DE3) byl následně transformován i druhým plazmidem PMM100, jenž obsahuje gen kódující rezistenci na antibiotikum tetracyklin a měl by snižovat toxicitu AC domény pro buňky *E. coli*. Transformované bakteriální kolonie vyrostly na agarových plotnách jak se samotným ampicilinem, tak s ampicilinem a tetracyklinem, v počtu okolo 200. Kontroly vyšly opět negativní.

6.2 Izolace plazmidu

Použitím sady QIAprepTH Spin Miniprep Kit byl plazmid pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD ze 3 ml noční kultury úspěšně izolován a pomocí UV-VIS spektroskopie zjištěna koncentrace plazmidu pTYB2 cyaA-1-384-int-CBD kódující gen fúzního proteinu dAC-CBD a také gen pro rezistenci na ampicilin. Poměr A_{260}/A_{280} byl 1,953, což značí vysokou čistotu vzorku plazmidu. Hodnota A_{260} byla 1,285 a A_{280} 0,658. Hodnota koncentrace plazmidové DNA měřené z mikroobjemu na spektrofotometru DeNovix DS-11+ Spectrophotometer činila 61,55 ng/μl. Spektrofotometrem bylo také proměřeno spektrum preparátu v rozsahu 220 až 350 nm, viz Obr. 6. Výsledný preparát byl zamražen při -20 °C.



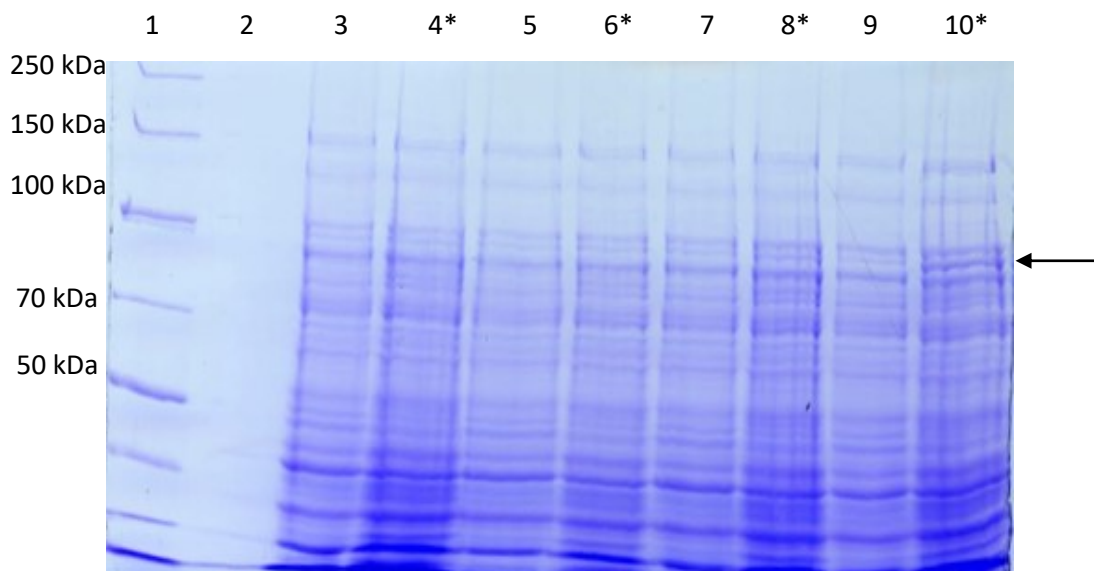
Obr. 6: Závislost absorbance plazmidové DNA na vlnové délce.

6.3 Expres proteinu

Ze tří klonů kmene *E. coli* B834 (DE3) s plazmidem pTYB2 po produkci dAC s p-Met byl vybrán klon 1, jelikož měl nejlepší produkci proteinu. Stejně bylo postupováno s kmenem s plazmidy pTYB2 a PMM100. Zde byl vybrán klon 2 a 3, protože jejich produkce proteinu byla srovnatelná. Ve výběru nejvhodnějšího transformovaného bakteriálního klonu daným plazmidem pro další produkci rozhodoval výsledek produkce dAC s p-Met v M9 médiu. Nejdříve jsme porovnávaly bakteriální kmeny *E. coli* B834 transformované samotným plazmidem pTYB2 (klon 1) s rezistencí na ampicilin a transformované plazmidem pTYB2 společně s plazmidem PMM100 (klon 2 a 3). Kultury byly jednou promyty PBS a následně „hladověly“ 15 min a produkce probíhala při 37 °C. Produkce proteinu těmito bakteriálními klony byla srovnatelná. Pro další experimenty byly použity již jen klony 1 a 3. Při kultivaci s Met byl výtěžek výrazně vyšší oproti kultivaci s p-Met. Po kultivaci přes noc došlo ke snížení produkce, v důsledku odštěpování chitin vázající domény při 37 °C.

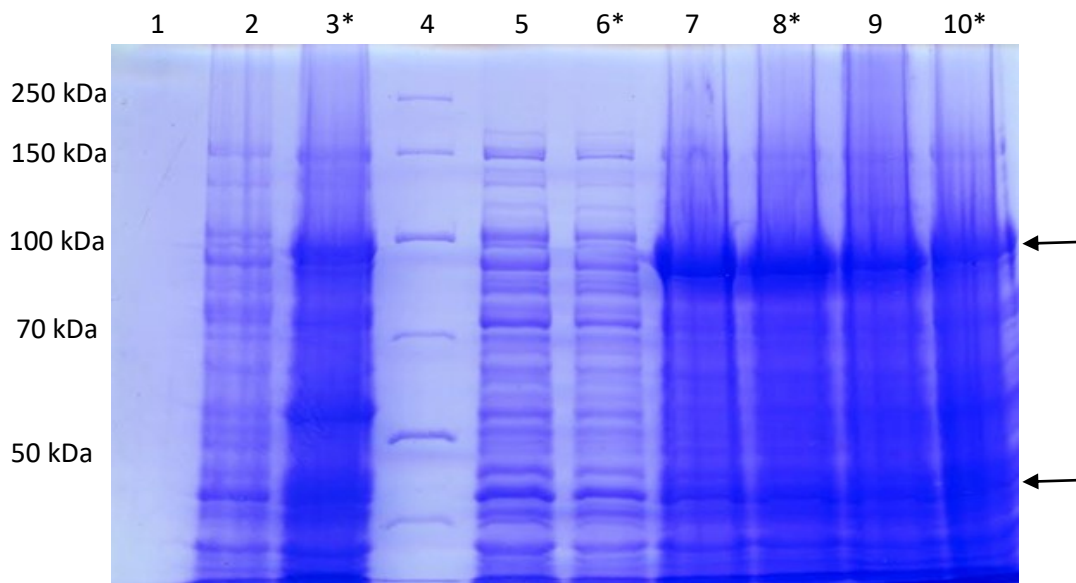
Další optimalizace se týkala „hladovění“ (odstranění přítomného Met), kdy bakteriální kultury „hladověly“ přes noc při 37 °C, pak byl přidán roztok p-Met (30 mg/l), po 30 min iniciována exprese proteinu indukcí IPTG (0,5mM) a dále kultivováno při 37 °C. První bakteriální kultura klonu 1 byla v LB médiu kultivována do OD₆₀₀ 0,88, druhá kultura klonu 3 do OD₆₀₀ 0,65.

Kultury byly dvakrát promyty PBS. Po indukci IPTG byly kultivovány při 37 °C. Průběžně z nich byly odebírány vzorky po 0,5 ml na SDS-PAGE. Produkce dAC v LB médiu byla orientační. Pelety byly zamraženy při -20 °C. Na Obr. 7 a 8 je vidět časový vývoj produkce proteinu v M9 médiu.



Obr. 7: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 ukazuje nárůst produkce dAC s p-Met klonem *E. coli* B834 v M9 médiu.** V dráze 1 je standard molekulových hmotností, v dráze 2 voda. V dráze 3, 5, 7 a 9 je vzorek s plazmidem pTYB2 odebraný v čase 0, 1, 2 a 4 hod. V dráze 4, 6, 8 a 10 je vzorek s plazmidy pTYB2 a PMM100 odebraný v čase 0, 1, 2 a 4 hod. * značí transformaci druhým plazmidem (PMM100). Šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti fúzního proteinu dAC s int-CBD doménou v dráze 10, tedy u vzorku klonu s oběma plazmidy po 4hod produkci.

Z Obr. 7 je tedy patrné, že protein je produkován klonem 3, tedy klonem s oběma plazmidy. Porovnáme-li produkci proteinu při kultivaci s Met a p-Met, podle očekávání je produkce proteinu s p-Met mnohem nižší.



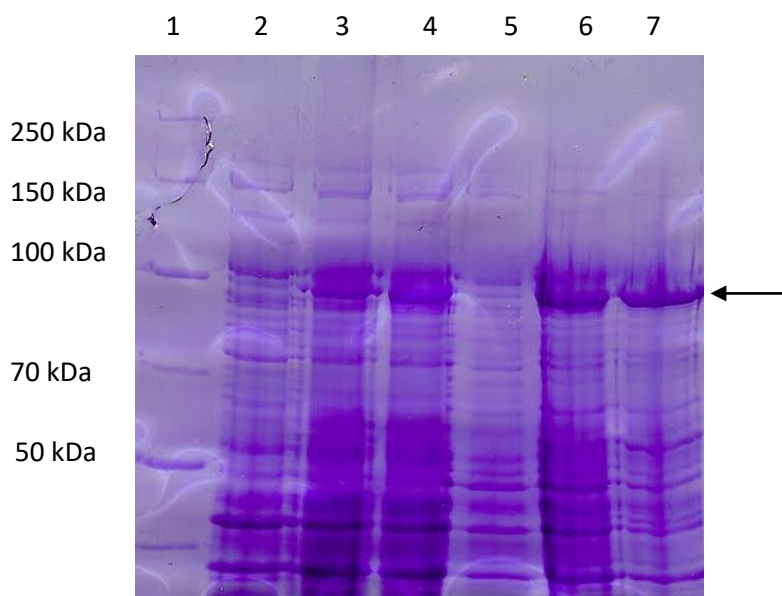
Obr. 8: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 značí produkci dAC.**

V dráze 1 je voda. V dráze 2 je vzorek s plazmidem pTYB2 odebraný po noční produkci. V dráze 3 je vzorek s oběma plazmidy odebraný po noční produkci. Vzorky v dráze 2 a 3 byly kultivovány s Met. V dráze 4 je standard molekulových hmotností. V dráze 5, 7 a 9 je vzorek s plazmidem pTYB2 z produkce v LB médiu po 0, 4 hod a po noční produkci. V dráze 6, 8 a 10 je vzorek s oběma plazmidy z produkce v LB médiu po 0, 4 hod a po noční produkci. * značí transformaci druhým plazmidem (PMM100). Proužek proteinu s molekulovou hmotností necelých 50 kDa označený šipkou značí dAC bez CBD. Druhá šipka značí produkci dAC v LB. Zde již jasně nerozeznáme produkci samotné dAC bez CBD.

Z Obr. 8 vyplývá, že dAC je produkována klonem s oběma plazmidy. Pro další experimenty mělo tedy význam použít právě tento klon. Z tohoto obrázku ovšem není patrný rozdíl mezi klony v produkci proteinu v LB médiu. Vidíme zde patrný rozdíl ve 4hod produkci a produkci přes noc. Po optimalizaci podmínek došlo k novému zaočkování tentokrát SOC média pouze již klonem 1 (*E. coli* B834 (DE3) s plazmidem pTYB2), s následnou kultivací v LB médiu, trojitým promytím PBS, 15min „hladověním“ a kultivací při 30 °C byly odebírány vzorky pro SDS-PAGE, u nichž byla změřena OD₆₀₀, viz Tab. 6. Po SDS-PAGE byla zjištěna optimální produkce proteinu, jehož molekulová hmotnost odpovídala fúznímu proteinu dAC-int-CBD, viz Obr. 9.

Tab. 6: **OD₆₀₀ měřená u vzorků kultivovaných v M9 a LB médiu.** Optické density byly měřeny v křemenné kyvetě s optickou drahou 10 mm.

čas odběru (hod)	M9 médium	ředění	LB médium	ředění
0	1,007	-	0,906	1:1
3	0,471	1:2	1,082	1:2
6	0,385	1:4	0,763	1:4



Obr. 9: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 se vzorky značí nárůst produkce fúzního proteinu dAC s p-Met klonem *E. coli* B834 s plazmidem pTYB2 v M9 médiu.** V dráze 1 je standard molekulových hmotností. V dráze 2, 3 a 4 je vzorek kultivovaný s p-Met odebraný v čase 0, 3 a 6 hod. V dráze 5, 6 a 7 je vzorek kultivovaný v LB médiu odebraný v čase 0, 3 a 6 hod. Šipka označuje relativní mobilitu odpovídající molekulové hmotnosti fúzního proteinu dAC-int-CBD.

Pro další postup byl tedy zvolen klon pouze s jedním plazmidem (pTYB2), protože produkce proteinu po dvojitým promytí PBS byla srovnatelná.

Dalším krokem byla optimalizace inkorporace p-Met do struktury dAC. Ukázalo se, že „hladovění“ buněk přes noc snižuje inkorporaci p-Met do dAC, proto byl volen postup bez „hladovění“, resp. s 15min „hladověním“. Také teplota, při které byly kultury kultivovány měla vliv na produkci dAC. Při teplotě 37 °C docházelo k proteolytickému odštěpování CBD. Díky tomu docházelo ke snížení množství fúzního proteinu dAC-int-CBD, důležitého pro úspěšné použití nosiče Chitin-Sepharosy.

6.4 Stanovení míry inkorporace p-Met v buněčné kultuře

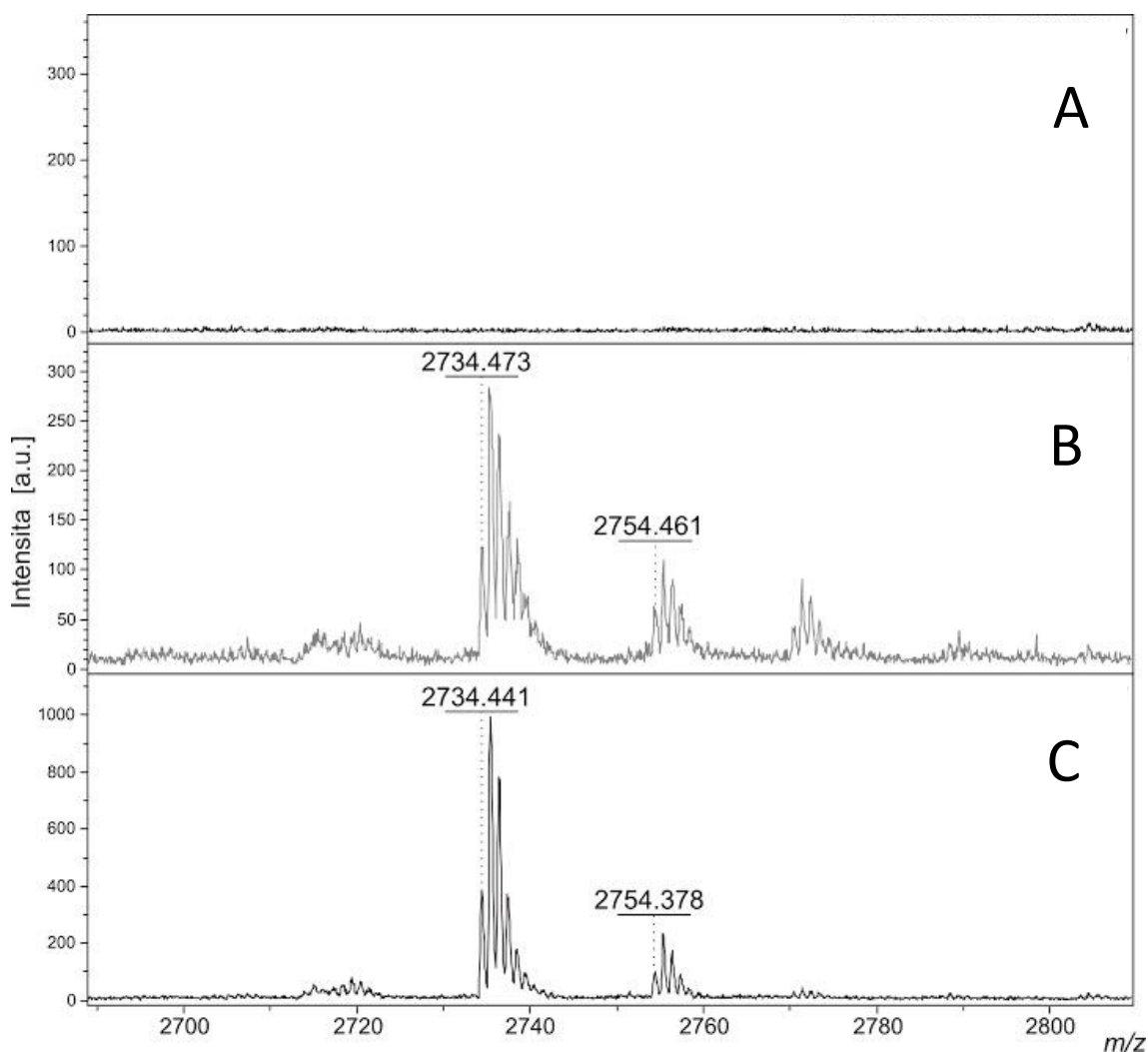
U finálního preparátu získaného z buněk 3x promytých PBS byla pomocí MALDI-TOF spektrometrie stanovena míra inkorporace p-Met v pozici 132 na hodnotu 82 %, viz Tab. 7.

Tab. 7: Hodnoty ploch pod vrcholy m/z signálů tryptického peptidu (pozice 125-150 aminokyseliny) dAC s methioninem v pozici 132 o hodnotě m/z 2754,22 a s foto-methioninem v pozici 132 o hodnotě m/z 2734,44 z SDS-PAGE vzorku buněčných pelet.

m/z	intenzita (a. u.)	plocha
2734,441	391	177
2735,439	995	469
2736,439	782	374
2737,442	352	200
2738,437	179	98
2754,378	101	45
2755,4	225	98
2756,415	175	77
2757,391	92	43
2758,377	40	18

Na Obr. 10 jsou 3 hmotnostní spektra získaná pomocí MALDI-TOF MS měřená v reflexním modu z produkce dAC s p-Met bakteriálním kmenem *E. coli* B834 (DE3) s plazmidem pTYB2 po trojitém promytí bakteriální kultury (OD_{600} okol 1,0) roztokem PBS před indukci IPTG.

Data pro relativní semikvantitativní určení míry inkorporace p-Met (plochy pod vrcholy korespondujících signálů m/z jednotlivých peptidů) jsou presentovány v Tab. 7.



Obr. 10: **Hmotnostní spektra z produkce dAC s p-Met.** Část A znázorňuje spektrum produkce dAC s p-Met před indukcí pomocí IPTG, tedy v čase 0 hodin. Část B ukazuje spektrum produkce po 3 hodinách po indukcii IPTG. Část C značí spektrum produkce dAC s p-Met po 6 hodinách. Celá produkce byla kultivována při 30 °C.

Z buněčných kultur různých podmínek optimalizace inkorporace p-Met (i. 1x proplach PBS + 15 min „hladovění“, ii. 2x proplach PBS + 20 hod „hladovění“ při 37 °C, iii. 3x proplach PBS + 15 min „hladovění“, exprese při 30 °C) jsou prezentovány pouze výsledky posledních nejúčinnějších podmínek.

V části A Obr. 10 nevidíme ve sledované oblasti žádný výrazný m/z signál, protein se tedy zatím bez přídavku IPTG neexprimuje. V části B vidíme produkci dAC s p-Met po 3hod inkubaci od indukce IPTG. Zde došlo k prokazatelnému nárůstu signálu. Po 6hod produkci v části C se signál čtyřnásobně zvýšil. Sekvence QAGLVGMADGVVASNHAGYEQFEFR odpovídá peptidu, kde se přirozeně vyskytuje L-Met, odpovídá signálu při m/z 2754,294. Zvýrazněný methionin

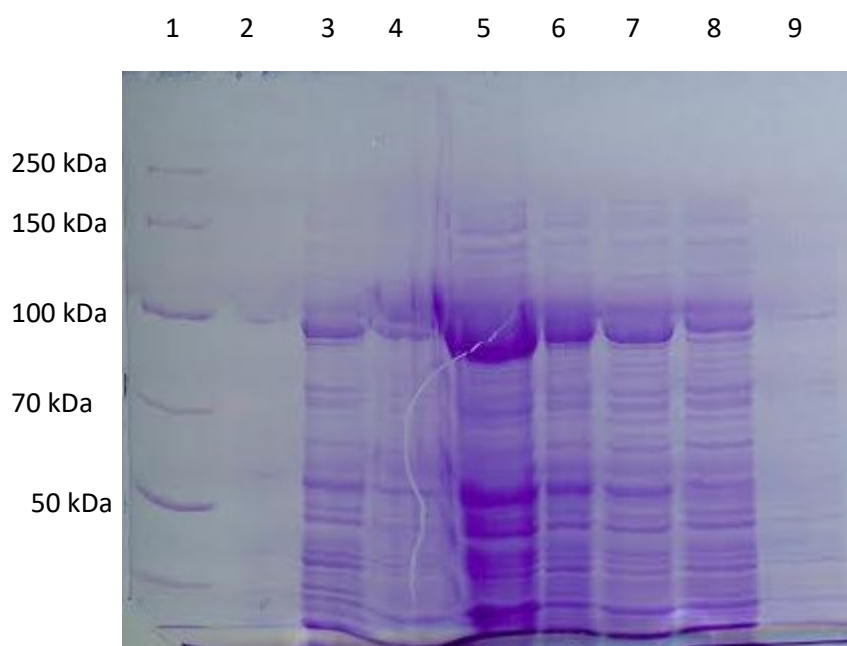
nahrazený v experimentu za foto-methionin je v pozici 132 a takový peptid odpovídá signálu 2734,441.

Použitím MALDI s dusíkovým laserem (337 nm) k analýze inkorporace fotoaktivovaných aminokyselin v řetězci proteinu došlo k rozpadu diazirinového kruhu za uvolnění molekuly dusíku z molekuly p-Met. Vzniklý terminační produkt je o 19,972 hmotnostních jednotek (m. u.) menší, než produkt s přírodní aminokyselinou. Výrazný signál, který odpovídá m/z 2734,322, značí peptid s inkorporovaným p-Met, jenž vznikl po fotolýze peptidu. Porovnáním ploch odpovídajících oběma signálům došlo k relativnímu stanovení inkorporace p-Met do proteinu. Míra inkorporace p-Met po trojitým promytí PBS odpovídala přibližně 80 %. Naproti tomu analýza proteinů po jednom promytí PBS či po „hladovění“ přes noc činila 35-38 %, respektive 30 %. Finální preparát dAC byl purifikován z 2x promyté buněčné kultury a míra jeho inkorporace p-Met činila 42 %.

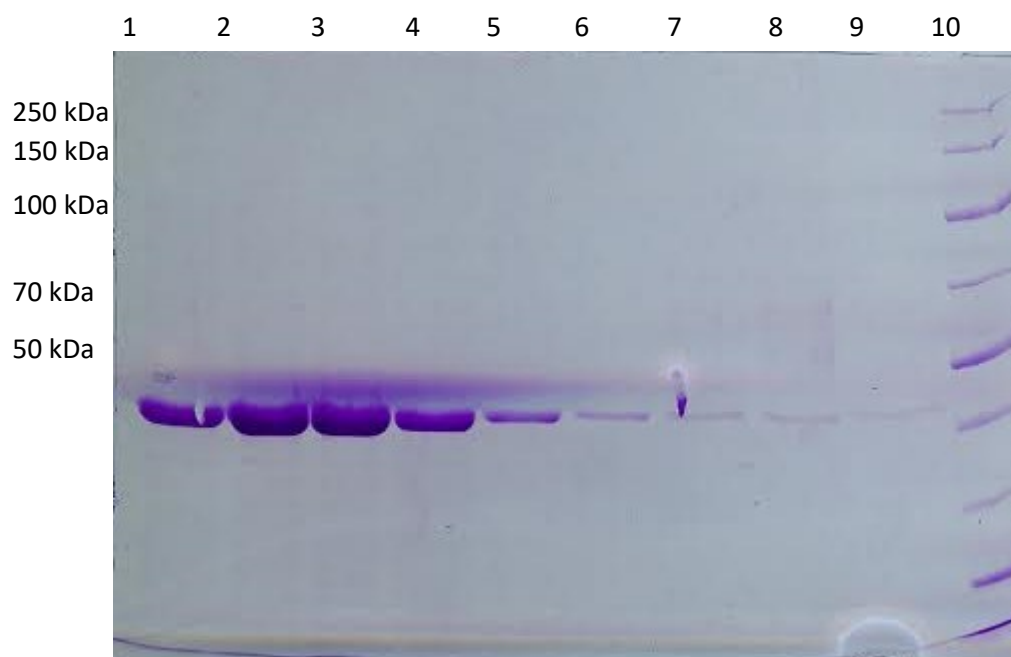
6.5 Izolace proteinu

6.5.1 Izolace proteinu dAC bez p-Met

Bakteriální pelety s exprimovaným proteinem po dvojitým promytí PBS a 15min „hladovění“ byly rozmrazeny a postupně resuspendovány v 0,5mM roztoku $MgCl_2$ s tabletou směsí inhibitorů proteáz. Vzniklá suspenze byla následně sonikována na ledu. Po rozbití buněk byla tato suspenze centrifugována po dobu 10 min při 4 °C a 9000 rpm. Sonikace byla 2x opakována, vzhledem k velké peletě nerozbitých buněk. Z pelet a supernatantů byly pipetou odebrány vzorky po 50 μ l pro elektroforézu, viz Obr. 11. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml roztoku A, následně bylo nanášeno cca 6 ml 100mM 1,4-dithiothreitolu (DTT) rozpuštěného v roztoku A (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4). Kolona byla umístěna přes noc do 4 °C. Exprimovaný protein by se měl na koloně zachytit, protože se jedná o fúzní protein dAC a domény vázající chitin (CBD, z angl. chitin binding domain). Přídavkem DTT by mělo dojít k proteolytickému štěpení dAC od CBD v důsledku přítomné inteinové (int) domény a čistá dAC by se měla eluovat z kolony. Následující den byl z kolony eluován roztok s proteinem pomocí 100mM roztoku DTT v roztoku A. Frakce byly jímány pomocí sběrače frakcí po 1,5 ml, ze kterých byly také odebrány vzorky na SDS-PAGE, viz Obr. 12. Spojené frakce 1-6 byly koncentrovány a dialyzovány. Po následné charakterizaci byl finální preparát (750 μ l) zamražen a uskladněn při -80 °C.



Obr. 11: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel získaný ze vzorků z izolace dAC bez p-Met.**
V dráze 1 je standard. V dráze 2 je voda. V dráze 3 je supernatant získaný po první centrifugaci. V dráze 4 je 2x ředěná peleta získaná po první centrifugaci. V dráze 5 je supernatant získaný po druhé sonikaci a centrifugaci. V dráze 6 jsou spojené supernatanty (první a druhý). V dráze 7 je supernatant získaný po třetí centrifugaci. V dráze 8 je vzorek proteinů, které se nevázaly na kolonu, a v dráze 9 je vzorek z promytí 50 ml roztoku A.

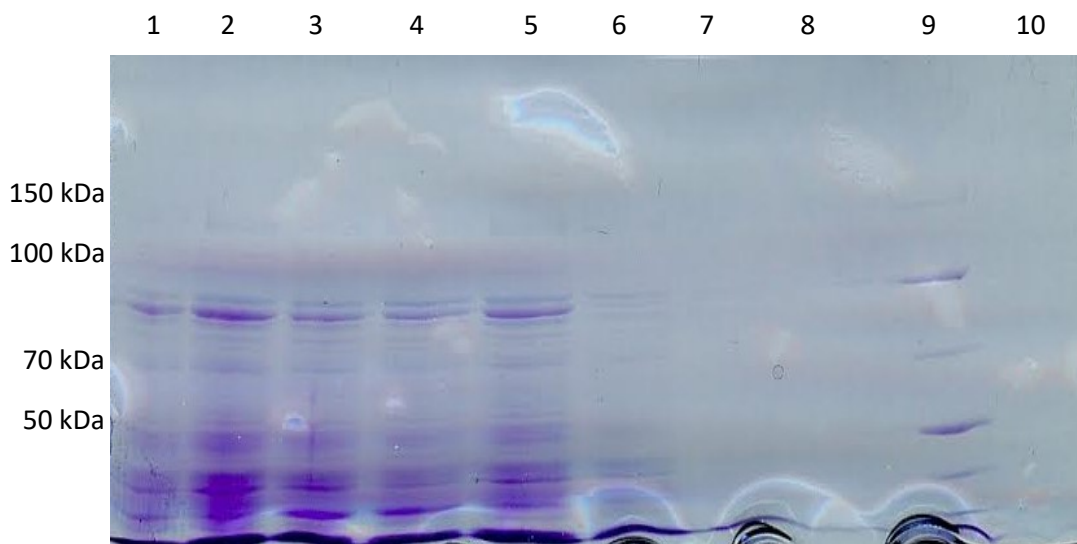


Obr. 12: **10% polyakrylamidový elektroforetický gel získaný ze vzorků z eluce dAC bez p-Met.** V dráze 1 až 9 jsou vzorky z 1,5ml frakcí získaných elucí dAC bez p-Met pomocí 100mM roztoku DTT s roztokem A. V dráze 10 je standard.

6.5.2 Izolace proteinu dAC s p-Met

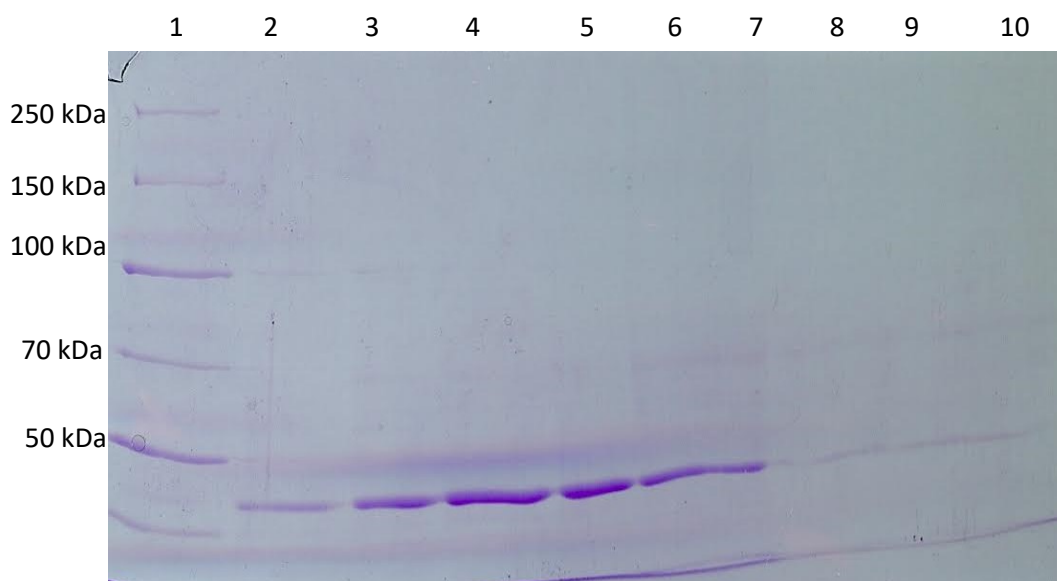
Stejným způsobem bylo postupováno při izolaci proteinu dAC s p-Met. Na Obr. 13 je 8% polyakrylamidový elektroforetický gel získaný ze vzorků z izolace dAC s p-Met.

Pelety buněk s exprimovaným proteinem byly v tomto případě před zamražením inkubovány 20 min v 20% (w/v) roztoku sacharosu v roztoku A. To vedlo k lepší lýze buněk a vzniku menší pelety po sonikaci a centrifugaci. Proto byla sonikace opakována pouze jednou.



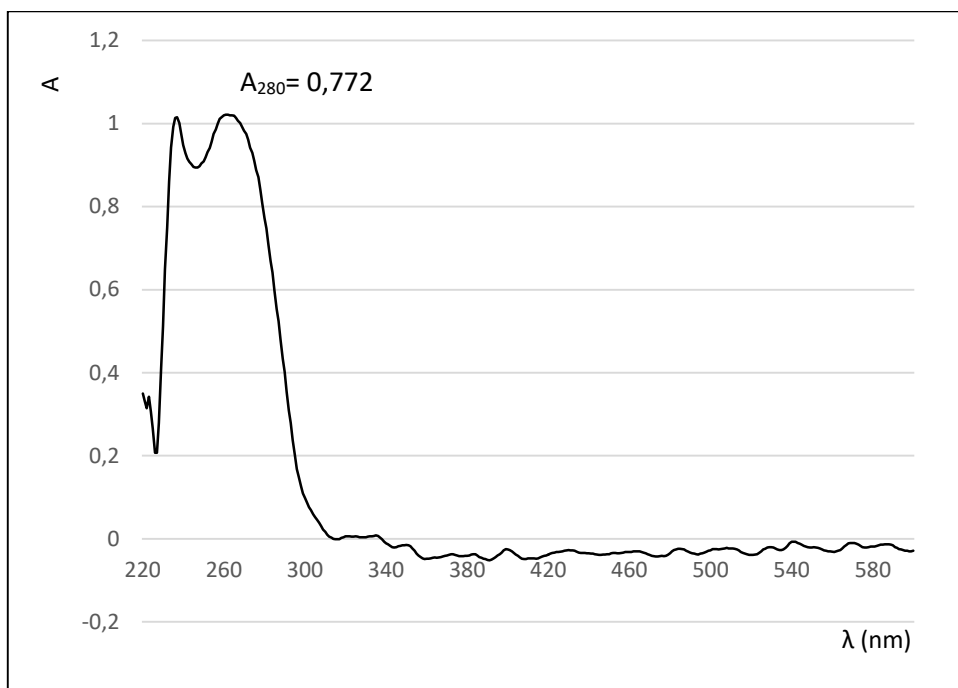
Obr. 13: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel získaný ze vzorků z izolace dAC s p-Met.** V dráze 1 jsou spojené pelety před sonikací. V dráze 2 je první supernatant. V dráze 3 je první peleta. V dráze 4 je druhý supernatant. V dráze 5 jsou spojené supernatanty. V dráze 6 je vzorek z eluce po nánosu spojeného supernatantu. V dráze 7 je vzorek odebraný po proplachu kolony roztokem A. V dráze 8 je vzorek z nánosu 6 ml 100mM roztoku DTT. V dráze 9 je standard. V dráze 10 je vzorek z eluce roztokem DTT.

Izolovaný protein s p-Met (míra inkorporace p-Met po dvojitým proplachu PBS okolo 45 %, po trojitým okolo 80 %) byl opět eluován pomocí 100mM roztoku DTT v roztoku A. Na Obr. 14 je 8% elektroforetický gel se vzorky, jež byly odebírány po 50 μ l, z eluce dAC s p-Met. Frakce byly jímány po 1,5 ml pomocí sběrače frakcí.



Obr. 14: **8% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený CBB-R250 získaný ze vzorků z eluce dAC s p-Met.** V dráze 1 je standard. V drahách 2-10 jsou vzorky z 1,5ml frakcí získaných elucí dAC s p-Met pomocí roztoku 100mM DTT v roztoku A.

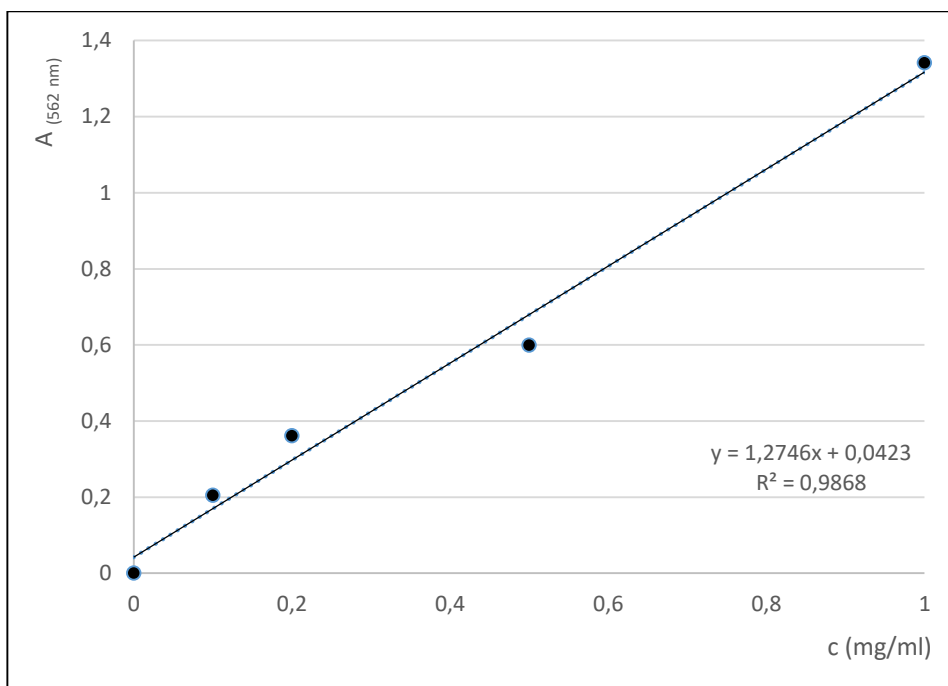
Spojené frakce 1 až 5 (celkový objem 7 ml) byly zahuštěny pomocí koncentrátoru Amicon Ultra s membránou s „cut off“ 10 kDa na objem 650 μ l a po dialýze byl preparát charakterizován měřením UV-VIS. Byla stanovena spektra v rozmezí 220-600 nm pomocí spektrofotometru DeNovix DS-11+ Spectrophotometer, viz Obr. 15. Hodnota absorpance při vlnové délce 280 nm byla 0,772. Spektrum nevykazuje výrazné maximum při vlnové délce 241 nm, které by značilo přítomnost DTT (dialýza byla tedy úspěšná).



Obr. 15: Závislost absorbance na vlnové délce měřené v rozsahu 220 až 750 nm finálního preparátu dAC.

6.6 Analytická charakterizace finálního preparátu dAC proteinu

Stanovení koncentrace izolovaných proteinů probíhalo pomocí bicinchoninové kyseliny. Pro sestavení kalibrační přímky byly použity jako standardy roztoky BSA o různých koncentracích. Z rovnice přímky v grafu, viz Obr. 16, byly odečteny koncentrace izolovaných proteinů. Absorbance byla měřena na spektrofotometru DeNovix DS-11+ Spectrophotometer při 562 nm. Z kalibrační přímky byla stanovena koncentrace 5x ředěného proteinu dAC s p-Met ($A_{562} = 0,306$) na 1,034 mg/ml, což odpovídá 6,87 mg proteinu na 1 l média. U 20x ředěného proteinu ($A_{562} = 0,090$) byla stanovena hodnota 0,748 mg/ml, což odpovídá 4,97 mg proteinu na 1 l média. Hodnota 20x ředěného vzorku byla mimo rozsah kalibrační křivky, a proto jsme ji považovali pouze za orientační.



Obr. 16: Kalibrační přímka BSA stanovení proteinů pomocí bicinchoninové kyseliny.

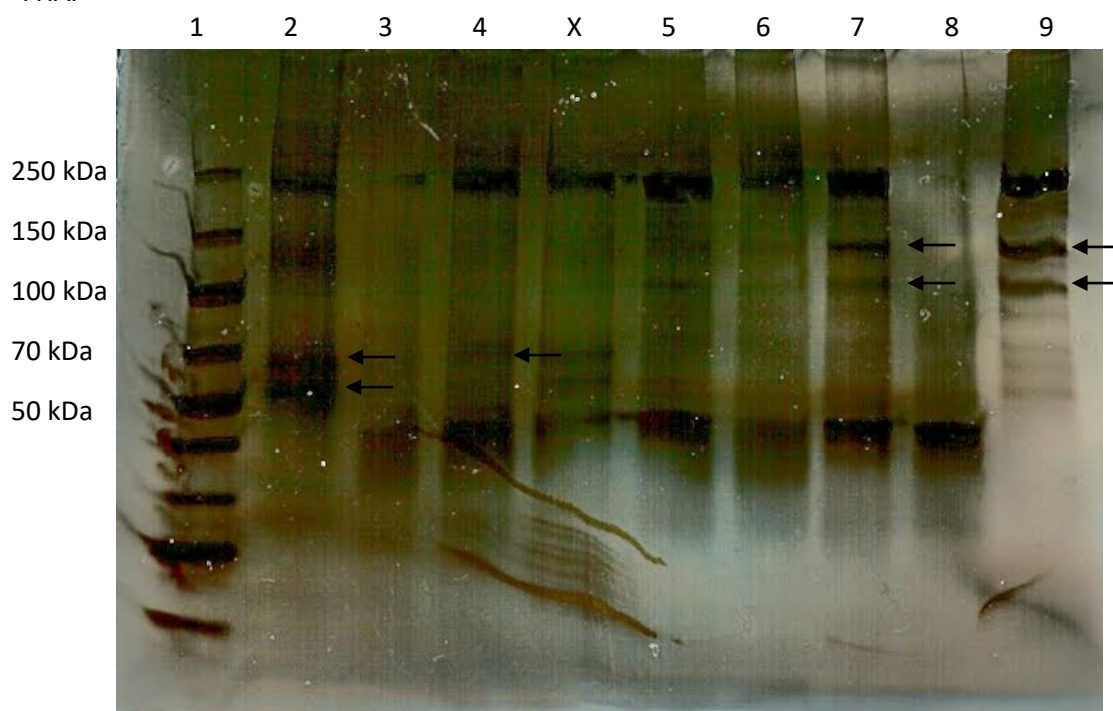
U finálního preparátu získaného z buněk 2x promytých PBS byla pomocí MALDI-TOF spektrometrie stanovena míra inkorporace p-Met v pozici 132 na hodnotu 42 %, viz Tab. 8.

Tab. 8: Hodnoty ploch pod vrcholy m/z signálů tryptického peptidu (pozice 125-150 aminokyseliny) dAC s methioninem v pozici 132 o hodnotě m/z 2754,22 a s foto-methioninem v pozici 132 o hodnotě m/z 2734,44 u finálního preparátu.

m/z	intenzita (a. u.)	plocha
2734,151	1947	607
2735,146	4672	1644
2736,147	3910	1403
2737,157	2282	954
2738,22	1284	619
2739,203	653	348
2754,112	4082	1244
2755,106	7625	2428
2756,102	5788	1893
2757,114	2323	748
2758,121	508	171
2759,112	76	29

6.7 Síťovací experimenty

Po získání čistého preparátu dAC s inkorporovaným p-Met o koncentraci 1,0 mg/ml a mírou inkorporace p-Met 42 % proběhly síťovací experimenty. Cílem bylo zkoumat zesítnění samotných proteinů a proteinů mezi sebou (intramolekulární a intermolekulární kovalentní zesítnění). Nejprve proběhl fotosíťovací experiment dAC s inkorporovaným p-Met s proteinem FHA (o zásobní koncentraci 0,7 mg/ml) v experimentálním uspořádání podmínek podle Tab. 2. Na Obr. 17 vidíme 4-15% gradientový elektroforetický gel mapující síťovací experimenty dAC a FHA.

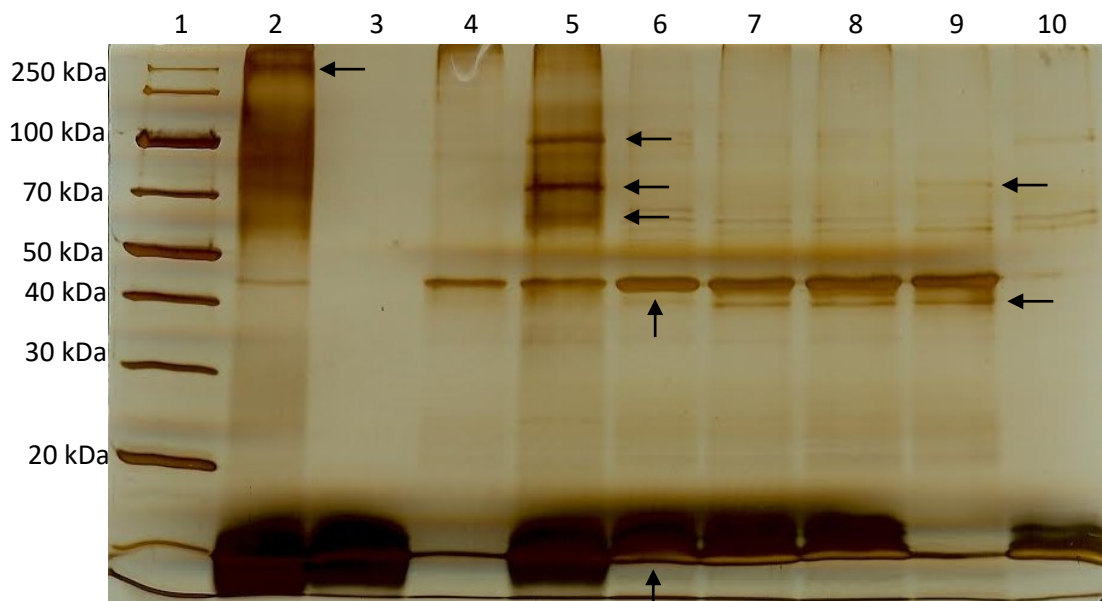


Obr. 17: **4-15% gradientový polyakrylamidový elektroforetický gel barvený pomocí stříbra po síťovacích experimentech dAC a FHA.** V dráze 1 je standard molekulových hmotností. V dráze 2 je samotné FHA s EDC nefotolyzované. Ve dráze 3 je samotná dAC s EDC nefotolyzovaná. V dráze 4 najdeme směs dAC a FHA společně s EDC bez fotolýzy. V dráze 5 se nachází směs dAC a FHA bez EDC a bez fotolýzy. V dráze 6 je směs dAC, FHA a EDC fotolyzovaná. V dráze 7 je směs dAC a FHA bez EDC fotolyzovaná. V dráze 8 je fotolyzovaná dAC a v dráze 9 je fotolyzované FHA. Fotolýza u vzorků probíhala po 1 min.

V dráze 2 na Obr. 17 zřetelně vidíme kromě proužku 220kDa FHA dva nově vzniklé proužky označené šipkami. Tyto proužky značí zesítnění pomocí chemického síťovacího činidla EDC, které síťuje v proteinech amino- a karboxylové skupiny postranních řetězců. Vzniklé proužky o molekulové hmotnosti 60 a 65 kDa odpovídají pravděpodobně tvorbě intramolekulárních

zesíťení a určují 3D strukturu uspořádaní proteinu FHA v roztoku. V dráze 4 je proužek označený šipkou, který se u samostatných proteinů nenachází. Navíc dochází ke ztrátě tvorby intramolekulárního zesíťení proteinu FHA (proužky o molekulové hmotnosti 60 a 65 kDa v dráze 2). To lze vysvětlit vznikem jiného 3D uspořádaní proteinu FHA v prostoru po přidavku proteinu dAC. V dráze 6, kde byla směs dAC s FHA a EDC ještě navíc fotolyzována, došlo ke zmenšení proužku, který značí přibližně 50kDa dAC. V dráze 7 a 9 u vzorků po 1min fotolýze vidíme nově vzniklé proužky označené šipkami. Jelikož se tyto proužky nacházejí u samotného FHA, bude se patrně jednat o nespecifické zesíťení proteinu FHA nebo spíše o jeho proteolýzu působením UV záření (proužky o molekulové hmotnosti 100 a 120 kDa).

Dalším síťovacím experimentem byla analýza interakce proteinů dAC s p-Met a CaM (o zásobní koncentraci 1,6 mg/ml). Na Obr. 18 vidíme 12% polyakrylamidový elektroforetický gel se síťovacími experimenty dAC s p-Met a CaM po 1min fotolýze (dráhy 7 až 10) a v přítomnosti chemického síťovacího činidla EDC v dráze 2-5. Po fotozesíťení nebyl nalezen žádný intermolekulární kovalentní produkt dAC-CaM. Naproti tomu při chemickém zesíťení došlo ke vzniku produktů v dráze 2 a 5. Ke vzorku v dráze 2 nebyl přidán roztok C (10 μ M CaCl₂, 10mM MgCl₂ a 5mM ATP) a došlo tak k nespecifické interakci mezi CaM a dAC. Na gelu lze pozorovat širokou oblast s výskytem vířivé difúzní migrace proteinů o různé molekulové hmotnosti a pravděpodobně i konformaci zesíťení. V dráze 5, kam byl roztok C přidán, došlo ke specifické interakci mezi těmito proteiny a na SDS-PAGE gelu lze pozorovat tvorbu velmi dobře zaostřených proteinových proužků.



Obr. 18: **12% polyakrylamidový elektroforetický gel barvený pomocí stříbra po síťovacích experimentech dAC a CaM.** V dráze 1 je standard molekulových hmotností. V dráze 2 je CaM, dAC s pyridinem a EDC, bez přítomných iontů a ATP. V dráze 3 je CaM s roztokem C (10 μ M CaCl₂ a 10mM MgCl₂ a 5mM ATP), pyridinem a EDC. V dráze 4 je dAC s roztokem C, pyridinem a EDC. V dráze 5 je CaM a dAC s roztokem C a pyridinem s EDC. V dráze 6 je CaM a dAC s roztokem C a pyridinem bez EDC. V dráze 7 je CaM a dAC bez roztoku C. V dráze 8 je CaM a dAC s roztokem C. V dráze 9 je dAC s roztokem C. V dráze 10 je CaM s roztokem C. Vzorky v drahách 7-10 byly fotolyzovány po dobu 1 min.

Jak již bylo řečeno v dráze 2 na Obr. 18 vidíme mezi 50 a 150 kDa oblast difúzních proužků značící nespecifické interakce mezi dAC a CaM bez přítomných iontů Ca²⁺, Mg²⁺ a ATP v roztoku a při použití chemického síťovacího činidla EDC. Navíc vznikl proužek produktu o hmotnosti přibližně 250 kDa označený šípkou. MS analýza tohoto proteinového proužku potvrdila exklusivní přítomnost dAC proteinu naznačující tvorbu multimeru dAC. Oproti dráze 2 vidíme v dráze 5 zřetelně 3 proužky. Ty značí důležitost přítomnosti iontů Ca²⁺, Mg²⁺ a ATP v roztoku pro 3D uspořádání a biologickou funkci při experimentech dAC a CaM. V drahách 2, 3 a 5 vidíme po použití EDC široký proužek CaM při molekulové hmotnosti 10 kDa značící možné intramolekulární zesítní. Tento proužek je největší v dráze 2, kde nebyl přítomen roztok C s vápenatými kationty, jež jsou důležité pro aktivaci a biologickou funkci CaM, mohlo tak dojít ještě k většímu nespecifickému zesítní pomocí EDC. V dráze 7 a 8 nevidíme podle předpokladů žádný proužek značící vznik produktu fotochemického zesítní. Přítomnost roztoku C zde tedy

nemá vliv na vznik produktů. V dráze 9 vidíme dva proužky označené šipkami, jež mohou značit vznik intramolekulárního a intermolekulárního fotochemického zesítní u dAC. To by mohla podporovat přítomnost hořčnatých kationtů a ATP. Při porovnání s Obr. 17 zde tyto proužky vidět nejsou. Kromě směsi CaM a dAC byla fotolyzována i samotná dAC a samotný CaM, abychom zjistili, zda nedochází k fotochemickému zesítní v proteinech samotných. Označené proužky byly vyříznuty pro zjištění složení pomocí MALDI-TOF MS. Pomocí MS analýzy byla potvrzena přítomnost proteinu dAC v označených proužcích v dráze 9, přičemž proužek o molekulové hmotnosti 40 kDa pravděpodobně intramolekulární zesítní. Naproti tomu proužek o molekulové hmotnosti 80 kDa je nejspíše dimer dAC. Proužky označené šipkami v dráze 6 posloužily jako standard čistých proteinů dAC (45 kDa) a o CaM (16,7 kDa).

UV-VIS spektra vzorků síťovacích experimentů pro charakterizaci míry fotolýzy (specifické absorpční maximum diazirinového kruhu p-Met při 350 nm) nemohla být proměřena, resp. použita, protože u vzorků s pyridinem absorboval jeho aromatický kruh. To samé nastalo při měření vzorků s roztokem C, kde rušil měření adenin z ATP. Správným postupem by bylo vynechat pro měření spekter vzorků pyridin a ATP nahradit anorganickým pyrofosfátem.

7 Diskuze

Adenylátcyklázový toxin (ACT) je jedním z několika virulentních faktorů *B. pertussis*, způsobující v lidské populaci onemocnění zvané černý kašel.^{2,6} Tento toxin je tvořen několika doménami, z nichž jsme se zaměřili na N-terminální doménu katalyzující přeměnu ATP na cAMP (dAC) v napadených buňkách imunitního systému vedoucího ke zvýšení invazivity *B. pertussis* v dýchací soustavě hostitele.⁶⁻⁸ Pro aktivaci katalytické aktivity dAC jsou důležité nejen ionty Ca^{2+} , ale i interakce s kalmodulinem.¹⁶ Proto při expresi proteinu dAC v *E. coli* byla testována nutnost přítomného produktu plazmidu PMM100, který obsahuje gen *Lac14* reprimující pLac promotor exprese *ipaCic* bez přítomnosti induktoru (např. IPTG) a tak snižuje aktivitu adenylátcyklázy a tedy i snižuje negativní vliv na expresní buňky *E. coli*.³⁴ Tento negativní vliv se nepotvrdil. Naopak přítomnost tetracyklinu v médiu (buňky s plazmidem PMM100) snižovala růst buněk a tedy i míru exprese dAC proteinu.

7.1 Optimalizace inkorporace p-Met do proteinu dAC

Délka „hladovění“ a snížení hladiny Met v médiu pro snížení jeho kompetice s p-Met (zvýšení míry inkorporace p-Met do proteinu) nemá na produkci proteinu významný vliv, proto se postupovalo podle standardního protokolu, tedy s 15min „hladověním“, nikoli s „hladověním“ přes noc při 37 °C. Exprimované proteiny vykazovaly s a bez „hladovění“ totožnou míru inkorporace (cca 30-40 %).

Pokud se v médiu nachází methionin, upřednostňují ho bakterie před p-Met, protože K_D p-Met vykazuje řádově nižší hodnotu.^{35,36} Pravděpodobně hladověním při 37 °C došlo k lýze mrtvých buněk, degradaci proteinů a zvýšení hladiny methioninu v médiu. Tato lýza odpovídá i nižší intenzitě proteinových proužků ve vzorcích s „hladověním“ přes noc a nižší hladinou exprese dAC-int-CBD fúzního proteinu. Ukázalo se, že při vícenásobném (až trojnásobném) promytí pelet pomocí PBS při jejich převedení z LB média do M9 média došlo ke zvýšení inkorporace p-Met do proteinu až na 80 %.

Na Obr. 8 je vidět rozdílná produkce proteinu produkovaného bakteriemie kultivovanými při 37 °C odpovídající dAC po 4hod a celonoční produkci. V obou případech vzniká výrazný proteinový proužek s molekulovou hmotností okolo 45 kDa. To může být způsobeno odštěpováním domény vázající chitin (CBD, z angl. chitin binding domain) od dAC díky zvýšení redukčního potenciálu prostředí a účinku inteinové domény.³⁷ Produkce dAC bez odštěpené CBD byla dále optimalizována. Na SDS-PAGE ze vzorků odebraných z bakteriálních kultur

kultivovaných při 30 °C již nebyla vidět přítomnost dAC bez CBD. Proto byl pro další postup zvolen protokol s kultivací při 30 °C.

7.2 Izolace proteinu

Když byla rozmražená peleta bez předchozího vystavení buněk 20% sacharose pouze v hypotonickém prostředí, došlo k minimálnímu popraskání buněk. Tento postup byl zopakován s peletou, která vznikla centrifugací po 20min kultivaci buněk v roztoku A (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4) s 20% (w/v) sacharosou.³⁸ Zde již byla pozorována výrazně větší lýza buněk. Největšího výtěžku bylo dosaženo po zopakování dvou předchozích postupů a následnou sonikací bakteriálních suspenzí.

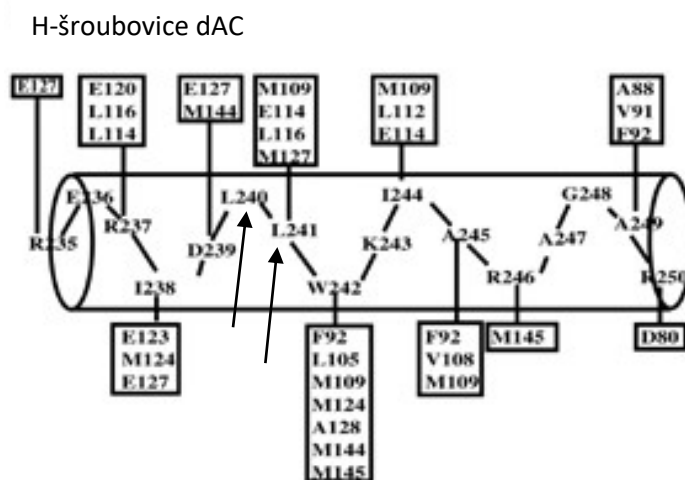
Při první izolaci dAC bez p-Met byl zvolen 50mM roztok 1,4-dithiothreitolu (DTT, v protokolu³⁹ byl použit dokonce 30mM roztok), ale ukázalo se, že došlo k malému rozštěpení vazby mezi dAC a CBD, jelikož po eluci 0,3mM NaOH byla eluována část nepoštěpeného proteinu, což bylo vizualizováno na SDS-PAGE. Proto byl pro další izolace zvolen 100mM roztok DTT v roztoku A.

7.3 XL experimenty

Získaný preparát dAC posloužil pro provedení síťovacích experimentů s vláknitým hemaglutininem (FHA) a kalmodulinem (CaM). Zobrazením vzorků proteinů po síťovacích experimentech dAC s FHA po elektroforéze na 6% polyakrylamidovém gelu bylo zjištěno, že třiminutová fotolýza je dlouhá, protože docházelo k fragmentaci proteinů účinkem UV záření, byla proto zkrácena na 1 min. Po optimalizaci fotolýzy byl pro lepší rozdělení produktů na SDS-PAGE použit 4-15% gradientový gel Mini-PROTEAN TGXTM, který byl následně barven pomocí stříbra. Barvení pomocí stříbra představuje přibližně 50x citlivější metodu, než je barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue-R250.

Při fotolýze dAC s p-Met a kalmodulinu (CaM) byly voleny koncentrace roztoku C (10μM CaCl₂, 10mM MgCl₂ a 5mM ATP) podle experimentu uveřejněném v¹⁷. Ionty Ca²⁺ mají vliv na změnu struktury kalmodulinu. Pokud se v prostředí nenachází, nedojde ke změně struktury a kalmodulin zůstává inaktivní.⁴⁰ ATP a ionty Mg²⁺ mají zase vliv na dAC.¹⁷ 12% polyakrylamidový elektroforetický gel se síťovacími experimenty dAC s CaM na Obr. 18 byl volen, aby došlo k zachycení případných intramolekulárních zesíťení samotného CaM.

Působením fotolýzy ve směsi proteinů dAC s p-Met a CaM nedošlo k tvorbě žádných intermolekulárních zesíťení. To odpovídalo našemu předpokladu na základě strukturní analýzy modelu pdb (2COL). Pro zachycení interakce plánujeme tvorbu mutantu dAC s Met v pozici 240 nebo 241 místo leucinů, které jsou v těsné blízkosti tryptofanu 242, který na interakci obou proteinů participuje.¹⁷ Další alternativou může být mutace isoleucinů v pozici 238 a 244. Nebude tak třeba ostatní Met přítomné v AC doméně mutovat na leuciny, abychom vyloučili jejich vliv na interakci dAC-CaM. Další alternativou je produkce CaM proteinu s p-Met, protože podle Obr. 19 označené Met mohou interagovat s H-šroubovicí dAC (Met v pozici 109, 124, 127, 144 a 145).¹⁷



Obr. 19: Schématický diagram ukazující hlavní kontakt mezi C-koncem CaM s H-šroubovicí dAC. Zbytky CaM jsou v rámečkách. Šipkami jsou označeny leuciny v pozici 240 a 241. Převzato a upraveno z¹⁷.

8 Závěr

Úspěšně se podařilo exprimovat adenylátcyklázovou doménu s foto-methioninem. Postup exprese proteinu byl optimalizován, až bylo dosaženo 80% inkorporace foto-methioninu do proteinového řetězce. Míra inkorporace byla zjištěna pomocí hmotnostní spektrometrie.

Izolací preparátu s 40% inkorporací p-Met bylo získáno 650 μ l proteinu o finální koncentraci 1,0 mg/ml, což odpovídá 6,9 mg proteinu na 1 l média.

S adenylátcyklázovou doménou s foto-methioninem byly provedeny síťovací experimenty s vláknitým hemaglutininem a kalmodulinem. U směsi dAC s FHA po jednominutové fotolýze nebyl pozorován vznik proužků značících vznik produktů zesíťení. Interakci dAC a FHA jsme dokázali nepřímou, jelikož ve směsi dAC s FHA a EDC došlo k vymizení proužků, které se objevily po zesíťení samotného FHA pomocí EDC. Produkt kovalentního fotochemického zesíťení dAC a CaM nebyl pomocí elektroforézy podle očekávání pozorován. Na polyakrylamidovém elektroforetickém gelu byly po přidání chemického síťovacího činidla EDC ke směsi dAC a CaM s roztokem CaCl_2 , MgCl_2 a ATP pozorovány tři nově vzniklé ostré proteinové proužky, jejichž složení (dAC-CaM) bylo potvrzeno analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie. Bez Ca^{2+} , Mg^{2+} a ATP vzniká směs nesespecifických difúzních produktů. Jejich tvorba vypovídá, že CaM a dAC jsou biologicky aktivní, což koresponduje s jejich fyziologickou funkcí popsanou v literatuře (vazba Ca^{2+} , Mg^{2+} do 3D struktury důležitá pro interakci/funkci).

9 Použitá literatura

- (1) Menčíková E., Korych B. a kol.; *Pomocné texty k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie*; Státní pedagogické nakladatelství Praha; 1989.
- (2) Pharma Reports; *Clinically Important Bacteria*; Pharma and Biotech Industry Reports; Anthem, Arizona; 2010.
- (3) Schindler J.; *Mikrobiologie- Pro studenty zdravotnických oborů*; 2. doplněné a přepracované vydání; Grada Publishing; Praha; 2014.
- (4) Fabiánová K., Státní zdravotní ústav,
<http://www.szu.cz/tema/prevence/vyskyt-cerneho-kasle-dosahl-sveho-dlouholeteho-maxima> (ke dni 2. 2. 2017).
- (5) Schindler J. a kol.; *Lékařská mikrobiologie- bakteriologie, virologie, parazitologie*; Marvil; 1996.
- (6) Weiss, A. A.; Hewlett, E. L. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 661–686; 1986.
- (7) Silbernagl, S.; Lang, F. *Color atlas of pathophysiology*; Thieme, 2010.
- (8) Welch, R. A. *Virulence Mech. Bact. Pathog. Wash. DC Am. Soc. Microbiol.*, 195–206; 1995.
- (9) Basar, T.; Havlíček, V.; Bezoušková, S.; Halada, P.; Hackett, M.; Šebo, P. *J. Biol. Chem.*, 274, 10777–10783; 1999.
- (10) Coote, J. G. *FEMS Microbiol. Rev.*, 8, 137–161; 1992.
- (11) Zaretsky, F. R.; Gray, M. C.; Hewlett, E. L. *Mol. Microbiol.*, 45, 1589–1598; 2002.
- (12) Rogel, A.; Hanski, E. *J. Biol. Chem.*, 267, 22599–22605; 1992.
- (13) Glaser, P.; Sakamoto, H.; Bellalou, J.; Ullmann, A.; Danchin, A. *EMBO J.*, 7, 3997–4004; 1988.
- (14) Barry, E. M.; Weiss, A. A.; Ehrmann, I. E.; Gray, M. C.; Hewlett, E. L.; Goodwin, M. S. *J. Bacteriol.*, 173, 720–726; 1991.
- (15) Benz, R.; Maier, E.; Ladant, D.; Ullmann, A.; Sebo, P. *J. Biol. Chem.*, 269, 27231–27239; 1994.
- (16) Wolff, J.; Cook, G. H.; Goldhammer, A. R.; Berkowitz, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 3841–3844; 1980.
- (17) Guo, Q.; Shen, Y.; Lee, Y.-S.; Gibbs, C. S.; Mrksich, M.; Tang, W.-J. *EMBO J.*, 24, 3190–3201; 2005.
- (18) Confer, D. L.; Eaton, J. W. *Science*, 217, 948–950; 1982.
- (19) Rose, T.; Sebo, P.; Bellalou, J.; Ladant, D. *J. Biol. Chem.*, 270, 26370–26376; 1995.
- (20) Relman, D. A.; Domenighini, M.; Tuomanen, E.; Rappuoli, R.; Falkow, S. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 2637–2641, 1989.
- (21) Wildová, M.; Rumlová, M. *Chem Listy*, 102, 28–34; 2008.
- (22) Kratochvíl, B.; Hušák, M.; Brynda, J.; Sedláček, J. *Chem Listy*, 102, 889-901; 2008.
- (23) Sklenář V.; *Struktura biopolymerů*; *Vesmír* 82, 314; 2003.
- (24) Vivat Hannah, V.; Atmanene, C.; Zeyer, D.; Van Dorsselaer, A.; Sanglier-Cianférani, S. *Future Med. Chem.*, 2, 35–50; 2009.
- (25) Konermann, L.; Pan, J.; Liu, Y.-H. *Chem. Soc. Rev.*, 40, 1224–1234; 2011.

- (26) Hydrogen–Deuterium Exchange - MagLab
<https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/hd-exchange>
(ke dni 10. 2. 2017).
- (27) Suchanek, M.; Radzikowska, A.; Thiele, C. *Nat. Methods*, **2**, 261–268; 2005.
- (28) Scientific, T. *Thermo Scientific Pierce-Crosslinking Technical Handbook*; 2011.
- (29) Kalkhof, S.; Ihling, C.; Mechtler, K.; Sinz, A. *Anal. Chem.*, **77**, 495–503; 2005.
- (30) Holding, A. N. *Methods*, **89**, 54–63; 2015.
- (31) Ptáčková, R.; Ječmen, T.; Novák, P.; Hudeček, J.; Stiborová, M.; Šulc, M. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 9224–9241; 2014.
- (32) Holčapek, M.; Výuka - Hmotnostní spektrometrie v organické analýze
<http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php> (ke dni 7. 3. 2017).
- (33) Purkrtová, S.; Přehled rychlých metod stanovení mikroorganismů: biochemické, imunochemické, fyzikální metody- <http://docplayer.cz/11631718-Prehled-rychlych-metod-stanoveni-mikroorganismu-biochemicke-imunochemicke-fyzikalni-metody-sabina-purkrtova.html> (ke dni 14. 5. 2017).
- (34) Laviña, M.; Pugsley, A. P.; Moreno, F. *Microbiology*, **132**, 1685–1693; 1986.
- (35) Ječmen, T.; Ptáčková, R.; Černá, V.; Dračínská, H.; Hodek, P.; Stiborová, M.; Hudeček, J.; Šulc, M. *Methods*, **89**, 128–137; 2015.
- (36) Link, A. J.; Tirrell, D. A. *Methods*, **36**, 291–298; 2005.
- (37) Anraku, Y.; Mizutani, R.; Satow, Y. *IUBMB Life*, **57**, 563–574; 2005.
- (38) Di Bilio, A. J.; Crane, B. R.; Wehbi, W. A.; Kiser, C. N.; Abu-Omar, M. M.; Carlos, R. M.; Richards, J. H.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3181–3182; 2001.
- (39) Chong, S.; Mersha, F. B.; Comb, D. G.; Scott, M. E.; Landry, D.; Vence, L. M.; Perler, F. B.; Benner, J.; Kucera, R. B.; Hirvonen, C. A.; Pelletier, J. J.; Paulus, H.; Xu, M.-Q. *Gene*, **192**, 271–281; 1997.
- (40) Chin, D.; Means, A. R. *Trends Cell Biol.*, **10**, 322–328; 2000.