

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



Radovan Fišer

***Studium interakcí bakteriálních toxinů a organických molekul s biologickými
membránami s použitím fluorescenčních
a vodivostních metod***

*Study of interactions of bacterial toxins a organic molecules with biological membranes
using fluorescence a conductivity methods*

Habilitační práce

Praha, 2022

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| 1 Seznam publikací obsažených v habilitační práci..... | 3 |
| 2 Úvod a poděkování..... | 7 |
| 3 Průvodce publikacemi - tématické okruhy..... | 12 |
| 3.1 Bakteriální pórotvorný toxin CyaA a jeho působení in vivo..... | 12 |
| 3.2 Vlastnosti pórů toxinu CyaA v umělých membránách..... | 14 |
| 3.3 Úloha jednotlivých částí toxinu CyaA v jeho aktivitě..... | 17 |
| 3.4 Objasnění působení vybraných bakteriocinů..... | 20 |
| 3.5 <i>Mechanismus účinku nízkomolekulárních membránově aktivních látek.....</i> | <i>21</i> |
| 3.6 <i>Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu struktury proteinů.....</i> | <i>23</i> |
| 4 Vývoj konkrétních algoritmů a analytických nástrojů..... | 26 |
| 4.1 Správná normalizace dat..... | 26 |
| 4.2 Analýza digitálního obrazu – bakteriální kolonie..... | 27 |
| 4.3 Analýza histogramů..... | 31 |
| 4.3.1 <i>Určení chyby parametrů - „Bootstrap“ analýza.....</i> | <i>31</i> |
| 4.3.2 <i>Vytváření histogramů a „Kernel Density Estimation“.....</i> | <i>35</i> |
| 4.3.3 <i>Logaritmický histogram - pro studium široké škály hodnot.....</i> | <i>38</i> |
| 4.4 Synchronní fluorescenční spektra při kvantifikaci intenzity fluorescence..... | 40 |
| 4.5 Strukturní modely molekul a „Podmíněná pravděpodobnost“..... | 45 |
| 5 Seznam literatury..... | 50 |
| 6 Přílohy - publikace obsažené v habilitační práci..... | 54 |

1 Seznam publikací obsažených v habilitační práci

- P01** Fišer, R., Mašín, J., Basler, M., Krůšek, J., Špuláková, V., Konopásek, I., Šebo, P., **2007**. Third activity of *Bordetella* adenylate cyclase (AC) toxin-hemolysin. Membrane translocation of AC domain polypeptide promotes calcium influx into CD11b⁺ monocytes independently of the catalytic and hemolytic activities. *J. Biol. Chem.* 282, 2808–2820.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609979200>
- P02** Basler, M., Knapp, O., Mašín, J., Fišer, R., Maier, E., Benz, R., Šebo, P., Osička, R., **2007**. Segments crucial for membrane translocation and pore-forming activity of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *J. Biol. Chem.* 282, 12419–12429. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611226200>
- P03** Bumba, L., Mašín, J., Fišer, R., Šebo, P., **2010**. *Bordetella* adenylate cyclase toxin mobilizes its beta2 integrin receptor into lipid rafts to accomplish translocation across target cell membrane in two steps. *PLoS Pathog.* 6, e1000901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000901>
- P04** Wald, T., Petry-Podgorska, I., Fišer, R., Matoušek, T., Dědina, J., Osička, R., Šebo, P., Mašín, J., **2014**. Quantification of potassium levels in cells treated with *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Anal. Biochem.* 450, 57–62.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.10.039>
- P05** Fišer, R., Mašín, J., Bumba, L., Pospíšilová, E., Fayolle, C., Basler, M., Sadilková, L., Adkins, I., Kamanová, J., Černý, J., Konopásek, I., Osička, R., Leclerc, C., Šebo, P., **2012**. Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. *PLoS Pathog.* 8, e1002580.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002580>
- P06** Mašín, J., Fišer, R., Linhartová, I., Osička, R., Bumba, L., Hewlett, E.L., Benz, R., Šebo, P., **2013**. Differences in purinergic amplification of osmotic cell lysis by the pore-forming RTX toxins *Bordetella pertussis* CyaA and *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA: the role of pore size. *Infect. Immun.* 81, 4571–4582.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00711-13>

- P07** Švédová, M., Mašín, J., **Fišer, R.**, Černý, O., Tomala, J., Freudenberg, M., Tučková, L., Kovář, M., Dadaglio, G., Adkins, I., Šebo, P., **2016**. Pore-formation by adenylate cyclase toxoid activates dendritic cells to prime CD8⁺ a CD4⁺ T cells. *Immunol. Cell Biol.* 94, 322–333. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.87>
- P08** **Fišer, R.**, Konopásek, I., **2009**. Different modes of membrane permeabilization by two RTX toxins: HlyA from *Escherichia coli* a CyaA from *Bordetella pertussis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1249–1254. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.03.019>
- P09** Roderová, J., Osičková, A., Suková, A., Mikušová, G., **Fišer, R.**, Šebo, P., Osička, R., Mašín, J., **2019**. Residues 529 to 549 participate in membrane penetration a pore-forming activity of the *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* 9, 5758. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42200-2>
- P10** Mašín, J., Osičková, A., Suková, A., **Fišer, R.**, Halada, P., Bumba, L., Linhartova, I., Osička, R., Šebo, P., **2016**. Negatively charged residues of the segment linking the enzyme a cytolysin moieties restrict the membrane-permeabilizing capacity of adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* 6, 29137. <https://doi.org/10.1038/srep29137>
- P11** Mašín, J., Roderová, J., Osičková, A., Novák, P., Bumba, L., **Fišer, R.**, Šebo, P., Osička, R., **2017**. The conserved tyrosine residue 940 plays a key structural role in membrane interaction of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Sci. Rep.* 7, 9330. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09575-6>
- P12** Lepesheva, A., Osičková, A., Holubová, J., Jurnecka, D., Knoblochová, S., Espinosa-Vinals, C., Bumba, L., Škopová, K., **Fišer, R.**, Osička, R., Šebo, P., Mašín, J., **2021**. Different roles of conserved tyrosine residues of the acylated domains in folding a activity of RTX toxins. *Sci. Rep.* 11, 19814. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99112-3>
- P13** Suková, A., Bumba, L., Srb, P., Veverka, V., Staněk, O., Holubova, J., Chmelik, J., **Fišer, R.**, Šebo, P., Mašín, J., **2020**. Negative charge of the AC-to-Hly linking segment modulates calcium-dependent membrane activities of *Bordetella* adenylate cyclase toxin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1862, 183310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183310>
- P14** Motlová, L., Klímová, N., **Fišer, R.**, Šebo, P., Bumba, L., **2020**. Continuous Assembly of β -Roll Structures Is Implicated in the Type I-Dependent Secretion of Large Repeat-in-Toxins (RTX) Proteins. *J. Mol. Biol.* 432, 5696–5710. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.020>

- P15** Osičková, A., Khaliq, H., Mašín, J., Jurnečka, D., Suková, A., **Fišer, R.**, Holubová, J., Staněk, O., Šebo, P., Osička, R., **2020**. Acyltransferase-mediated selection of the length of the fatty acyl chain a of the acylation site governs activation of bacterial RTX toxins. *J. Biol. Chem.* 295, 9268–9280. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014122>
- P16** Seydlová, G., Beranová, J., Bíbová, I., Dienstbier, A., Drzmisek, J., Mašín, J., **Fišer, R.**, Konopásek, I., Večerek, B., **2017**. The extent of the temperature-induced membrane remodeling in two closely related *Bordetella* species reflects their adaptation to diverse environmental niches. *J. Biol. Chem.* 292, 8048–8058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781559>
- P17** Mičenkova, L., Bosák, J., Kučera, J., Hrala, M., Dolejšová, T., Šedo, O., Linke, D., **Fišer, R.**, Šmajš, D., **2019**. Colicin Z, a structurally a functionally novel colicin type that selectively kills enteroinvasive *Escherichia coli* a *Shigella* strains. *Sci. Rep.* 9, 11127. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47488-8>
- P18** Dolejšová, T., Sokol, A., Bosák, J., Šmajš, D., Konopásek, I., Mikušová, G., **Fišer, R.***, **2019**. Colicin U from *Shigella boydii* Forms Voltage-Dependent Pores. *J. Bacteriol.* 201, e00493-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00493-19>
- P19** Riedlová, K., Dolejšová, T., **Fišer, R.***, Cwiklik, L.*, **2022**. H1 helix of colicin U causes phospholipid membrane permeation. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1864, 183866. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2022.183866>
- P20** Panova, N., Zborníková, E., Šimák, O., Pohl, R., Kolář, M., Bogdanová, K., Večeřová, R., Seydlová, G., **Fišer, R.**, Hadravová, R., Šanderová, H., Vítovská, D., Šiková, M., Látal, T., Lovecká, P., Barvík, I., Krásný, L., Rejman, D., **2015**. Insights into the Mechanism of Action of Bactericidal Lipophosphonoxins. *PLoS One* 10, e0145918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145918>
- P21** Seydlová, G., Pohl, R., Zborníková, E., Ehn, M., Šimák, O., Panova, N., Kolář, M., Bogdanová, K., Večeřová, R., **Fišer, R.**, Šanderová, H., Vítovská, D., Sudzinová, P., Pospíšil, J., Benada, O., Křížek, T., Sedlák, D., Bartůněk, P., Krásný, L., Rejman, D., **2017**. Lipophosphonoxins II: Design, Synthesis, a Properties of Novel Broad Spectrum Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* 60, 6098–6118. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00355>

- P22** Látrová, K., Havlová, N., Večeřová, R., Pinkas, D., Bogdanová, K., Kolář, M., **Fišer, R.**, Konopásek, I., Do Pham, D.D., Rejman, D., Mikušová, G., **2021**. Outer membrane a phospholipid composition of the target membrane affect the antimicrobial potential of first- a second-generation lipophosphonoxins. *Sci. Rep.* 11, 10446. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89883-0>
- P23** Seydlová, G., Sokol, A., Lišková, P., Konopásek, I., **Fišer, R.***, **2019**. Daptomycin Pore Formation a Stoichiometry Depend on Membrane Potential of Target Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63, e01589-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01589-18>
- P24** Matyska Lišková, P., **Fišer, R.**, Macek, P., Chmelik, J., Sykora, J., Bednarova, L., Konopásek, I., Bumba, L., **2016**. Probing the Ca²⁺-assisted π-π interaction during Ca²⁺-dependent protein folding. *Soft Matter* 12, 531–541. <https://doi.org/10.1039/c5sm01796c>
- P25** Lišková, P., Konopásek, I., **Fišer, R.***, **2019**. Simple Way to Detect Trp to Tb³⁺ Resonance Energy Transfer in Calcium-Binding Peptides Using Excitation Spectrum. *J. Fluoresc.* 29, 9–14. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2326-0>
- P26** Beranová, J., Seydlová, G., Kozak, H., Benada, O., **Fišer, R.**, Artemenko, A., Konopásek, I., Kromka, A., **2014**. Sensitivity of bacteria to diamond nanoparticles of various size differs in gram-positive a gram-negative cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 179–186. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12373>
- P27** Lišková, P., Beranová, J., Ukraintsev, E., **Fišer, R.**, Kofroňová, O., Benada, O., Konopásek, I., Kromka, A., **2018**. Diamond nanoparticles suppress lateral growth of bacterial colonies. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 170, 544–552. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.057>

* korespondující autor

2 Úvod a poděkování

V průběhu posledních patnácti let jsem se věnoval poměrně různorodým vědeckým tématům, o kterých bych chtěl pojednat v této práci. Většina mého výzkumu probíhala na Katedře genetiky a mikrobiologie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy a část v Mikrobiologickém ústavu, Akademie věd, ČR. Výsledkem je asi 40 vědeckých prací, z nichž 27 je součástí této práce habilitační. V první skupině prací jsem především sám navrhoval a prováděl experimenty. Ve většině ostatních prací jsem se zabýval hlavně analýzou naměřených dat a vývojem nových postupů, jak výsledky zobrazovat, porovnávat a kvantifikovat, a jak na ně celkově nahlížet. Práci proto dělím na dvě části. V kapitole 3 (str. 12) čtenář najde přehled vědeckých témat, která se v naší skupině v minulých letech řešila. Kapitola 4, (str. 26) pak přináší popis a vysvětlení vybraných ukázkových algoritmů, které jsem během tohoto výzkumu při analýze dat použil. Některé tyto postupy jsem převzal a aplikoval, jiné jsem sám vyvinul. Bohužel v některých případech nebylo možné detaily těchto metod dopodrobna vysvětlit v publikovaných člancích, proto jsem se o to částečně pokusil právě v této práci. Doufám, že zde čtenář třeba najde inspiraci pro svůj vlastní výzkum. V některých případech se stalo, že jsem určitý algoritmus *de novo* vyvinul a úspěšně použil. To pak vedlo k myšlence publikovat kromě samotných výsledků i tento postup v separátní, metodicky zaměřené práci. Při provádění rešerše na dané téma jsem pak několikrát zjistil, že podobný přístup nejenže již existuje, ale že se v jiných vědeckých odvětvích – někdy velmi vzdálených – třeba již několik desetiletí využívá (kap. 4.3.2). To pro mne bylo samozřejmě zklamáním, ale zároveň jistým zadostiučiněním, že můj postup byl správný, jinde bráný jako standardní. S něčím obdobným se docela jistě setkávají např. profesionální programátoři, pro které je jednodušší vyvinout vlastní program, než se snažit proniknout do detailů již hotového cizího kódu. Já však nejsem ani programátor ani statistik, ale mikrobiolog. Snad právě proto by můj pohled na jednotlivé problémy, jakkoli někdy poněkud naivní, mohl pomoci ostatním biologům při řešení jejich vlastních vědeckých otázek. V druhé části práce jsem plánoval popsat i některé postupy a výsledky, které již zcela jistě nebudou publikovány, protože se jednalo o jakési slepé cesty (např. plánovaná kapitola Artefakty

v polarizované fluorescenční mikroskopii). Tyto kapitoly měly posloužit jako ukázka směru, kterým je vhodné se nevydávat.

Vzhledem k tomu, že popis těch „slepých cest“ zabral relativně dosti místa, rozhodl jsem se jej do habilitační práce nakonec nezařadit. Jako určité upozornění na to, že je dobré mít o systému dostatek informací dříve, než jej začneme zkoumat, odkazuji na kapitolu 4.5, na str. 45. V kapitolách 4.2 a 4.3 jsou dále vysvětleny algoritmy a postupy, které byly sice využity při přípravě publikací, ale nebyly, podle mého názoru, dostatečně detailně vysvětleny. Ani zde předkládaný výklad není kompletní, spíše by měl být názorný a snadno pochopitelný.

Naprostá většina publikací v této práci se týká biologických membrán (**P01-P05**, **P08-P13**, **P16-P23**). Nejvíce jsem se podílel na výzkumu bakteriálních RTX toxinů (CyaA, HlyA, ApxIA, RtxA) a jejich schopnosti vytvářet v membránách póry (**P01-P15**), nebo na výzkumu bakteriocinů (**P17**, **P18**, **P19**). Ale účastnil jsem se i experimentů, při kterých byl sledován vliv menších organických molekul, ať už přírodního původu (**P23**) nebo syntetických (**P20**, **P21**, **P22**), na stabilitu membrán. Případně byly studovány mechanismy, kterými se buňka těmto látkám brání nebo se na ně adaptuje. V poslední době je v naší laboratoři takto studován efekt surfaktinu, tedy produktu bakterie *Bacillus subtilis* (Pinkas et al., 2020; Seydlová et al., 2013; Uttlová et al., 2016). Zvláštními případy pak bylo pozorování vlivu alkoholů s různou délkou řetězce na tekutost bakteriálních membrán (Vaňousová et al., 2018) nebo účinek trojmocných iontů Al^{3+} na plazmatickou membránu rostlin (Krtková et al., 2012). Z méj experimentální práce se jednalo převážně o vodivostní elektrofyziologické metody, které jsem na našem pracovišti zavedl po zkušenostech z pobytu v laboratoři prof. Rolanda Benze na univerzitě ve Würzburgu. Samostatná témata pak představují práce, ve kterých jsem vyvíjel metody digitálního zpracování mikroskopického obrazu pro kvantifikaci změn v cytoskeletu rostlin (Matoušková et al., 2014) nebo tvaru bakteriálních kolonií (**P26**, **P27**). Dále jsem využíval relativně pokročilé metody fluorescenční spektroskopie, které byly užitečné při sledování vazebných míst pro vápenaté ionty v molekulách proteinů a konfigurace aromatických aminokyselin u bakteriálních toxinů. Kromě využití anizotropie fluorescence se jednalo například o metody časově rozlišené fluorescence nebo dekonvoluce emisních spekter (**P24**, **P25**).

Část mé habilitační práce se dotýká statistických nebo numerických metod: způsobů normalizace dat (kap. 4.1), analýzy digitálních fotografií (kap. 4.2), kvantifikace chyby nalezených parametrů při prokládání funkcí (kap. 4.3.1), využití ne zcela běžných forem histogramů (kap. 4.3.2, 4.3.3), synchronních fluorescenčních spekter (kap. 4.4) nebo podmíněné pravděpodobnosti při studiu makromolekul (kap. 4.5). Prosím čtenáře o shovívavost při procházení těchto kapitol. Zmíněné postupy jsem se snažil vysvětlit především tak, aby byly dobře pochopitelné, někdy částečně na úkor dokonalé exaktnosti.

Poděkování

Chtěl bych poděkovat celému týmu Laboratoře bakteriální fyziologie za pomoc při výzkumu a za přátelské prostředí. Můj dík patří současným i dřívějším kolegům a kolegyním, Ivovi Konopáskovi, Janě Beranové, Gabriele Mikušové, Petře Liškové, Lucii Motlové, Tereze Dolejšové, Anně Sukové, Kláře Látrové, Milici Dugić, Albertu Sokolovi, Jakubu Budilovi, Anně Benešové, Haně Brzobohaté, Kateřině Vaňousové, Márii Dobřemyslové, Anně Beranové, Andrei Moserové, Veronice Špulákové, Evě Pospíšilové, Janě Roderové, Dominiku Pinkasovi a dalším diplomovým a bakalářským studentům.

Velké poděkování patří též naší obětavé laborantce, Lucii Jánské.

Chtěl bych vyjádřit poděkování Peteru Šebovi a mnoha členům jeho týmu, zejména pak Jiřímu Mašínovi, Radimu Osičkovi, Ladislavu Bumbovi, Branislavu Večerkovi, Tomáši Waldovi, Janě Kamanové a Adrianě Osičkové za spolupráci na bakteriálních RTX toxinech.

Můj dík patří Davidu Šmajsovi, Juraji Bosákovi, Kateřině Snopkové, Lukaszowi Cwiklikovi, Kamile Riedlové a dalším kolegům za spolupráci na bakteriocinech.

Musím také poděkovat Dominiku Rejmanovi a jeho skupině za spolupráci na projektu s vývojem lipofosfonoxinů.

Rád bych poděkoval Janě Humpolíčkové, Aleši Bendovi, Janu Sýkorovi a Markovi Cebecauerovi, ze skupiny Martina Hofa, za pomoc s měřením fluorescenční korelační spektroskopie, polarizované konfokální a TIRF-mikroskopie a časově rozlišené anizotropie fluorescence v kryostatu.

Chtěl bych poděkovat Rolandu Benzovi za opakovanou možnost provádět experimenty na planárních membránách v jeho laboratoři. Dále děkuji Jiřímu Bokovi za ochotu při přípravě programu pro sběr vodivostních dat.

Děkuji Janu Krůškovi za neocenitelnou pomoc s měřením intracelulární koncentrace vápníku a za obohacující diskuse ohledně umělých membrán. Musím také poděkovat Marku Baslerovi za počáteční impuls při psaní skriptů, Jiřímu Marešovi a Alexandru Károvi za inspiraci při zdokonalování kódu.

Jsem moc vděčný všem kolegům ze sousedních kateder nebo vzdálenějších skupin, kteří občas do naší laboratoře přinášejí svá výzkumná témata a tím naši skupinu stále posouvají kupředu. Případně nám umožňují provádět výzkum na svém vybavení. Děkuji skupině Kateřiny Schwarzerové, Jitky Forstové, Hany Španielové, Jana Černého, Martina Pospíška, Pavla Doležala, Pavla Hrouzka, Alexandra Kromky, Oldřicha Benady, Olgy Valentové.

Chtěl bych moc poděkovat svojí ženě Barboře za její trvalou podporu. Ale i za to, že se tak pečlivě stará o praktickou stránku chodu naší domácnosti. Svým synům, Františkovi, Vojtěchovi a Antonínovi jsem vděčný za pestré diskuse o vědeckých i společenských tématech.

Můj velký dík patří též mým rodičům, kteří mě dovedli k vědecké práci.

Tato práce vznikla za podpory projektem GAČR, č. 22-08857S:
„Strukturní determinanty účinku membránově aktivních antimikrobiálních molekul“.

V Praze dne 23.7.2022

Radovan Fišer

3 Průvodce publikacemi - tématické okruhy

3.1 Bakteriální pórotvorný toxin CyaA a jeho působení *in vivo*

Má vědecká práce začala na přelomu milénia výzkumem působení bakteriálního toxinu CyaA na různé typy fosfolipidových membrán. Tento protein je produkován bakterií *Bordetella pertussis*, která vyvolává u lidí onemocnění černý kašel. Toto výzkumné téma si našlo místo v Laboratoři bakteriální fyziologie na Přírodovědecké fakultě díky spolupráci se skupinou prof. Petera Šeba z Mikrobiologického ústavu, AV ČR. Samotný toxin patří mezi takzvané RTX proteiny, neboť obsahuje ve své struktuře C-terminální doménu s opakujícími se sekvencemi (takzvané Repeats-in-ToXin), zodpovědnými za vazbu vápenatých iontů. Protein CyaA je také nazýván adenylát-cyklázový toxin, neboť je schopen translokovat do buněk N-koncovou enzymatickou doménu, která následně konvertuje ATP na cAMP (Ladant a Ullmann, 1999). Tento proces je navíc aktivován buněčným kalmodulinem (Glaser et al., 1988b, 1988a). Samotný proces translokace enzymatické domény CyaA je velmi důležitý i z hlediska různých aplikací. Toxoidy CyaA jsou v poslední době využívány k dopravě cizorodých antigenů do antigen-prezentujících buněk v rámci výzkumu vakcín proti virovým chorobám a při testování terapie některých nádorových onemocnění (Chenal a Ladant, 2018; Dadaglio et al., 2014; Fayolle et al., 2001; Ladant, 2021; Mascarell et al., 2005). Toxoid CyaA je pochopitelně velmi dobře použitelný i ve vakcínách proti samotné pertusi (Šebo et al., 2014).

První a poměrně stěžejní práce, kterou zde předkládám (**P01**), se týká působení CyaA na cílové buňky, které nesou přirozený receptor toxinu, tedy integrin CD11b/CD18. Podařilo se nám prokázat, že protein CyaA po vazbě na povrch buňky makrofágů vyvolává zvýšení intracelulární koncentrace volných iontů Ca^{2+} , což vede k další vnitrobuněčné signalizaci, případně až k smrti buněk nekrózou. Pomocí specifických inhibitorů buněčných kanálů a pomocí látek interferujících s funkcí intracelulárních zásobáren Ca^{2+} se nám podařilo prokázat, že ionty Ca^{2+} vstupují do napadených buněk z vnějšího prostředí přímým působením toxinu CyaA. Protein CyaA má ve své sekvenci predikované transmembránové úseky, které jsou

zodpovědné za tvorbu membránových pórů (**P02**), (Osicková et al., 1999). Zajímavé proto bylo, že bodové mutace v těchto segmentech sice měly vliv na hemolytickou aktivitu CyaA (měřenou na ovčích erythrocytech), ta však pro jednotlivé mutantní formy nekorelovala se schopností zvyšovat intracelulární hladinu $[Ca^{2+}]_i$. Spíše naopak, mutantní formy CyaA, které vykazovaly vysokou hemolytickou aktivitu způsobovaly pouze slabý vstup Ca^{2+} do buněk makrofágů (**P01**). Objevila se však ještě jiná významná závislost. Proteiny (tedy toxoidy), které měly v enzymatické doméně zaneseny bodové mutace, nejspíš výrazně měnící konformaci této části toxinu, vykazovaly sníženou schopnost zvyšovat hladinu buněčných iontů vápníku. Toxoid s odstraněnou enzymatickou doménou pak neindukoval vůbec žádný vstup vápníku do buněk. Vzhledem k tomu, že u těchto toxoidů nezáležela „ Ca^{2+} aktivita“ na schopnosti produkce intracelulárního cAMP, ale spíše na schopnosti samotné translokace N-koncové části proteinu, bylo možné uzavřít, že ionty Ca^{2+} vstupují do buněk během translokace enzymu přes membránu. Okamžik, ve kterém dochází během translokace k narušení membrány pro ionty Ca^{2+} , se dá výrazně prodloužit, pokud se na CyaA naváže monoklonální protilátka 3D1, která interaguje se segmentem toxinu mezi enzymatickou doménou a hydrofóbní částí. Dojde tak k jakémusi uzamčení CyaA do konformace, která dlouhodoběji vpouští ionty Ca^{2+} do buňky (**P03**). Zajímavý je pak další osud molekul CyaA. Zvýšením hladiny Ca^{2+} těsně pod membránou je aktivována proteáza calpain, která je schopna rozštěpit molekulu talinu, který běžně přichycuje integrinový receptor toxinu k aktinovému cytoskeletu. Následkem je tedy uvolnění tohoto komplexu CyaA-integrin a jeho přesun do lipidických raftů, kde je s největší pravděpodobností translokace enzymatické domény dokončena (**P03**). Aktivovaný calpain je dokonce schopen odštěpit enzymatickou doménu CyaA, která pak zůstává enzymaticky aktivní v cytozolu buňky (Uribe et al., 2013).

Buňky se napadení toxinem aktivně brání a jsou schopny jej z povrchu odstraňovat pomocí endocytózy nebo makropinocytózy. Zabrání tak nenávratnému úbytku intracelulárního ATP vlivem enzymatické aktivity CyaA a také úniku iontů z buněk (**P04**) kvůli tvorbě toxinových membránových pórů. Toxin CyaA se ale patrně vyvinul tak, že sám aktivní odklizení buňkou z plazmatické membrány zpomaluje. Takové mutantní formy CyaA, které jsou enzymaticky nefunkční (netoxické) ale stále

dokáží vpouštět ionty Ca^{2+} do buněk, zabraňují rychlé makropinocytóze, během které by byl jinak navázaný toxin přesunut do lysozómů k degradaci (**P05**).

CyaA tvoří poměrně úzké membránové póry. Literární údaje, vycházející z pokusů s osmoprotektanty hemolýzy a měření průchodu různých iontů, udávají průměr póru asi 0,6-0,8 nm (Benz et al., 1994; Ehrmann et al., 1991). Zjistili jsme, že díky malým rozměrům pórů CyaA jimi nemohou z buněk unikat molekuly ATP. Tím se CyaA zásadně liší od příbuzného toxinu ApxIA. U něj jsme pozorovali, že únik ATP vede k aktivaci purinergní signalizace buněk (za účasti P2X_7 receptorů) a tedy zesílení cytopatického efektu. Mechanismus působení obou toxinů se pak liší i v tom, že pro lyzi jedné buňky (červené krvinky) stačí několik málo molekul ApxIA, ale je nutné navázání velkého počtu molekul CyaA (**P06**). Pórotvorné schopnosti toxinu CyaA mají ještě jeden praktický dopad. Toxoidy CyaA se testují pro účely vakcinace. Protein sám o sobě má schopnost dopravovat antigeny insertované do enzymatické domény přímo do buněk presentujících antigeny, např. do dendritických buněk, které nesou integrinový receptor pro CyaA. Tvorba pórů na membráně těchto buněk vede k jejich aktivaci a to bez účasti inflamasonu a Toll-like receptorů. Výsledkem pak může být souběžná stimulace CD8^+ a CD4^+ T-lymfocytů (**P07**). Toxoid CyaA tedy vykazuje vlastnosti velmi účinného adjuvans.

Publikace **P01-P07** tedy přinášejí poměrně překvapivé nové informace o fungování toxinu CyaA. Některé z těchto prací byly vědeckou komunitou dobře přijaty a jsou odpovídajícím způsobem citovány.

3.2 Vlastnosti pórů toxinu CyaA v umělých membránách

U toxinů, které tvoří póry (zkr. PFT – z angl. Pore Forming Toxins) v biologických membránách a umělých fosfolipidových dvojvrstvách, byly nejdříve ze všeho pozorovány jejich hemolytické schopnosti, tedy únik hemoglobinu z erytrocytů. Z těchto historických důvodů jsou pórotvorné toxiny nazývány hemolyziny. O hodně později byly většinou objeveny skutečné cílové buňky, které na svém povrchu nesou specifický receptor pro ten který toxin. Mechanismus tvorby pórů molekulami PFT byl dále studován na umělých membránách, jež mají zásadní výhodu, kterou je definované fosfolipidové složení a s tím související vysoká reprodukovatelnost výsledků experimentů. Jedná se hlavně o planární membrány

(viz **P02**, **P09-P12**) a o fosfolipidové váčky o velikosti stovek nanometrů, takzvané liposomy (**P08**). PFT působí na liposomech většinou obdobně jako na erytrocytech; dochází k vazbě podjednotek PFT, inzerci monomerů do membrány, oligomerizaci podjednotek (pouze tam, kde je funkční jednotkou oligomer) a tvorbě vodivého póru. V některých případech může být pořadí jednotlivých kroků poněkud odlišné. Bylo opakovaně prokázáno, že liposomy jsou velmi dobrým modelem pro studium PFT, až na jedno omezení. Většinou je obtížné na membráně liposomů ustanovit a nadále udržet elektrický potenciál. Proto ty toxiny, které po vazbě na buňku elektrický potenciál vyžadují pro svou inzerci do dvojvrstvy, nemohou narušovat liposomy identickým mechanismem, jako krevní buňky. Z tohoto důvodu jsou liposomy pokládány některými autory za méně vhodný model.

Lyze liposomů je nejčastěji sledována pomocí úniku enkapsulovaných fluorescenčních molekul - sond, např. karboxyfluoresceinu, kalceinu, nebo dvojice molekul ANTS/DPX, tedy dvojice fluorescenční sonda/zhášeč. Narušení integrity membrány liposomu se pak projevuje únikem jejich obsahu a následným nárůstem fluorescence, která je monitorována v čase. Počáteční rychlost praskání liposomů pak bývá úměrná počtu funkčních pórů v membránách liposomů. Pokud je takový pokus prováděn opakovaně s různými přidávanými koncentracemi toxinu, je možné sledovat, jestli je lyze kooperativní, tedy vyvolaná skutečně oligomery toxinu (Menestrina, 1988). Nejvyšší možnou fluorescenci je pak možné jednoduše stanovit přidáním vhodného detergentu, který membrány liposomů zcela rozpustí. Z teoretického hlediska jsou zajímavé situace, kdy je přídavek PFT tak malý (nebo nadbytek liposomu tak velký), že nedoje ani po velmi dlouhé době k úplnému rozrušení všech membrán. Může se totiž jednat o jednu z dvou možností; buď prakticky všechny liposomy ztrácí část svého obsahu (jde tedy o „postupný únik“), nebo zůstanou v nádobě dvě populace liposomů (praskání typu „vše-nebo-nic“). Jedna populace pak reprezentuje liposomy, na které se navázal dostatek molekul PFT a tyto liposomy zcela praskly. Druhá populace pak představuje ty liposomy, které zůstaly intaktní, protože se na ně – díky náhodnému rozmístování molekul PFT – nedostalo dost aktivního toxinu, který proto nemohl např. vytvořit funkční oligomery. Při vazbě relativně malého počtu toxinových molekul na jednotlivé liposomy lze totiž očekávat Poissonovo rozdělení jejich počtu (Stockbridge, 2021).

Jestli se jedná o „postupný únik“ z liposomů, nebo praskání typu „vše-nebo-nic“, má poměrně zásadní význam pro pochopení účinku PFT. „Postupný únik“ bývá většinou vysvětlován úzkým průřezem vytvářených pórů a jejich relativně krátkou dobou otevření, zatímco lyze „vše-nebo-nic“ naznačuje tvorbu širokých a stabilně otevřených membránových kanálů. Rozlišení těchto dvou typů liposomální lyze je možné buď mechanickou separací liposomů pomocí gelové chromatografie (Schwarz a Arbuzova, 1995), nebo s využitím systému ANTS/DPX (8-Aminonaphthalene-1,3,6-Trisulfonic Acid, *p*-Xylene-Bis-Pyridinium Bromide) a důmyslné metody opakovaných přísadků zhasiče DPX (Ladokhin et al., 1997, 1995).

Během studia toxinu CyaA jsme se pokusili zjistit, jaký typ lyze na liposomech indukuje. Prvotní pokusy byly prováděny na směsi rostlinných fosfolipidů, kvůli jejich dobré dostupnosti a přiměřené aktivitě CyaA (Mašín et al., 2004). V současnosti je CyaA studován i na směsích syntetických lipidů (**P13**, dále A. Suková, připravovaná publikace). Pokusy o objasnění mechanismu lyze jsem prováděl na liposomech ze sojových fosfolipidů, které byly plněné ANTS/DPX. Ukázalo se, že CyaA vyvolává „postupný únik“ DPX z liposomů (**P08**), přičemž molekuly ANTS procházejí póry CyaA mnohem pomaleji. V této práci jsme rovněž ověřili, že se v roztoku DPX chová jako kationt a ANTS jako aniont a bylo tedy možné sledovat určitou iontovou selektivitu (vyjádřenou parametrem α) formovaných pórů (Ladokhin et al., 1997). Poměrně velkým překvapením bylo, že bodové mutace v CyaA, které vyvolávají tvorbu kanálů se sníženou kationtovou selektivitou na planárních membránách (s elektrickým potenciálem), vykazovaly rovněž sníženou propustnost pro DPX oproti ANTS na liposomech. Znamená to, že použité liposomy byly poměrně citlivé na detailní vlastnosti vytvářených pórů. Toxin CyaA na planárních membránách a patrně i na živých buňkách vyžaduje membránový potenciál pro svojí aktivitu (Knapp et al., 2008). To se zdá být v rozporu s našimi pozorováními na liposomech a vedlo nás to k odvážné hypotéze. Totiž, že i velmi malý počet molekul CyaA, pokud by vytvořily v membráně liposomu póry, by mohl svou vlastní iontovou selektivitou vyvolat vznik elektrického membránového potenciálu. CyaA totiž dovozoval průchod převážně DPX⁺, kterého je v lumen liposomů nadbytek. Přesunem těchto kationtů do vnějšího prostředí tak mohl vznikat elektrický potenciál, který by následně mohl umožnit

navázání a inzerci většího množství molekul CyaA. Pro ověření této hypotézy by bylo potřeba kvantifikovat membránový potenciál na liposomech.

3.3 Úloha jednotlivých částí toxinu CyaA v jeho aktivitě

Další práce (**P09-P13**) se zaměřovaly na vysvětlení úlohy konkrétních částí toxinu CyaA v toxické aktivitě a zejména při tvorbě membránového póru. Kromě toxinu CyaA jsme zkoumali také další příbuzné RTX toxiny, HlyA produkovaný *Escherichia coli* a ApxIA, který vytváří *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Oba toxiny byly využity jako určité kontroly. U obou toxinů totiž platí, že tvorba pórů je hlavním mechanismem jejich působení, nevykazují například žádnou enzymatickou aktivitu. Obě molekuly jsou pochopitelně delší dobu zkoumány také v jiných laboratořích (Benz, 2016; Benz et al., 2014; Menestrina, 1988; Xu et al., 2006). Naše práce vycházely především z cílené mutagenese a měření na planárních lipidových membránách. Obsahovaly však také ověření platnosti závěrů *in vivo*, nejčastěji na červených krvinkách. První mapování jednotlivých částí CyaA proběhlo již v diskutované práci **P02**, kde jsme zkoumali dva z pěti předpovězených transmembránových helixů toxinu CyaA (pozice 502-522 a 565-591) a extracelulární smyčku (550-564), která na jeden z helixů navazuje. Zajímavým závěrem bylo, že glutamát v pozici 570 je zodpovědný za značnou selektivitu póru pro kationty. Spolu s dalším zbytkem kyseliny glutamové (v pozici 581) určuje toto reziduum schopnost CyaA translokovat N-koncovou enzymatickou doménu přes cílovou membránu (**P02**). Další studium detailů transmembránové hydrofóbní domény CyaA pak pokračovalo v následujících letech.

V publikaci **P09** jsme zkoumali α -helix, o kterém se předpokládá, že se vytvoří mezi zbytky 529 až 549. Konkrétně substituce zbytku G531 za prolin selektivně snížila hemolytickou kapacitu, ale neovlivnila „AC translokační aktivitu“ toxinu. Naproti tomu mutace CyaA v pozicích A538 nebo A546 vedly k selektivnímu narušení schopnosti translokovat AC doménu přes buněčnou membránu, bez vlivu na hemolytickou aktivitu. Tyto mutantní toxiny tvořily v planárních membránách póry s velmi nízkou frekvencí a s různými vodivostními stavy. Substituce A538P dokonce zrušila napětím aktivované zvýšení membránové aktivity CyaA.

Předpovězený α -helix (529 - 549) zjevně hraje klíčovou roli v pronikání CyaA do cílové plazmatické membrány a v aktivitě toxinu při tvorbě pórů (**P09**).

V práci **P10** jsme experimentálně identifikovali transmembránové úseky CyaA a potvrdili tak správnost predikčních algoritmů. Dále jsme se zaměřili na část molekuly propojující enzymatickou a hydrofóbní doménu. Tato část je zjevně částečně zanořená do membrány a je patrně spoluzodpovědná za translokaci enzymatické domény. S touto aktivitou souvisí přítomnost několika zbytků argininu v úseku 390 až 487. Když dojde k cílené záměně těchto aminokyselina za jiné zbytky, modifikovaná molekula CyaA tak ztrácí schopnost translokace. Naopak kyselé aminokyseliny v této oblasti nesouvisí s translokací, ale určují vlastnosti membránových pórů CyaA. (**P10**). Potvrzuje to tedy hypotézu, že za každou aktivitu toxinu (translokaci oproti tvorbě pórů) jsou zodpovědné jiné konformační stavy toxinových molekul.

V C-koncové části hydrofóbní domény (aminokyseliny 600-750) a kolem pozice Y940 jsme předpověděli hypotetická cholesterol vazebná místa, takzvané CRAC motivy (Palmer, 2004). Jedná se o oblast, která je poměrně vzdálená od předpokládané transmembránové hydrofóbní domény toxinu. Mutace v tyrosinech Y632, Y658, Y725, Y738 a Y940, které by měly vyvolat zánik cholesterol vazebného místa (záměna Tyr \rightarrow Phe) však nevedla ke změně fenotypu CyaA. Tyto mutantní toxiny také nevykazovaly významné změny v aktivitě v závislosti na externě přidaném cholesterolu. Význam vazebných míst pro cholesterol se tedy nepotvrdil. S využitím dalších mutací se nicméně podařilo prokázat, že tyrosin Y940 hraje zásadní úlohu v inzerci proteinu CyaA do membrány – patrně se účastní hned počátečních fází tohoto procesu (**P11**). Zbytek tyrosinu Y940, je striktně konzervovaný i u dalších příbuzných toxinů, konkrétně RtxA, HlyA a ApxIA, produkovaných bakteriemi *Kingella kingae*, *Escherichia coli* a *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Podařilo se nám nicméně zjistit, že přes konzervovanost Y940 je toto residuum zásadní pro sbalování acylované domény pouze v případě toxinu CyaA a nikoliv ostatních zkoumaných toxinů (**P12**).

Protein CyaA nese, na rozdíl od dalších příbuzných RTX cytolyzinů, zmiňovanou enzymatickou (AC) doménu, jejíž aktivita je patrně to nejdůležitější při působení tohoto toxinu. Tato doména se však musí nejprve dostat do cílové buňky,

aby mohla působit. Mechanismus této takzvané translokace není dosud uspokojivě objasněn. V práci **P13** jsme zkoumali segment CyaA mezi pozicemi 400-500, které jsou patrně spoluzodpovědné za translokaci AC domény. Podařilo se nám prokázat, že tento segment obsahuje sekundární struktury dvou α -helixů, a je schopen inzerce do micel detergentu, případně do umělé membrány. Následně indukuje narušení této membrány tvorbou pórů, alespoň v podmínkách in vitro. Je zjevné, že segment 400-500 je zodpovědný za translokaci AC domény toxinu CyaA do cílových buněk. (**P13**)

Kvůli nepolevující snaze o objasnění funkce jednotlivých částí toxinu CyaA jsou v Mikrobiologickém ústavu, AV ČR, zkoumány další a další úseky tohoto proteinu a vytvářeny mutantní formy, které by svým chováním mohly objasnit, za co je která část toxinu zodpovědná. Zdá se nicméně, že pro skutečné pochopení funkce tohoto proteinu bude nutná znalost trojrozměrné struktury, podobně jako u jiných proteinů. V případě CyaA, je však např. tvorba krystalů velmi obtížná, protože protein samotný má značnou délku, 1706 aminokyselin. Podařilo se nicméně získat model strukturu některých jednotlivých částí CyaA: již dříve AC domény (Guo et al., 2005) nebo nedávno C-koncové RTX domény (**P14**). Tato doména je to první, co prochází ven z produkující buňky během transportu sekrečním systémem typu I (TISS) a to prakticky v denaturované podobě. Nativní RTX doména CyaA má strukturu takzvaného β -rollu (**P14**) a obsahuje určitá místa, která jsou klíčová pro zahájení sbalování do finální terciální struktury (Motlová, 2021).

Toxin CyaA je exprimován jako protoxin; před sekrecí ven z buňky je modifikován mastnou kyselinou na lyzinech K860 a K983 a tímto je aktivován (Basar et al., 2001), podobně jako ostatní příbuzné RTX cytolyziny. Pro tuto modifikaci je nutná acyltransferáza CyaC. V další práci (**P15**) jsme zkoumali, jak jsou acyltransferázy specifické pro konkrétní toxiny: CyaA, dále HlyA (*Escherichia coli*) a RtxA (*Kingella kingae*), a jak různé acylace mění pórotvorné vlastnosti toxinů. Zjistili jsme, že zmíněné tři protoxiny jsou acylovány každou z příslušných acyltransferáz CyaC, HlyC i RtxC (při heterologní expresi ve stejném kměni *E. coli*). Přitom právě acyltransferáza vybírá konkrétní mastnou kyselinu a také určuje, zda budou posttranslačně acylovány oba konzervované lysinových zbytky prototoxinu. Zdá se, že molekuly RTX toxinů jsou funkčně přizpůsobeny konkrétní délce acylových řetězců (C-14 nebo C16) ve druhém, více konzervovaném acylačním místě.

Poslední předkládaná práce, která se týká proteinu CyaA (**P16**), má významný ekologický přesah. V této práci jsme sledovali produkci toxinu CyaA, jako jednoho z virulenčních faktorů bakterie rodu *Bordetella*. Produkce CyaA byla dále srovnávána s množstvím filamentózního hemagglutininu (FHA), pertaktinu (PRN) a proteinu BvgA a to u dvou různých druhů, *B. pertussis* a *B. bronchiseptica*. Podařilo se nám prokázat, že striktně lidský patogen *B. pertussis* není schopen adaptovat svou plazmatickou membránu nižší teplotě a patrně proto nedokáže dlouhodobě přežívat ve vnějším prostředí (tedy mimo hostitele), na rozdíl od druhu *B. bronchiseptica*. Důvodem tohoto zásadního rozdílu mezi oběma bakteriemi je pravděpodobně celá řada mutací, které se v *B. pertussis* nahromadily během koevoluce s lidským hostitelem. Jedním z následků pak je ztráta regulace produkce virulenčních faktorů okolní teplotou, přesněji tekutostí plazmatické membrány (která je jinak sledována systémem BvgAS). U bakterie *Bordetella pertussis* tak dochází k produkci virulenčních faktorů i za snížené teploty. Během přenosu této patogenní bakterie kapénkovou infekcí tak nedochází ke snížení množství virulenčních faktorů, což se zdá být pro úspěšnou kolonizaci nového hostitele zásadní.

3.4 Objasnění působení vybraných bakteriocinů

Další velmi zajímavé téma se týká bakteriocinů. Jedná se o skupinu proteinů, které jsou produkovány bakteriemi a působí na membránách cílových, rovněž bakteriálních buněk. Základní otázky, které si klademe souvisí s hledáním mechanismu, jakým nově objevené bakteriociny zabíjejí citlivé buňky. Výzkumu bakteriocinů se věnujeme ve spolupráci s prof. Davidem Šmajsem a dr. Jurajem Bosákem na Masarykově univerzitě v Brně. V naší laboratoři zkoumáme několik zástupců této skupiny proteinů. V případě kolicinu Z, se nám nepodařilo prokázat fyziologicky relevantní pórtvornou aktivitu. Přesněji řečeno, kolicin Z vyvolává v membráně reprodukovatelné, ale sotva patrné narušení s velmi nízkou vodivostí, které naznačuje, že jde o membránový protein. Toxický efekt kolicinu Z patrně spočívá v degradaci peptidoglykanu napadné buňky (**P17**).

Další z bakteriocinů, které jsme zkoumali je kolicin U, který je produkován bakterií *Shigella boydii*. Kolicin U je příbuzný např. kolicinům A a B. V práci **P18** ukazujeme, že kolicin U vytváří v membráně póry, které jsou silně závislé na pH,

a jsou nejspíš tvořeny monomery proteinu. V případě kolicinu U jsme však pozorovali velmi nízkou kationtovou selektivitu pórů, což tento protein odlišuje od ostatních příbuzných kolicinů. Při využití molekul „neelektrolytů“, které jsou schopny obsazovat vnitřní prostor kanálu, jsme určili vnitřní průměr pórů v rozmezí 0,7 až 1 nm, což jsou rozměry podobné kolicinu Ia. Není zatím zcela jisté, jestli kolicin U vyžaduje pro svou funkci přítomnost iontů K^+ , jak plyne z některých našich výsledků (Dolejšová, 2015). Naše další práce se zaměřila na jeden konkrétní detail v hydrofóbní doméně kolicinu U, totiž helix H1. Jedná se o konec velmi dlouhého α -helixu, který přechází z centrální části kolicinu k C-konci. Z logiky věci by mohl být H1 prvním α -helixem, který se dostává do kontaktu s vnitřní membránou napadené Gram negativní bakterie. Otázku, jaká je úloha tohoto peptidu při inzerci hydrofóbní domény kolicinu do membrány, jsme řešili ve spolupráci s dr. Lukaszem Cwiklikem a Kamilou Riedlovou. Ze simulací molekulové dynamiky vyplývá, že α -helix H1 samovolně setrvává v modelových membránách a je dokonce schopen indukovat tvorbu takzvaného toroidního póru s účastí okolních fosfolipidů. Souvisí to s relativně velkým množstvím polárních reziduí v sekvenci H1. Hlavní závěry simulací byly ověřeny také empiricky (**P19**). Tyto poměrně zajímavé výsledky by mohly změnit pohled na to, jaká je sekvence konkrétních dějů při inzerci hydrofóbní domény pórotvorných kolicinů do membrány.

3.5 Mechanismus účinku nízkomolekulárních membránově aktivních látek

V naší laboratoři se již více let věnujeme výzkumu mechanismů, jakými působí různé nízkomolekulární látky na celistvost plazmatické membrány bakterií, případně na membrány umělé, modelové. Dříve se jednalo o výzkum stresu, který vyvolává přítomnost různých alkoholů na bakterie (Seydlová et al., 2012; Vaňousová et al., 2018). V nedávné době šlo zejména o molekuly cyklických lipopeptidů, jako je surfaktin, produkováný přímo bakterií *Bacillus subtilis* (Pinkas et al., 2020; Seydlová et al., 2013; Uttlová et al., 2016). Ve spolupráci s dr. Pavlem Hrouzkem, z Mikrobiologického ústavu, AV, ČR, jsme zkoumali také aktivitu obdobných lipopeptidů, ale izolovaných ze sinic (Hájek et al., 2021; Hrouzek et al., 2012; Tomek

et al., 2015). Zatímco surfaktin je nejspíš produkován buňkami *Bacillus subtilis* v půdním prostředí za účelem snazší solubilizace živin nebo jako signální molekula, lipopeptidy ze sinic mají povětšinou neznámý biologický význam. Práce s těmito látkami je nicméně velmi inspirující. Většina těchto látek je schopna narušovat plazmatické membrány hub a savčích buněk a to v závislosti na struktuře hydrofóbního řetězce a na stavu buňky. Některé tyto látky mají např. antikancerogenní léčebný potenciál.

V poslední době se naše skupina na Přírodovědecké fakultě zabývá intenzivním výzkumem nově připravovaných zcela syntetických antibiotik, takzvaných lipofosfonoxinů (LPPO). Tomuto tématu se již několik let věnujeme ve spolupráci s doc. Dominikem Rejmanem, z Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd ČR, jehož skupina tyto molekuly vyvíjí a neustále zdokonaluje (Rejman et al., 2011; Suk et al., 2007). Na návrhu prvotních molekul se podílel ještě doc. Libor Krásný z Mikrobiologického ústavu Akademie věd (Rejman et al., 2011). V rámci našeho výzkumu se snažíme například zjistit, které části molekul LPPO je možné cíleně pozměnit, aby se zlepšila selektivita účinku proti bakteriální buňce v porovnání s buňkou savčí.

V publikaci **P20** jsme zjistili, že LPPO první generace vykazují selektivní antimikrobiální aktivitu vůči grampozitivním bakteriím, včetně patogenních kmenů a kmenů rezistentních na jiná antibiotika. LPPO lokalizují do plazmatické membrány bakterií a jsou schopny vytvářejí póry v umělých membránách. V rámci testování fluorescenčního analogu DR5823 se ukázalo, že tato látka proniká do obou monovrstev umělých fosfolipidových membrán liposomů, pokud je k nim přidána zvenku. Při pokusech na savčích buňkách se podařilo též ověřit, že LPPO nejsou genotoxické, nejsou schopny transepiteliálního transportu. Tato antibiotika jsou stabilní při nízkém pH, což je nutné pro jejich případné podání per os. První generace LPPO tedy představovala skupinu sloučenin se značným potenciálem pro vývoj dalších antibakteriálních látek. Úpravou LPPO byla vytvořena druhá generace těchto látek (LPPO II), která byla charakterizována v další práci. Tyto látky vykazují velmi nadějnou aktivitu také proti Gram negativním bakteriím (**P21**). Obě generace LPPO I, II tvoří oligomerní póry a permeabilizují bakteriální membránu citlivých buněk. Aktivita LPPO není ovlivněna hodnotou cílového membránového potenciálu, a proto jsou LPPO aktivní i proti perzistentním buňkám. Necitlivost Gram negativních

bakterií na LPPO I je pravděpodobně způsobena bariérovou funkcí vnější membrány, která obsahuje lipopolysacharidy, jak bylo prokázáno pokusy na liposomech po přidání LPS. Antimikrobiální aktivita LPPO je také ovlivněna fosfolipidovým složením cílové membrány. Vyšší podíl fosfolipidů s neutrálním nábojem, snižuje permeabilizační schopnosti lipofosfonoxinů (**P22**). Výzkum těchto látek v naší laboratoři je v letech 2022-24 podpořen projektem Grantové agentury České republiky: „Strukturní determinanty účinku membránově aktivních antimikrobiálních molekul“.

Navazující vědecká práce **P23** charakterizující antibiotikum daptomycin vznikla vlastně díky dotazům recenzentů, kteří požadovali porovnání účinků LPPO s nějakou dobře charakterizovanou látkou, která by vykazovala podobný mechanismus účinku. Vzhledem k tomu, že ani pro toto klinicky využívané antibiotikum nebyly v literatuře k nalezení detailnější údaje o vlastnostech pórů, které tato látka tvoří v membránách, rozhodli jsme se vlastnosti pórů daptomycinu prozkoumat sami. Objevili jsme relativně širokou škálu vodivostních stavů daptomycinu v membráně. Podařilo se nám predikovat konkrétní nejčastější oligomerní uspořádání jeho molekul. Pro detailnější vysvětlení odkazují čtenáře na práci **P23**.

3.6 Fluorescenční spektroskopie ve výzkumu struktury proteinů

Náš další výzkum se týkal podstatně odlišného tématu, totiž studia konformačních změn proteinů a interakcí, které stabilizují strukturu proteinů (**P24**). Využívali jsme při tom přirozený fluorofor, který se v bílkovinách nachází, konkrétně indolovou skupinu postranního řetězce tryptofanu. Tato aminokyselina vykazuje fluorescenci v UV oblasti spektra (kolem 350 nm) po excitaci při 280-300 nm a využívá se například při sledování konformačních změn nebo denaturace/renaturace proteinů. My jsme zkoumali část proteinu FrpC, který produkuje patogenní bakterie *Neisseria meningitidis*. Fragment proteinu FrpC, takzvaný SPM modul, vykazuje unikátní samoštěpící aktivitu v přítomnosti vápenatých iontů (Osička et al., 2004). Při studiu sekundární struktury SPM se ukázalo, že jeho spektrum cirkulárního dichroismu vykazuje atypické znaky, které bývají přiřazovány takzvanému excitonu (Gasymov et al., 2015). V tomto případě se jedná právě o dva blízké zbytky

tryptofanu, které vykazují π - π interakci. Zkoumali jsme vzdálenost tryptofanových zbytků a jejich vzájemnou orientaci pomocí metod časově rozlišeného dohasínání fluorescence a anizotropie fluorescence se zaměřením na Försterův rezonanční přenos energie (FRET). Podařilo se nám prokázat, že tyto dva tryptofany jsou schopny si předávat energii mechanismem, který bývá označován jako homo-FRET (nebo „Donor–Donor Energy Migration“), jež vede k depolarizaci emitované fluorescence tryptofanu (Kalinin a Johansson, 2004). Při výpočtu vzájemných úhlů a vzdáleností dvou indolových skupin (řekněme Trp₁ a Trp₂) jsme narazili na určitý paradox. Pozorovaná míra depolarizace musí vycházet z kombinované emise obou tryptofanů, tedy např. Trp₁ po přímé excitaci a depolarizované emise Trp₂ po přenosu energie z Trp₁. Efektivita přenosu energie Trp₁→Trp₂ závisí samozřejmě na úhlech mezi těmito molekulami (přesněji na úhlech mezi jejich transičními dipóly). Při kolmém uspořádání by sice systém mohl vykazovat značnou (maximální) míru depolarizace, ale efektivita přenosu energie by vlastně byla velmi malá (až nulová). Zato při paralelním uspořádání sice může docházet k účinnému přenosu energie, ale pozorovaná emise z Trp₂ by měla mít stejnou hodnotu polarizace, jako u Trp₁. Tyto úvahy jsme vzaly v potaz při výpočtech relativní orientace obou zkoumaných indolů.

Kromě toho jsme odvodili vzdálenosti konkrétních indolů k vazebnému místu pro Ca²⁺ a to s použitím jeho fosforescenčního analogu, iontu Tb³⁺. Tento iont zde fungoval jako akceptor ve Försterově rezonančním přenosu energie, kdy donorem byl pokaždé jeden z tryptofanových zbytků mutovaného proteinu SPM.

V této práci jsme využili ke kvantifikaci ustálené intenzity fluorescence rozklad emisních spekter, takzvanou dekonvoluci. Reálně podobné přístupy používáme relativně často, ale výstupy se většinou nedostávají do publikací, případně není nutné je detailně vysvětlovat. Objasnění některých detailů bych se proto chtěl dotknout zde. Princip této metody je jednoduchý a je obdobný rozkladu mikroskopického obrazu na snímky obsahující informaci o intenzitě jediného fluoroforu po matematickém odečtení vlivu ostatních známých fluoroforů. V mikroskopii se tento postup někdy nazývá „spectral unmixing“. V našem případě jsme tedy pracovali s proteinem, který obsahuje ve své sekvenci dva zbytky tryptofanu. Měli jsme k dispozici konstrukty s bodovými mutacemi, kdy byl vždy jeden tryptofan zaměněn za téměř nefluorescenční fenylalanin. Každý ze zkoumaných

tryptofanů vykazoval trochu jiné emisní spektrum kvůli různé polaritě jejich okolí. Při znalosti tvarů těchto jednotlivých spekter jsme ve spektru původního proteinu SPM (s oběma Trp zbytky) dohledávali, jaké kombinace intenzit emise jednotlivých tryptofanů jej uspokojivě vysvětlují. Pomocí této metody jsme zjistili, jak se liší vzdálenosti obou tryptofanů k Ca^{2+} vazebnému místu (připomínám, že ionty Ca^{2+} u SPM indukují samoštěpící aktivitu). Samotný fragment SPM se zdá být velmi užitečným modelem při studiu π - π a kationt- π interakcí.

V navazující práci **P25** jsme zkoumali krátký peptid odvozený ze sekvence SPM, který obsahoval predikované vazebné místo pro Ca^{2+} a jeden zbytek tryptofanu. Vyvinuli jsme speciální postup, kterým je možné prokázat účinný FRET mezi zbytkem tryptofanu a iontem Tb^{3+} . Jedná se o záznam několika excitačních a emisních spekter, jejich porovnání, odečtení a vyhodnocení. Metoda je založená na skutečnosti, že emisní spektrum Tb^{3+} je velmi úzké (přesněji řečeno, skládá se z několika úzkých pásů), s maximem při 545 nm, tedy zcela mimo emisi tryptofanu. Pokud se ve vzorku (proteinu a Tb^{3+}) podaří naměřit excitační spektrum, které odpovídá tvarem tryptofanu (v oblasti kolem 280 nm), ale je provázeno selektivní emisí při 545 (ale nikoliv v těsném okolí, např. při 525 nebo 565 nm), jde o jednoznačný průkaz, že muselo dojít k přenosu energie mezi $\text{Trp} \rightarrow \text{Tb}^{3+}$. Taková informace je užitečná obecně při studiu proteinů a jejich vazebných míst pro biologicky relevantní dvojmocné ionty.

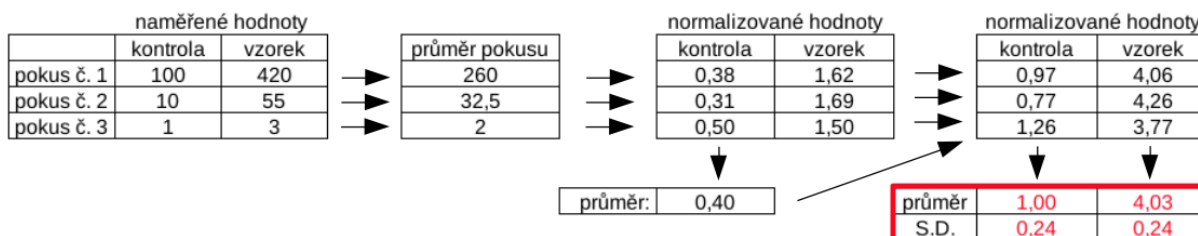
4 Vývoj konkrétních algoritmů a analytických nástrojů

V předchozí kapitole jsem se pokusil shrnout hlavní poznatky z vybraných publikací, na jejichž přípravě jsem se podílel. Čtenáře se zájmem o více detailů z jednotlivých prací musím odkázat do původních manuskriptů, které jsou přílohou této habilitační práce (kap. 6). V následujících odstavcích se naopak pokusím přiblížit některé netradiční postupy, které byly využívány během mé dosavadní vědecké práce. Jsou to postupy, které většinou nejsou v publikacích patřičně popsány. Představuji si, že by mohly ostatní zaujmout. Omlouvám se těm čtenářům, kteří takové postupy sami používají a třeba jim ještě mnohem lépe rozumějí, za případné nepřesnosti a určitá zjednodušení.

4.1 Správná normalizace dat

Hned na úvod bych však začal postupem, který není úplně naším vynálezem, ale chtěl bych na něj čtenáře upozornit. Pravidelně se účastním obhajob diplomových a disertačních prací. Velmi často se setkávám s tím, že studenti prezentují své výsledky formou sloupcových grafů s vyznačenými chybovými úsečkami. Kontrolní vzorek má někdy hodnotu 1, případně 100%. U tohoto vzorku však chybová úsečka chybí. Je to dáno tím, že v každém pokusu byla data na kontrolní vzorek normalizována a proto má tento vzorek vždy stejnou, konstantní hodnotu a nulový rozptyl. Tento postup normalizace je velmi problematický a neumožňuje následně smysluplně porovnávat zkoumané vzorky se vzorkem kontrolním, například s použitím t-testu. Správný postup normalizace zachovává rozptyl hodnot u všech studovaných vzorků, včetně vzorku, na který se normalizuje. Metoda, na kterou studenty pravidelně upozorňuji, je velmi stručně popsána v literatuře (Valcu a Valcu, 2011). Prakticky je potřeba nejprve normalizovat na průměrnou hodnotu všech vzorků, které jsou zkoumány v jednom pokuse, a až napodruhé na průměrnou hodnotu vzorku kontrolního.

Správný postup normalizace dat při třech opakováních pokusu (pro jeden neznámý vzorek a jeden vzorek kontrolní) znázorňuje schéma níže:



4.2 Analýza digitálního obrazu – bakteriální kolonie

Při představování použitých netypických algoritmů bych rád začal s typicky „mikrobiologickým“ tématem. V minulých letech, byly v naší laboratoři prováděny pokusy s bakteriálními kmeny, které se liší v zařazení do ekologických skupin r a K strategů. Jakkoliv je toto pojetí životních strategií u mikroorganismů kontroverzní, jednou z myšlenek bylo zjistit, jak se tyto kmeny vzájemně ovlivňují při růstu na zpevněném médiu (Moserová, 2010). Jako první krok však bylo potřeba zjistit, jestli na sebe nepůsobí i kolonie jednoho kmene, pokud rostou dostatečně blízko u sebe. Již po prvních pokusech bylo zjevné, že některé bakteriální kmeny, pokud jsou jejich buňky vysety velmi hustě na agarovou plotnu, rostou v koloniích jinou rychlostí, než když jsou vysety z velmi vyředěné suspenze, tedy daleko od sebe. Například u druhu *Deinococcus radiodurans* se zdálo, že hustě vyseté buňky vytvářejí menší kolonie, což by se obecně dalo předpokládat např. kvůli limitaci živin. Zato u druhu *Arthrobacter aurescens* se projevoval u hustých výsevů naopak zrychlený růst. Ten mohl být vyvolán například produkcí extracelulárních enzymů, nebo surfaktantů. U jiných bakterií, např. *Rhodococcus erythropolis* se zdá, že se sousední kolonie prakticky neovlivňují (Moserová, 2010). Vysvětlení některých z těchto jevů je možné nalézt v bakalářské práci z naší laboratoře (Dobřemyslová, 2015).

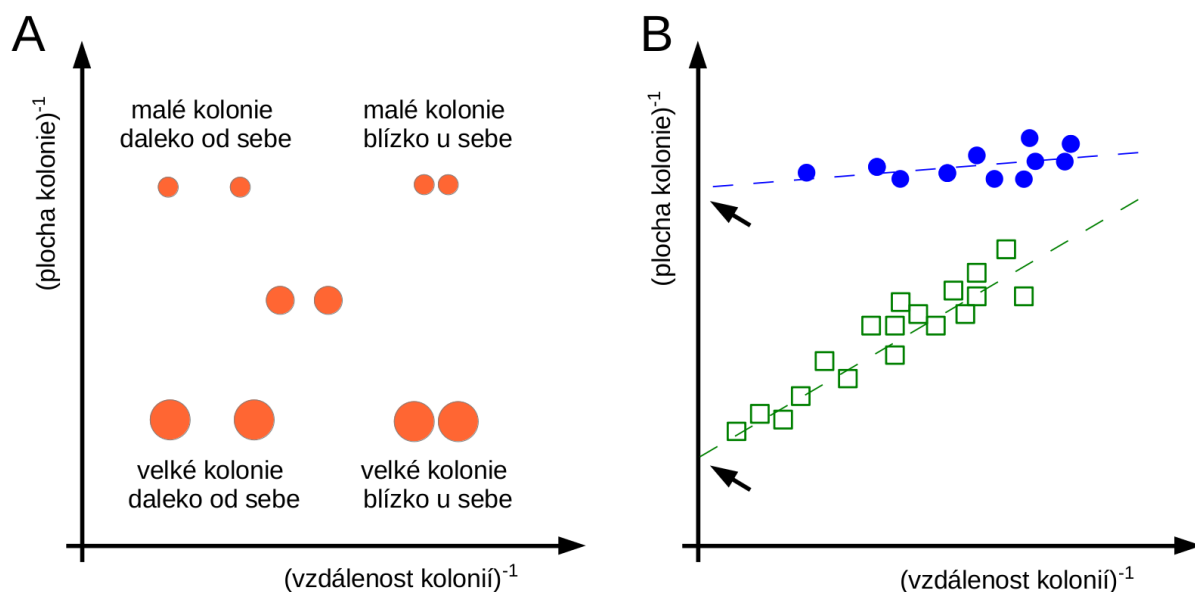
Snažil jsem se vyvinout algoritmus, pomocí kterého by se dalo vzájemné ovlivňování kolonií během růstu na agarové plotně exaktně kvantifikovat. Při použití tohoto přístupu je paradoxně žádoucí, aby byly vysévané buňky rozprostřeny nerovnoměrně, tedy aby mezi narostlými koloniemi byly různé vzdálenosti, které by

bylo možné dále využít v analýze. Samozřejmostí pak byla kvantifikace jednotlivých misek připravených jako replikáty. Postup kvantifikace je následující. Kolonie na povrchu živného média jsou vyfotografovány a digitální obraz je v 8-bitové formě analyzován programem ImageJ¹, kde je využit nástroj „Analyze particles“. Před tímto krokem je vhodné poněkud „zhoršit“ kvalitu obrazu rozostřením, aby detailní kontury kolonií neměly vliv na výslednou vypočítanou cirkularitu (poměr obvodu a průměru nalezené kolonie). Po ručním nebo automatickém nalezení vhodné prahové hodnoty intenzity (tedy rozlišení kolonií od okolí) program nalezne jednotlivé kolonie a uloží seznam jejich tvarových charakteristik (především plochu a cirkularitu) a jejich umístění v prostoru snímku (X,Y souřadnice). Tato uložená tabulka je následně zpracována pomocí skriptu napsaném v jazyce Perl a dále pomocí programu Gnuplot. Pro každou kolonii jsou automaticky nalezeny nejbližší okolní kolonie na misce. Pokud vykazuje kolonie pouze nízkou hodnotu cirkularity, nejčastěji se jedná o dvě kolonie srostlé v jeden objekt. Takovou částici nemá smysl analyzovat jako kolonii „ovlivňovanou“ dalšími koloniemi, je však nadále zahrnuta jako kolonie „ovlivňující“. Toto filtrování provede skript rovněž automaticky. Na každou kolonii má zjevně největší vliv její bezprostřední okolí, naopak velmi vzdálené kolonie se již interakcí nejspíš nebudou účastnit. Proto je pro každou ovlivňovanou kolonii vypočítávána takzvaná „zátěž A“ kolonie jako reciproká vzdálenost k jedné nejbližší ovlivňující kolonii. Kromě toho je pro kontrolu výstupem skriptu také „zátěž B“, která v sobě zahrnuje vliv všech okolních kolonií na misce. Z popsaného postupu je zjevné, že pro některé kolonie není dost údajů, aby mohl být výpočet proveden. Například kolonie těsně u okraje snímku bude využita jako kolonie ovlivňující, ale nemůže být zahrnuta mezi kolonie ovlivňované, neboť není jisté, jestli za okrajem snímku nebyla ukryta další kolonie.

V dalším kroku je do grafu vynášena velikost kolonie jako funkce vzdálenosti k nejbližší sousední kolonii. V případě, že se kolonie nijak neovlivňují, je možné očekávat konstantní hodnoty plochy kolonie pro nejrůznější vzájemné vzdálenosti. Naopak tam, kde kolonie mikroorganismů produkují látky ovlivňující své okolí, můžeme pozorovat zakřivenou závislost. Pro nejjednodušší situaci vzájemného vlivu kolonií je možné použít dvojité reciproké vynesení (Obr. 1), kdy na ose X je reciproká

1 <https://imagej.nih.gov/ij/> nebo <https://imagej.net/software/fiji/>

vzdálenost kolonií ($1/\text{vzdálenost}$) a na ose Y je reciproká plocha každé kolonie ($1/\text{plocha}$). Těmito daty je proložena přímka, jejíž výsek na ose Y naznačuje, jak velká by byla kolonie (v reciproké hodnotě), kdyby byla nekonečně vzdálená od kolonií sousedních. V případě, kdy se kolonie daného druhu nijak neovlivňují, bude proložena přímka vodorovná a výsek na ose Y bude odpovídat průměrné velikosti analyzovaných kolonií.



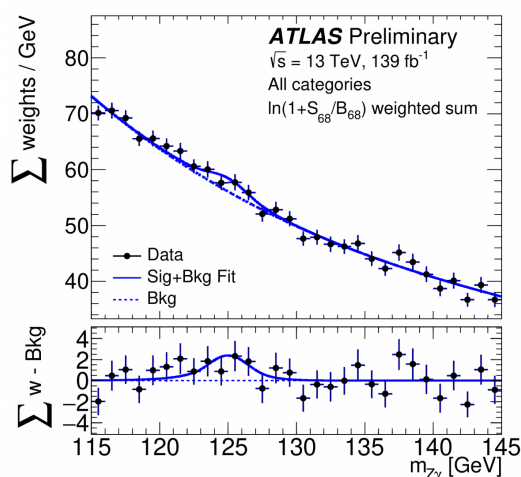
Obr. 1 Metoda výpočtu vzájemného ovlivnění mikrobiálních kolonií (nebo jiných objektů rostoucích na ploše). Dvojitě reciproké vynesení velikosti kolonií a jejich vzájemné vzdálenosti. A) Ukázkové rozložení konkrétních situací v grafu, ilustrace má upozornit pouze na konkrétní oblasti grafu. B) Reálná data – každý bod reprezentuje jednu kolonii, její plochu a vzdálenost k nejbližší další kolonii. Modře: téměř vodorovná přímka proložená daty signalizuje absenci vzájemného ovlivnění kolonií konkrétního druhu. Zeleně: jasná závislost plochy kolonií na jejich relativní vzdálenosti u jiného druhu mikroorganismu. Šipky ukazují na teoretickou plochu kolonie, kdyby rostla nekonečně daleko od ostatních kolonií ($1/\text{vzdálenost} = 0$). Vytvořeno pomocí programu LibreOffice 6.4.7.2.

Popsaný postup umožňuje zjistit, zda se mění velikost mikrobiálních kolonií konkrétního druhu v závislosti na hustotě výsevu na agarovou plotnu. Pokud ano, je možné celkem přesně určit, jak by byly kolonie velké, pokud by byly vysety velmi řídké. Tento algoritmus dosud nebyl publikován ve vědeckém časopise, zato byl již několikrát použit, pokud jsme se snažili stanovit velikost kolonií a přitom odstranit vliv variability jednotlivých výsevů (např. publikace **P26**, **P27**). Postup je po modifikaci použitelný i pro směsné výsevy více druhů mikroorganismů.

4.3 Analýza histogramů

4.3.1 Určení chyby parametrů - „Bootstrap“ analýza

Další odstavce se týkají sledování chyby nasbíraných dat. Omlouvám se předem za určitá zjednodušení v tomto výkladu. Při vyhodnocování experimentů v biologických vědách je často nutné analyzovat střední hodnotu určité sledované veličiny nebo parametru. Tato střední hodnota je dále porovnávána s výsledky jiného, popřípadě kontrolního pokusu. Následuje statistické vyhodnocení a potvrzení nebo vyvrácení hypotéz o rozdílech ve sledovaných hodnotách. Aby bylo možné toto statistické hodnocení provést, je nutné znát chyby sledovaných hodnot. Chybu určitého parametru (např. průměru) často zjistíme mnohokrát opakovaným měřením (a výpočtem rozptylu). V některých pokusech je ale sběr dat natolik časově nebo finančně náročný, že třeba ani nepřipadá v úvahu experiment opakovat. Příkladem mimo biologii může být třeba „hledání“ elementární částice, kdy vědci nejprve rozpoznali v hmotnostním spektru určitý signál (Obr. 2) a oznámili veřejnosti² pravděpodobný objev Higgsova bosonu.



Obr. 2 Ukázka signálu v hmotnostním spektru, který se sice s dalším hromaděním dat zpřesňuje, ale nejedná se o opakování experimentu, jak jsme na něj zvyklí v biologii. Zvýšení amplitudy křivky v okolí hodnoty 125 GeV/c² odpovídá hledané elementární částici. (převzato: ATLAS Collaboration/CERN³) (Aaboud et al., 2017)

2 <https://home.cern/news/press-release/cern/cern-experiments-observe-particle-consistent-long-sought-higgs-boson>

3 <https://atlas.cern/updates/briefing/higgs-photon-z-boson>

V případě této elementární částice trvalo ještě dost dlouhou dobu, než se podařilo nasbírat více než dvojnásobek původních dat a potvrdit její přesnou identitu⁴. Musí tedy existovat postupy, které umožní odhadnout chybu měření z jediného souboru dat, v tomto případě z jednoho hmotnostního spektra.

V našem případě se většinou jedná o mnohem jednodušší výsledky, např. o vodivost membránových kanálů tvořených jednotlivými molekulami při měření na černých lipidových membránách (**P09-P15**). Takové kanály mají zajímavou vlastnost, kterou je určitá variabilita mezi jednotlivými událostmi, která může představovat například různé konformace zúčastněných proteinových molekul. Histogram vodivostí kanálů je pak tvořen prakticky Gaussovou křivkou (pro jednoduchost předpokládejme, že se nejedná o kombinaci více takových křivek). Šířka této distribuce (přesněji polovina šířky v půlce výšky distribuce) pak nereprezentuje chybu v měření, jak tomu zpravidla bývá v jiných pokusech, ale spíše variabilitu vlastností jednotlivých molekul. Tato variabilita je velmi důležitá, má co do činění s dynamikou molekul a počtem jejich různých konformačních stavů. Měli jsme tedy potřebu charakterizovat nejen střední hodnotu vodivosti jednotlivých molekul, ale i „směrodatnou odchylku“ této vodivosti, tedy šířky distribuce.

Důležité je, že odhadnuté chyby parametrů, které běžně poskytují programy pro prokládání křivek, bývají nevěrohodné. Jsou zpravidla velmi podhodnoceny.

Samotný sběr vodivostních dat je časově velmi náročná činnost. Aby bylo možné pozorovat jednotlivé molekuly, musí být aktivní látka přidávaná k membránám v poměrně nízké, někdy až piko-molární, koncentraci. Je totiž žádoucí, aby v membráně nebylo více molekul zároveň. To naopak omezuje možnost sbírání většího množství dat. Typicky dojde během hodiny k záznamu jednotek až stovek různých molekul na několika různých membránách. Z definice je tedy obtížné opakovat měření a hodnotit každé zvlášť. Častěji jsou všechna data nasbíraná během několika dní a využita pro tvorbu jediného histogramu. Problém nastává, pokud je nutné porovnat vodivost kanálů dvou různých látek, typicky toxinů s různými mutacemi v transmembránovém segmentu. Lišit se může vodivost kanálů tohoto dvojího typu, nebo šířka distribuce vodivostních stavů. Obojí se dá zjistit proložením Gaussovy funkce histogramem vodivostí. Je ale nutné zjistit pravděpodobnou chybu stanovení obou parametrů, aby bylo možno posoudit, jestli se oba typy kanálů liší. K tomuto účelu jsme využili takzvané „bootstrap“ analýzy⁵, která je založená

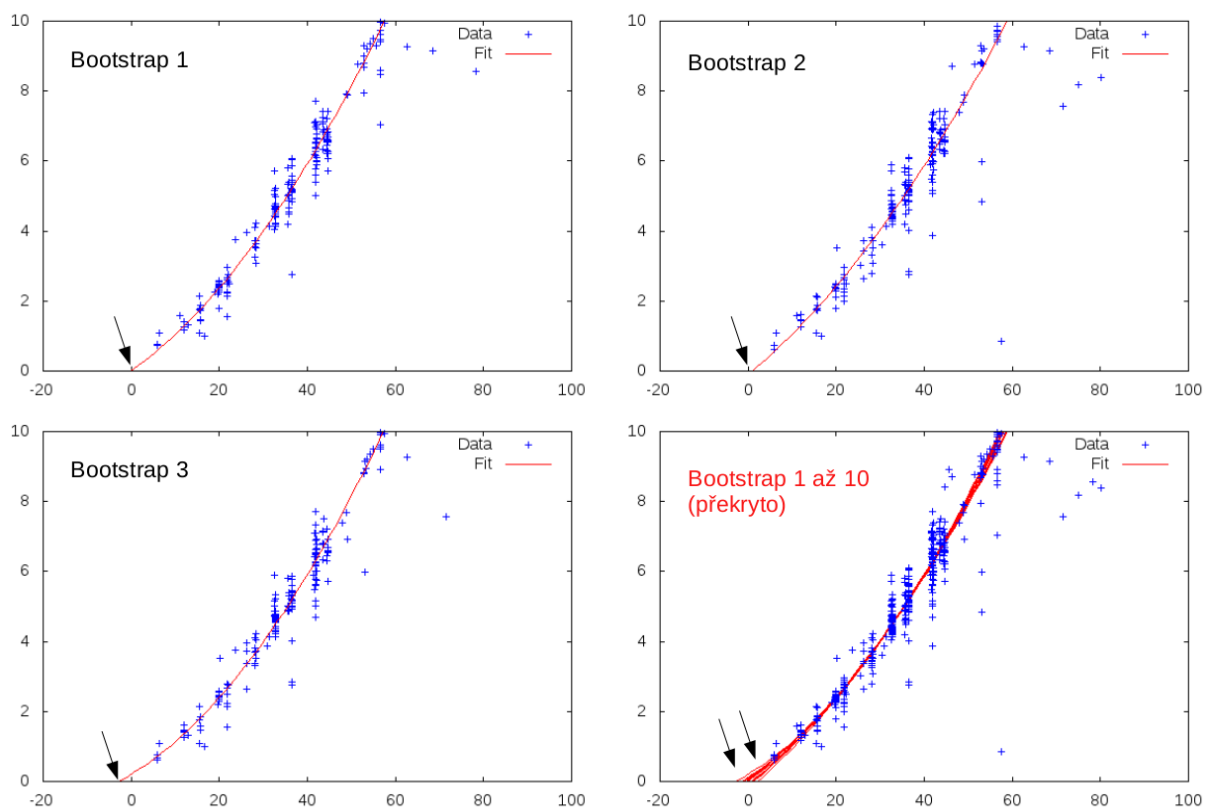
4 <https://home.web.cern.ch/news/news/physics/new-results-indicate-new-particle-higgs-boson>

5 [https://cs.wikipedia.org/wiki/Bootstrapping_\(statistika\)](https://cs.wikipedia.org/wiki/Bootstrapping_(statistika))

na předpokladu, že sbíraná data sice byla do souboru zahrnuta, ale vzhledem ke stochastickému charakteru sběru dat také zaznamenána být nemusela. Během tohoto postupu se dočasně odstraní část dat, vytvoří se nový histogram, který se znovu analyzuje. Takové odstranění se týká např. náhodně vybrané poloviny naměřených dat a celý proces (odstranění dat a analýza pozůstalých) se opakuje mnohokrát, typicky tisíckrát a více. Vznikne tím sada středních hodnot vodivosti, která umožní výpočet průměrné vodivosti kanálu včetně odhadu její směrodatné odchylky. Totéž platí pro stanovení šířky distribuce vodivosti a její chyby. Tento postup byl použit v publikacích **P09-P15**. Za zmínku stojí, že zrovna v případě histogramů a spekter, kdy se do jednotlivých kategorií (binů) zařazují jednotlivá pozorování, je možné použít i jednodušší postup. Vzhledem k tomu, že výška každého sloupce v (nenormalizovaném) histogramu odpovídá počtu částic (událostí) N , směrodatná odchylka tohoto počtu je přibližně \sqrt{N} . Je tedy možné během metody „bootstrap“ jednoduše přidávat ke každé hodnotě binu šum odpovídající právě konkrétní hodnotě \sqrt{N} . Tím se celý proces výrazně urychlí a zjednoduší.

Metoda „bootstrap“ je aplikovatelná na téměř jakýkoliv typ dat, u kterých zpravidla následuje proložení určité modelové křivky. Nemusí se tedy jednat o histogramy a Gaussovu křivku. Na Obr. 3 předkládám ukázkou, kdy jsme zkoumali, při jaké hodnotě data „protínají“ vodorovnou osu (jednalo se o stanovení reverzního potenciálu).

Průsečík s osou byl nalezen proložením dat polynomickou funkcí. Následně byla část bodů promazána a proložení opakováno. Touto metodou je tedy možné zjistit nejen nejpravděpodobnější (prakticky průměrnou) hodnotu průsečíku, ale také jeho chybu. Podstatné je, že tímto způsobem určíme chyby jakýchkoliv zkoumaných parametrů. Pro zjednodušení zde neuvažuji, jaký vliv na analýzu má velikost frakce odstraňovaných bodů v každém kroku analýzy.

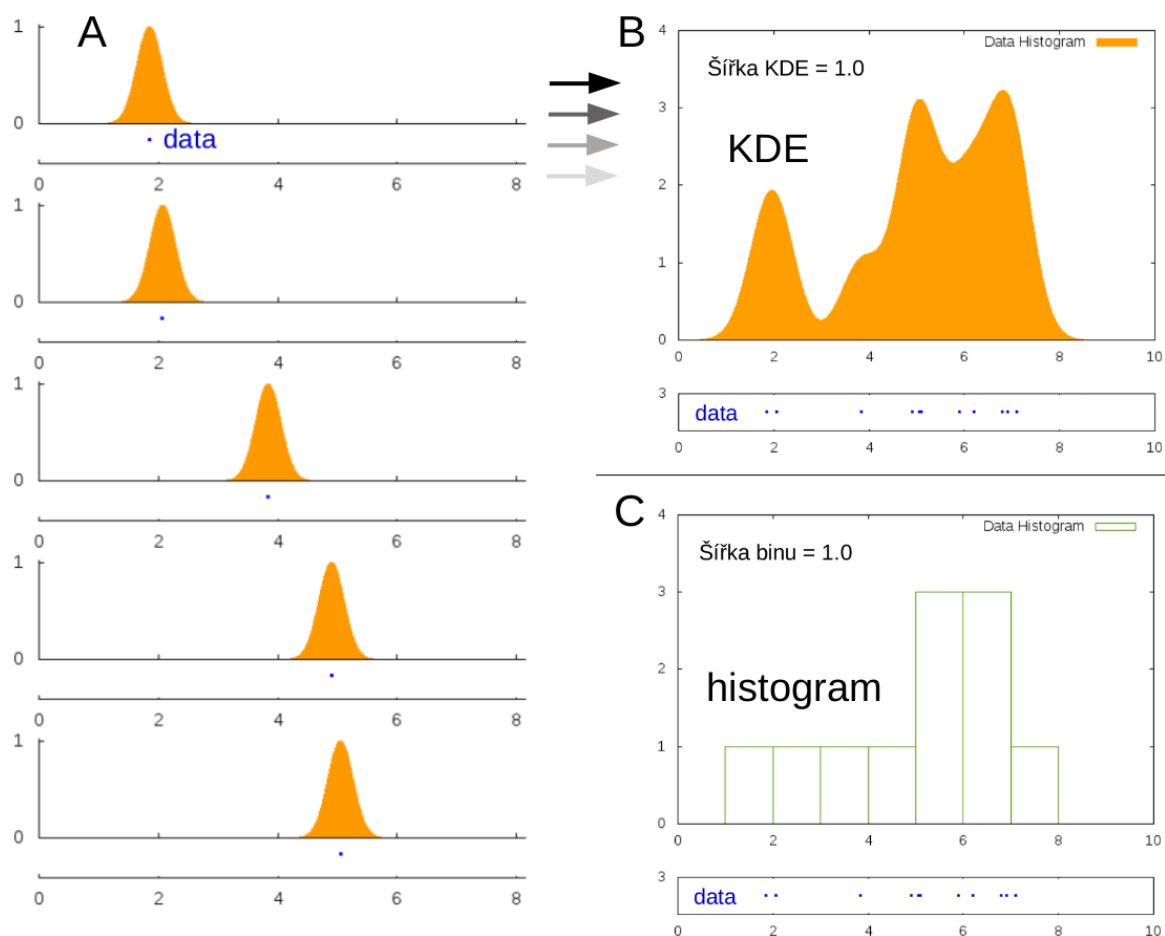


Obr. 3 Ukázka „bootstrap“ analýzy dat. Data (modře) byla opakovaně proložena polynomm (Bootstrap 1-3). Překrytí deseti pokusů (Bootstrap 1 až 10) je ukázáno v pravém dolním rohu. Šipky ukazují na nalezené průsečíky s vodorovnou osou. V této ilustraci nezáleží na konkrétních sledovaných veličinách, proto nejsou osy popsány. Vytvořeno pomocí programů Perl 5.22.1 a Gnuplot 5.0.

4.3.2 Vytváření histogramů a „Kernel Density Estimation“

Vytváření histogramů vodivostí jednotlivých molekul je poměrně specifická záležitost. Jedním z problémů je relativně malé množství dat, která jsou analyzována (viz výše). V této situaci hrozí, že se konkrétní pozorování dostanou na hranu zvolených intervalů histogramu. Tomuto jevu se říká „bin edge effect“. Výsledný histogram je pak značně zatížen zvoleným nastavením; jednak šířkou binů ale i konkrétním posunutím jejich hranic. Kromě vlivu na konkrétní zobrazení to může vést i k rozdílné interpretaci výsledků. Ve snaze obejít tyto nedostatky histogramu jsem vytvářel histogramy opakovaně s různým nastavením a následně jsem je „průměroval“. Brzy mi však došlo, že by bylo jednodušší nahradit každý bod (konkrétní pozorování) funkcí a tyto funkce kombinovat (řekněme sčítat). Vznikla tak myšlenka, kterou jsem v roce 2015 presentoval na konferenci v Itálii, Prato (poster: Simple algorithm for construction of high resolution histograms useful for nanoparticle sizing with α -toxin pores). Až po vytisknutí posteru jsem zjistil, že tento postup již existuje a nazývá se Kernel Density Estimation (KDE) (Scott et al., 1977).

Rozdíly mezi běžným histogramem a KDE jsou patrné z Obr. 4. V případě, kdy je nutné histogramem prokládat další funkce, má KDE výhodu v tom, že obsahuje prakticky neomezené množství bodů (tedy stupňů volnosti) z generovaných funkcí KDE a především přesně zobrazuje lokální maxima pravděpodobnosti výskytu pozorovaného jevu. V případě, kdy zcela kriticky záleží na zachování těchto detailů (**P23**), je přístup KDE patrně nenahraditelný.



Obr. 4 Způsob konstrukce „histogramu“ metodou Kernel Density Estimation (KDE).
 A) Původní pozorované hodnoty jsou zobrazeny jako body (modře). Každý bod je nahrazen Gaussovou funkcí (oranžově). B) Konstrukce KDE kombinací jednotlivých „jednobodových“ funkcí. Původní data jsou zobrazena modře. C) Běžný histogram zobrazující stejná původní pozorování s patrnými problémy na okrajích kategorií. Data v levé části obrázku jsou pro ilustraci, nejsou kompletní. Vodorovné osy značí sledovanou veličinu, čísla na svislé ose ukazují počet událostí v dané kategorii histogramu.
 Vytvořeno pomocí programů Perl 5.22.1 a Gnuplot 5.0.

Jako ukázkou, jak jednoduché je vytvořit tabulku KDE z původních naměřených hodnot, níže ukazují skript, který jsem pro tento účel napsal v jazyce Perl:

```
#!/usr/bin/perl -w
# usage: $0 data_file data_column
$height=1; # event height
$points=1000; # histogram points
$min=0; $max=350; # histogram borders
$step=($max-$min)/$points; # histogram step
$hwhm=.5; # single bin hwhm
$exponent=2; # bin "shape": 2-gaussian, 200-rectangle
$log2=log(2);
$a=$ARGV[0]; # data file
$col=$ARGV[1]; # data column

# prepare empty histogram
$x[0]=0; $i=$min;
while($i<$points+1){
    $sum[$i]=0;
    $x[$i]=$x[$i-1]+$step;
    $i++;
}

open(AA,$a); # analyze the data file
$i=0; $aai=0;
while ($rad=<AA>){
    chomp($rad);
    $rad=~ s/^\s*//;
    @arad=split(/[[ :space:]]+/, $rad);
    $aax[$aai]=$arad[$col];
    $i=0; $sum[$i]=0;
    while($i<$points+1){
        $sum[$i]=$sum[$i]+$height*exp(-$log2*(($x[$i]-$aax[$aai])/$hwhm)**$exponent);
        $i++;
    }
    $aai++;
}
close(AA);

$i=0; # print the histogram
while($i<$points+1){
    printf "%9.4f %9.6f\n", $x[$i], $sum[$i];
    $i++;
}
```

Popsaný postup používáme jako náhradu za běžné histogramy pravidelně. Kromě původního skriptu v jazyce Perl (především pro operační systém Linux) jsme připravili i spustitelný soubor pro operační systém Windows (Albert Sokol, nepublikované výsledky), který je rovněž v laboratoři velmi často využíván. Chtěl bych ještě upozornit, že k určité obdobě KDE se poslední dobou v odborné literatuře přechází. Jedná se o takzvaný „violin plot“⁶, který nahrazuje standardně využívaný „box plot“ s vyznačením percentilů.

6 https://en.wikipedia.org/wiki/Violin_plot

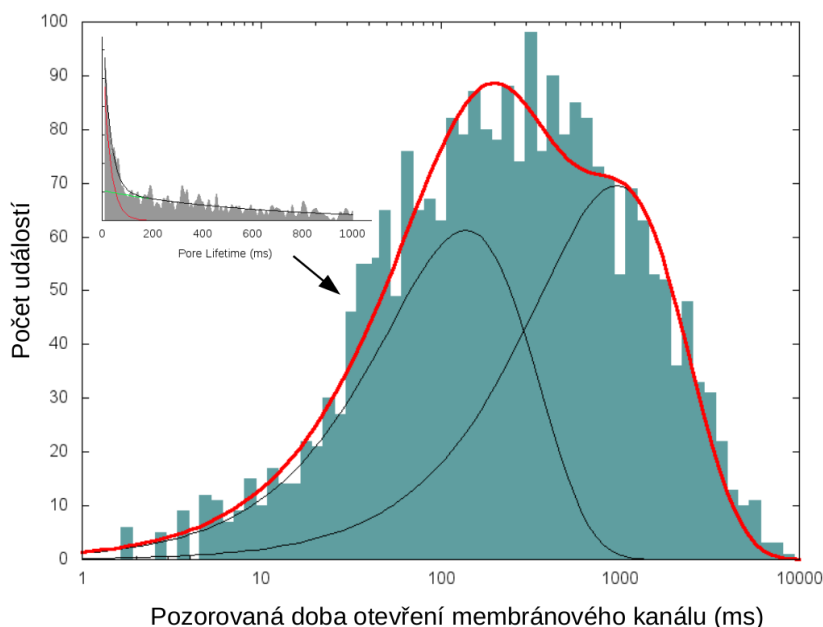
4.3.3 Logaritmický histogram - pro studium široké škály hodnot

Analýza některých veličin může vyžadovat dynamický rozsah i několik řádů. Týká se to sledování dějů zahrnujících spontánní náhodnou přeměnu jedné látky v jinou (jaderné přeměny) nebo např. přechodu molekul z excitovaného stavu do stavu základního (dohasínání intenzity fluorescence). Podobná situace nastává při formování oligomerního proteinového kanálu v biologické membráně a při následném spontánním rozpadu tohoto elektricky vodivého komplexu na nevodivé monomery. Všechny tyto děje mají společné to, že je možné pozorovat jednotlivé procesy na úrovni atomů nebo molekul (uvolňování radioaktivního záření, emise fotonů fluorescence, skokové nárůsty a poklesy elektrického proudu membránových kanálů) a histogramy časů nebo křivky dohasínání, které jsou s těmito ději spojené vykazují exponenciálně klesající charakter. Klesající část histogramu je proto zpravidla exponenciálou proložena a tím je získána časová konstanta daného děje. Hodnotu této časové konstanty je možné určit velmi přesně, ačkoliv jednotlivé původní zaznamenané hodnoty konkrétních časů měly obrovský rozptyl.

Při analýze stability membránových kanálů v naší laboratoři jsem nejprve postupoval podle toho tak, jaké zkušenosti jsem nabyl při pobytu u prof. Rolanda Benze na univerzitě ve Würzburgu. Tam se zaznamenávaly vodivostní stavy molekul na papír pomocí mechanického zapisovače. Doba otevření jednotlivých kanálů se odečítala ručně a vytvářel se běžný histogram těchto časů, který byl následně prokládán exponenciálou. Při zavádění těchto metod jsme pochopitelně hned od začátku digitalizovali signál a ukládali jsme jej do počítače. Další analýza probíhá pomocí programu QuB (Nicolai a Sachs, 2013). Bylo však poměrně těžké zjistit, jaké jsou moderní a běžné metody při analýze elektrického záznamu, pokud jako vzor sloužilo pracoviště se spíše historickými postupy. Naprostým standardem je využití histogramu, který má logaritmickou osu X s pozorovanou veličinou.

V mnoha oborech se využívá poměrně dlouho známá skutečnost, že takto vytvořené histogramy (Sigworth a Sine, 1987), pokud se šířka jejich „binu“ úmyslně mění v závislosti na konkrétní hodnotě sledované veličiny (vynášeno na logaritmické ose X), vykazují maximum (Obr. 5). Pozice tohoto maxima pak sama o sobě naznačuje hodnotu časové konstanty zkoumaného děje. Pravá část grafu klesá jako původní exponenciála, levá část však klesá z jiného důvodu. Čím se posouváme více

do levé části grafu, tím jsou jednotlivé kategorie („biny“) stále užší. Právě z toho důvodu se směrem doleva výrazně snižuje pravděpodobnost zachytu pozorování v konkrétním „binu“. Takto vytvářené histogramy, kdy se každá dekáda rozdělí na několik (zpravidla 16 a více) „binů“, jsou pak velmi snadno prokládány upravenou exponenciální funkcí (Sigworth a Sine, 1987), a to bez rizika, že algoritmus provádějící regresi výpočet nedopatřením nedokončí.



Obr. 5 Logaritmický histogram různé doby otevření membránového kanálu. Histogram byl vytvořen s rozlišením 16 „binů na dekádu“. Černé křivky ukazují dvě rozpoznané exponenciální komponenty, červená křivka představuje jejich součet. Každá z komponent má předem známou šířku křivky. Vložený graf (vlevo nahoře) zachycuje stejná data na lineární škále. Generováno programem QuB, Perl 5.22.1, Gnuplot 5.0.

Další výhodou logaritmického histogramu při studiu rychlostních konstant je skutečnost, že předpokládaná distribuce pozorovaných hodnot (tedy i prokládaná funkce) má konstantní šířku, asi 1,5 řádu⁷. Při prokládání „exponenciální funkce“ tímto grafem je třeba měnit jen dva parametry (střední dobu a amplitudu). Umožní to velmi snadno prokládat více křivek najednou a odhalit tak více paralelních procesů ve zkoumaném systému. U těchto typů histogramů je snadno možné provádět „bootstrap“ analýzu (kap. 4.3.1), **P09-P12**.

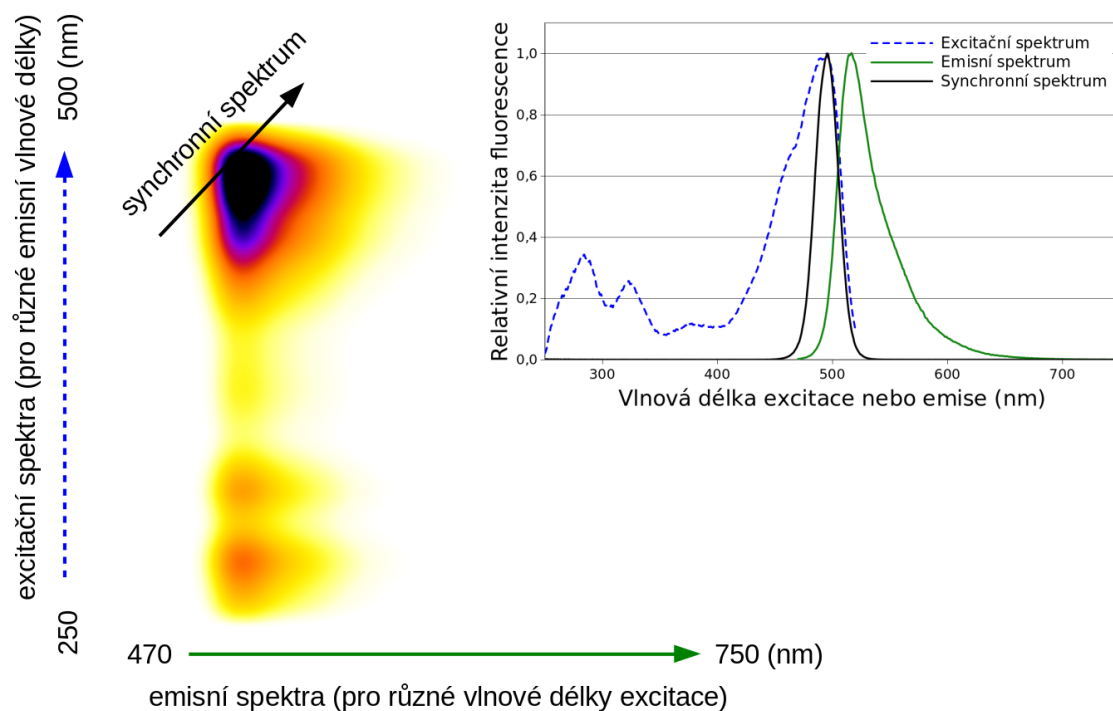
⁷ Zjednodušeně řečeno, při průměrné (nejčastější) době otevření 1 s se se stejnou (poloviční) pravděpodobností objeví kanály otevřené po dobu asi 0,3 s nebo 3 s.

4.4 Synchronní fluorescenční spektra při kvantifikaci intenzity fluorescence

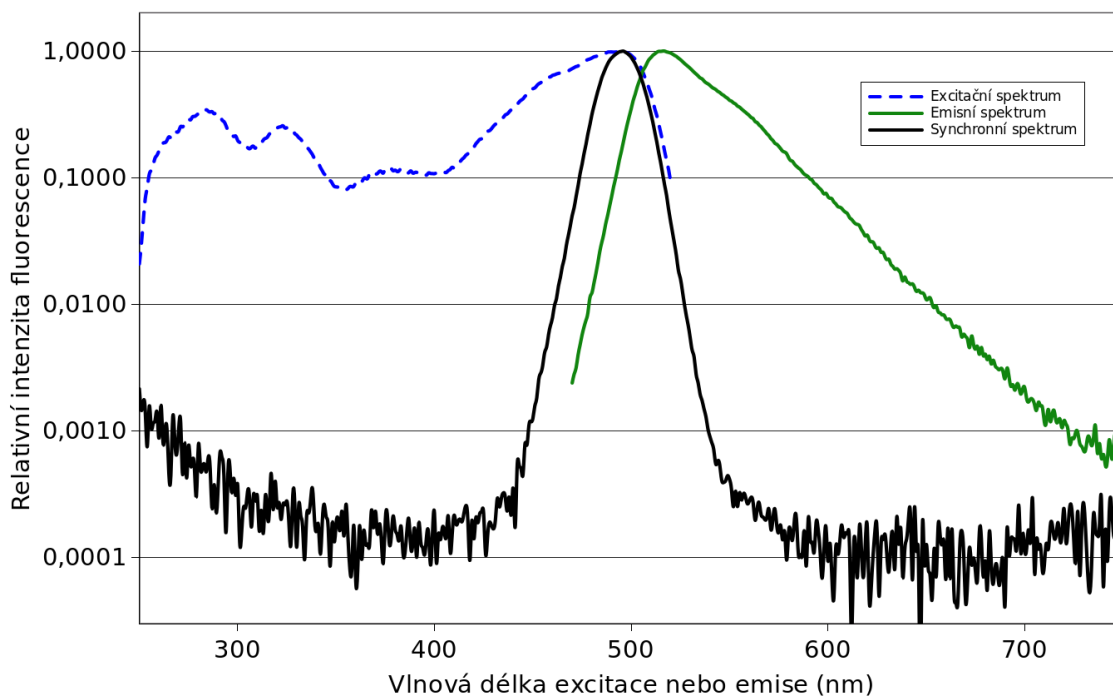
Poměrně často se stává, že za mnou přijdou kolegové, kteří potřebují kvantifikovat intenzitu fluorescence svého vzorku. Nebo i většího množství vzorků, které by měly obsahovat stejný fluorofor, ale pocházejí z různých buněčných linií, jsou různě ošetřeny, atp. Kolegům by stačilo zjistit vždy jediné číslo, např. kolikrát „svítí“ daný vzorek více/méně, než vzorek kontrolní. Jak jsem však naznačil, vzorky mohou mít různé chemické složení a různou úroveň pozadí, někdy nazývaného „autofluorescence“. Charakter pozadí bývá neznámý a nejsou vždy k dispozici odpovídající slepé vzorky (případně jsou jinak nařaděné, než vzorky testované). Není proto možné jednoduše nastavit na fluorometru vhodné vlnové délky excitace a emise a změřit intenzitu fluorescence. Také není možné zkrátka odečíst hodnotu pozadí (pokud jsou vzorky různě řaděné). Mnohem lepší se jeví, naměřit fluorescenční emisní spektrum a zjistit, jaká je intenzita v očekávaném maximum spektra a porovnat ji s oblastí mimo toto maximum (tedy v oblasti převažující autofluorescence). Ještě výhodnější však je, nasnímat takzvané synchronní fluorescenční spektrum. Dále se pokusím vysvětlit, o co se jedná.

Každá fluorescenční látka (pokud je tvořena jedinou chemickou sloučeninou v homogenním prostředí) má určité charakteristické excitační spektrum, tedy soubor vlnových délek, při kterých tato látka absorbuje záření a následně emituje fluorescenci. Takovýto fluorofor má rovněž neměnnou pozici a tvar emisního spektra (když odhlédneme od relaxace rozpouštědla a dalších jevů). Na excitační a emisní spektrum je také možné nahlížet jaksi zároveň, pomocí dvourozměrného (2D) spektra (Obr. 6A). Jde o matici vlnových délek excitace a emise, kterým odpovídá výsledná relativní pravděpodobnost emise fluorescence - je to vlastně opravdová trojrozměrná krajina. Když vybereme konkrétní vlnovou délku excitace, najdeme odpovídající emisní spektrum tak, že toto 2D spektrum „prořízneme“ vodorovnou čarou v odpovídající výšce. Při nahrávání excitačního spektra naopak vybereme jedinou vlnovou délku emise (většinou blízko maxima emisního spektra) a testujeme různé vlnové délky excitace, jak jsou schopny vybudit fluorescenci. Ukázkové 2D spektrum tentokrát „krájíme“ svisle.

A



B



Obr. 6 Znárodnění dvourozměrného a synchronního fluorescenčního spektra fluoresceinu. Detailní komentář je uveden v textu kap. 4.4, str. 40-42.

Synchronní spektrum je technicky možné zaznamenat tak, že se během pokusu v každém kroku současně mění vlnová délka excitace i emise, jen je mezi oběma zachován konstantní rozestup, většinou 15 až 50 nm. Při každé kombinaci obou vlnových délek se zaznamená intenzita fluorescence. Tento postup znázorňuje černá šipka v Obr. 6A, která jde z definice pod úhlem 45°. Jedná se tedy o kombinaci obou spekter, excitačního i emisního, přesněji o jejich konvoluci. Různým nastavením rozestupu je možné „proříznout“ 2D spektrum v různých místech. Na Obr. 6A (inset) je znázorněno, jak by vypadalo běžné excitační spektrum (modře) a emisní spektrum (zeleně). Synchronní spektrum je pak znázorněno černě mezi nimi.

Na tvar synchronního spektra lze také nahlížet poměrně intuitivně. Synchronní spektrum ostře stoupá v levé části kvůli prudkému nárůstu emisního spektra, a dále strmě klesá v pravé části díky rychlému poklesu spektra excitačního (Obr. 6B).

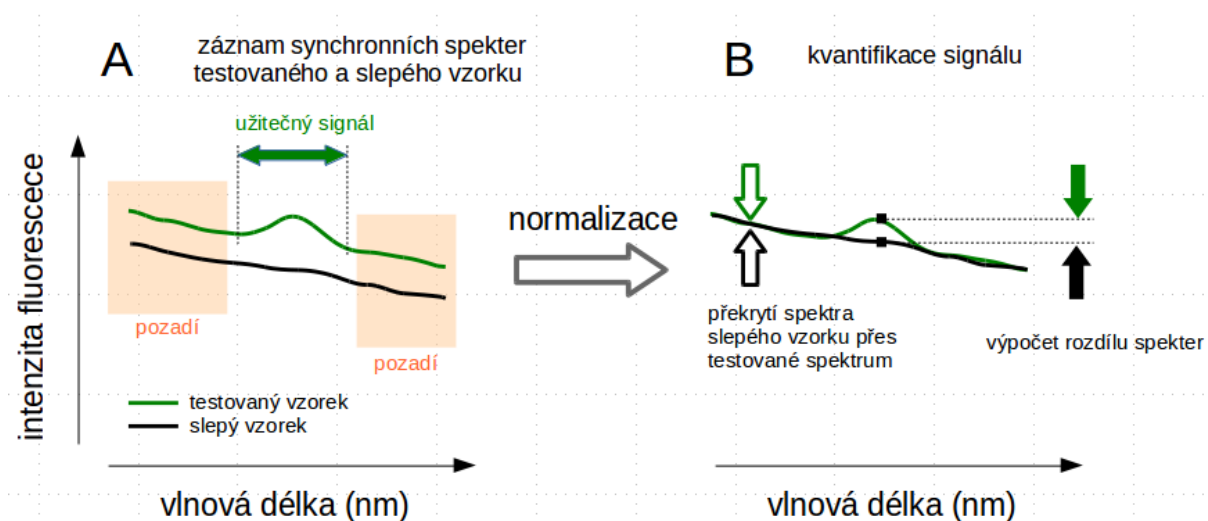
Co se týká samotné citlivosti nebo selektivity synchronních spekter, je nejlepší uvést příklad konkrétních hodnot. Uvažujme excitační (nebo absorpční) spektrum normalizované na maximální hodnotu. V maximu tedy „relativní absorptivita“ dosahuje 100%, pozadí mimo maximum řekněme 10%. Obdobně emisní spektrum dosahuje v maximu 100% relativní intenzity, pozadí řekněme 20%. Výsledné synchronní spektrum tedy vykazuje v maximu užitečný signál na úrovni $1,0 \times 1,0 = 1,0$ (tedy opět 100%). Intenzita pozadí je pak rovněž produktem obou původních spekter: $0,1 \times 0,2 = 0,02$. Hodnota poměru signálu vůči pozadí tedy bude v synchronním spektru 50:1. Jinými slovy, pozadí klesne z 10%, resp. 20% (v excitačním a emisním spektru) na výslednou hodnotu 2% (ve spektru synchronním).

V Obr. 6B jsou zobrazena stejná data, jako v obrázku 6A, jen při logaritmickém vynesení intenzit (odstup synchronního spektra je 20 nm). U těchto reálných spekter fluoresceinu je patrná velmi nízká hodnota pozadí „vlevo“ a „vpravo“ od maxima synchronního spektra na úrovni asi 100 ppm.

U biologických vzorků však bývá pozadí mnohem vyšší, kvůli vysoké autofluorescenci nebo rozptylu excitačního paprsku, například při měření na celých buňkách nebo jejich lyzátech. V synchronním spektru se však vůbec neobjevuje

Ramanův jev, který jinak mnohdy s fluorescencí interferuje. Nebývají zde rovněž patrné významné optické vady monochromátorů (difrakce druhého řádu, apod.).

Další efekt, díky kterému je zde vysoká specificita detekce vybraného fluoroforu, vzniká možností porovnávání užitečné části spektra (při správně nastavené excitaci a správně nastavené emisi) s okolními bazálními částmi spektra (úmyslně nesprávně nastavená excitace i emise). Prakticky je možná kvantifikace pozadí (autofluorescence) přímo v jediném měřeném vzorku, tedy bez použití odpovídajícího vzorku slepého. Hodnotu intenzity pozadí lze přímo odečíst po stranách užitečného spektra (tedy vlevo a vpravo od maxima). Postup kvantifikace intenzity fluoroforu v synchronním spektru je graficky znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7 Schéma korekce, normalizace a kvantifikace synchronního spektra. A) Popis jednotlivých částí spektra. B) Po normalizaci spekter je možné jejich odečtení a kvantifikace užitečného singálu. Popis „vlnová délka“ odpovídá vlnové délce excitace a posunuté vlnové délce emise.

Výsledný postup, který lze doporučit, pokud je k dispozici odpovídající slepý vzorek:

1. záznam synchronního spektra vzorku
2. záznam synchronního spektra pozadí (slepého vzorku, pufru, apod.)
3. normalizace obou spekter na hodnotu pozadí (ve spektru vlevo a vpravo)
4. odečtení nebo překrytí normalizovaných spekter vzorku a pozadí
5. kvantifikace intenzity výsledného spektra vzorku

Pokud není k dispozici slepý vzorek, je možné jej nahradit křivkou proloženou daty měřeného vzorku (proloženou mimo oblast užitečného signálu).

Chtěl bych zdůraznit, že popsaná metoda umožňuje kvantifikovat intenzitu užitečného signálu i v případě, že tvoří jen malou část signálu celkového (tedy užitečného plus pozadí), jako u Obr. 2. Hodnota pozadí může dokonce několikanásobně převyšovat intenzitou spektrum, které chceme zkoumat (tedy nepříznivá situace, které se jinak snažíme vyvarovat). Naprosto zásadní je samozřejmě nahrávání celého spektra včetně pozadí (vlevo a vpravo) oproti pouhému záznamu jedině intenzity např. v maximu emise.

Popsaný postup není až tak zcela objevený. Obdobně se postupuje u dalších spektrálních metod, kdy je šířka spektra zkoumaného vzorku relativně „úzká“, např. v nukleární magnetické rezonanci. Zmíněný přístup také poněkud připomíná využití metody interního standardu (např. v hmotnostní spektrometrii).

Za zmínku samozřejmě stojí fakt, že emisní nebo synchronní fluorescenční spektra jsou vlastně také pouze histogramy, které ukazují zaznamenané počty fotonů při různých vlnových délkách (nebo energiích). Postup s detekcí slabých signálů (které mají zároveň úzké spektrum) se tedy dá aplikovat i ve velmi vzdálených oblastech vědy. Závěr z pohledu biologa: u látek (vzorků), které vykazují třeba slabou intenzitu signálu (např. fluorescence), ale zároveň mají relativně úzké spektrum, bývá v principu možná jejich velmi citlivá detekce. Onoho „úzkého“ spektra je pak možné ve fluorescenci dosáhnout právě nahráváním spektra synchronního. Díky úzkému pásu detekce reálné emise je zde navíc vysoká přesnost určení vlnové délky maxima. To je vhodné pro jednoznačnou identifikaci fluoroforu. Výsledkem je totiž malá náchylnost na chybu pozice maxima obvykle zapříčiněnou „šikmým“ pozadím. U širších emisních spekter toto problém je; zaznamenaná (nekorigovaná) pozice emisního maxima je ovlivněna přítomností dalších látek v roztoku (a tedy jejich emisních spekter, která se překrývají). Synchronní spektrum může být téměř libovolně „široké“, řekněme od UV oblasti až do infračervené části spektra. Velká šíře synchronního spektra umožní např. zároveň zaznamenat fluorescenci tryptofanu (tedy množství proteinů) a zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Metoda je vhodná pro identifikaci a kvantifikace většího množství látek ve směsi.

Ačkoliv jsou výše popsané výhody synchronních spekter známé, v biologickém výzkumu se tento praktický způsob záznamu a kvantifikace intenzity fluorescence téměř nevyužívá.

4.5 Strukturní modely molekul a „Podmíněná pravděpodobnost“

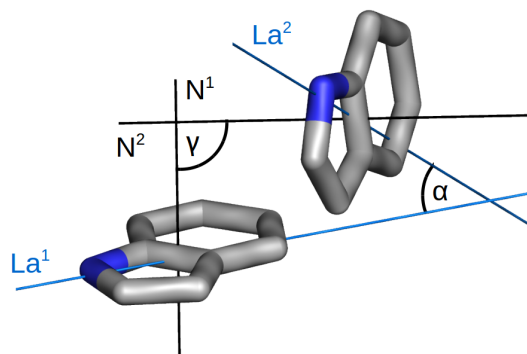
Při zkoumání takzvaných π - π interakcí aromatických aminokyselin v proteinu FrpC jsme experimentálně určovali vzdálenost a orientaci jednotlivých tryptofanových zbytků (**P24**). Narazili jsme při tom na přirozenou otázku: Jsou námi nalezené konkrétní konfigurace indolových skupin v proteinech běžné? Nebo se v proteinu FrpC jedná o výjimečnou situaci? Pokud by se jednalo o relativně častou situaci, naznačovalo by to, že by mohlo jít o interakci, která významně přispívá ke stabilizaci struktury proteinů. Při hledání odpovědi jsme prohledávali kompletní databázi vyřešených proteinových struktur (PDB). Výsledky tohoto pátrání byly rozhodně zajímavé, jsou částečně shrnuty v diplomové práci (Sokol, 2019) a budou publikovány ve vědeckém článku.

Při prohledávání databáze jsme definovali pro každou indolovou skupinu tři kolmé osy: normálu k aromatickému cyklu (N) a dvě další osy (La, Lb) v rovině cyklu (Obr. 8). Osa probíhající atomem dusíku (La) je významná kvůli fluorescenčním vlastnostem indolu a tedy i tryptofanu (Weber, 1960). Dále jsme zkoumali vždy dvojice indolů v konkrétním modelu proteinu. Kromě vzdálenosti indolů jsme určili jejich pozici v prostoru a „úhly natočení“. V tomto kroku jsme vycházeli z publikací, které se touto problematikou zabývaly (ale nerad bych u nich zvyšoval počet citačních ohlasů). Definovali jsme úhel mezi rovinami aromatické skupiny (přesněji úhel mezi normálami rovin N^1 , N^2), řekněme úhel γ . Podobně jsme definovali úhly α (pro osy La^1 , La^2) a β (pro osy Lb^1 , Lb^2), které jsou odvozené od podélných os procházejících indolem. Pro zjednodušené „molekuly“ je schéma jednotlivých orientací a konkrétních úhlů (α , β , γ) znázorněno na Obr. 9.

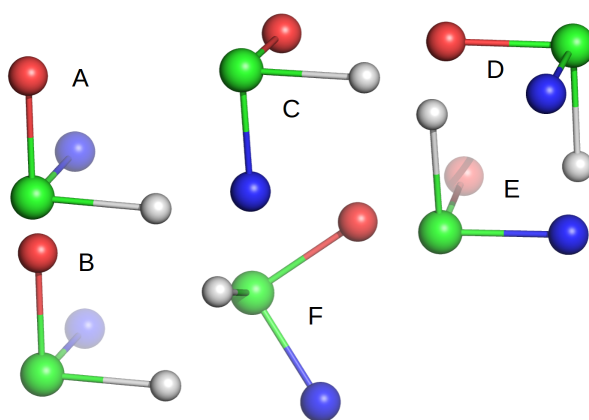
Následně jsme zkoumali všechny dvojice tryptofanů v modelech struktur proteinů, které jsou dostupné v databázi PDB. Narazili jsme na dva zásadní problémy.

První je výskyt obrovského množství částečně homologních proteinů, které ale vykazují podobné uspořádání indolů, které se neustále opakuje. Důvodem však není

„stabilizující interakce“ těchto skupin, ale jednoduše zvýšený zájem vědců o určité molekuly (protilátky, virové antigeny, apod.). Vyvinout spolehlivý algoritmus na eliminaci těchto homologů bylo dosti náročné (Sokol, 2019).



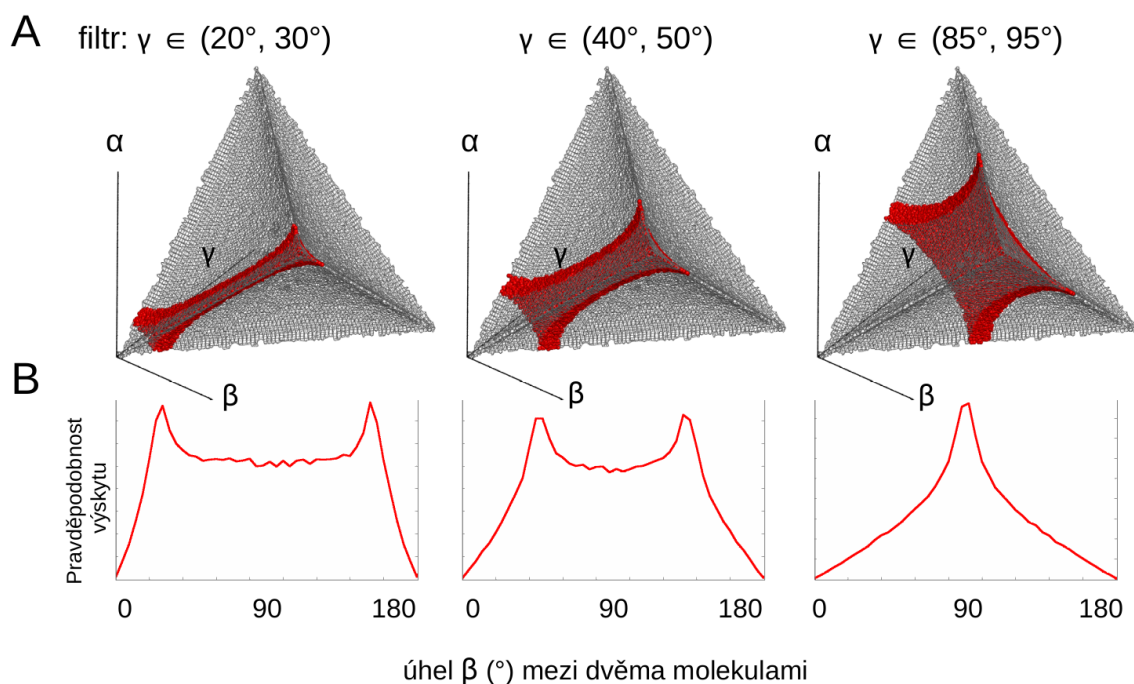
Obr. 8 Definování os a úhlů mezi dvěma indolovými skupinami v tryptofanových residuích. Úhel α odpovídá orientaci transičních dipólů indolových skupin, jeho hodnota je významná pro efektivitu přenosu energie (v procesu FRET). Úhel normál mezi rovinami indolových skupin je zde značen γ . Úhel β zde není zakreslen. Vytvořeno pomocí programu PyMOL 2.3.0.



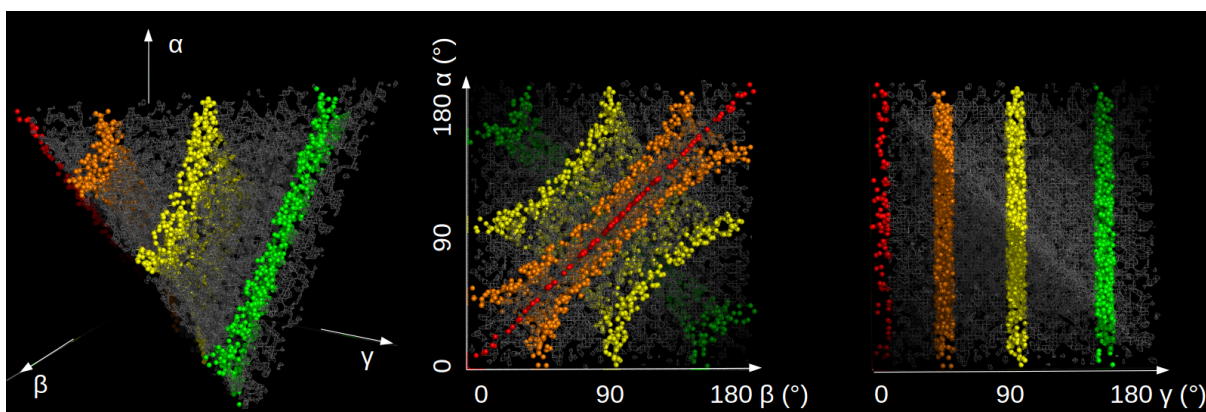
| Molekuly | úhel α (°) | úhel β (°) | úhel γ (°) | Uspořádání |
|----------|-------------------|------------------|-------------------|---------------|
| A-B | 0 | 0 | 0 | Paralelní |
| A-C | 90 | 90 | 0 | Paralelní |
| D-E | 90 | 90 | 180 | Antiparalelní |
| A-E | 90 | 90 | 90 | Kolmé |
| A-F | 106 | 58 | 89 | „Náhodné“ |

Obr. 9 Ukázka vybraných možných vzájemných orientací molekul. Modře jsou znázorněny osy La (jejich vzájemný úhel α), červeně osy Lb (jejich úhel β), šedě osy N (jejich úhel γ , který také určuje „Uspořádání“). Vytvořeno pomocí programu PyMOL 2.3.0.

Druhý problém v analýze byl, když jsme si položili otázku: jaký je nejčastější úhel mezi rovinami (normálami) dvou indolových skupin? Zjistili jsme, že je to docela přesně 90° . Tato hodnota však vůbec nezáležela na vzdálenosti mezi těmito indoly. Nebo přesněji, čím dál byly indoly od sebe, tím častější byl jejich výskyt v kolmém uspořádání a nemělo to nic společného s jejich reálnou interakcí. Rozpoznali jsme tak, že významná část literatury, která se zabývá π - π interakcemi aromatických skupin (a jejich kolmým uspořádáním) pomocí statistických přístupů, je bezcenná. Častý výskyt kolmého uspořádání je zapříčiněn vlastnostmi použité soustavy souřadnic a podmíněnou pravděpodobností, jak se podařilo prokázat u simulovaných dat, u kterých byla orientace molekul zcela náhodná. Použití konkrétních filtrů vedlo ke zcela předvídatelným nálezům (Obr. 10-11).



Obr. 10 Znárodnění povolených kombinací úhlů mezi molekulami. Značení úhlů α , β , γ odpovídá Obr. 8-9. A) Každý ze vzájemných úhlů může nabývat hodnot v rozsahu 0 - 180° (vyznačeno šedou sítí). Ne všechny kombinace vzájemných úhlů jsou však dovolené (šedý prostor není krychlového tvaru). Výběrem různých přípustných hodnot úhlu γ (viz popis nahoře) jsou tímto automaticky vybrány povolené kombinace úhlů α , β (červeně). B) Pravděpodobnost výskytu úhlu β při výběru rozsahu úhlu γ (jako v A). Poznámka: úmyslný výběr určitého uspořádání dle úhlu γ vede nezvratně ke zvýšené pravděpodobnosti výskytu stejné hodnoty u úhlu β i α . Data byla simulována pomocí programu Perl 5.22.1, vizualizace PyMOL 2.3.0.



Obr. 11 **Znázornění vybraných kombinací úhlů mezi molekulami.** Značení úhlů α , β , γ odpovídá Obr. 8-10. Jednotlivá uspořádání dvojic molekul byla vybrána na základě hodnoty úhlu γ . Paralelně uspořádané molekuly (červeně, $\gamma \sim 0^\circ$) vynucují vždy shodný úhel $\alpha = \beta$. Kolmo uspořádané molekuly (žlutě, $\gamma \sim 90^\circ$) umožní největší volnost v úhlech α , β . Antiparalelně uspořádané molekuly (zeleně, $\gamma \sim 180^\circ$) vynutí hodnoty zbývajících úhlů $\alpha = 180 - \beta$. Vytvořeno pomocí programů Perl 5.22.1, PyMOL 2.3.0.

Z popsaných analýz simulovaných dat plynou některé zcela banální závěry, které je ale potřeba znát dříve, než se člověk pustí do analýzy vzájemných prostorových orientací molekul (nebo jiných struktur). Pro dvě neinteragující (např. velmi vzdálené) planární molekuly se dá například předem říci:

- 1) Pokud leží molekuly prakticky v jedné rovině (planparalelní uspořádání, $\gamma = 0^\circ$, Obr. 9 molekuly A-B, A-C), mohou vykazovat jakékoliv hodnoty úhlů mezi zbylými osami (L_a , L_b). Nicméně, hodnota úhlu α bude vždy dokonale korelovat s úhlem β . Hodnoty úhlů budou pevně svázané vztahem: $\alpha = \beta$. Dobře to ukazují červené body v Obr 11 (uprostřed). Toto pozorování je samozřejmě zcela triviální.
- 2) Pokud jsou dvě molekuly vůči sobě kolmé ($\gamma = 90^\circ$, Obr. 9 A-D, A-E, A-F, Obr. 11 žluté body), mohou hodnoty úhlů mezi zbylými osami (L_a , L_b) nabývat téměř jakýchkoliv hodnot. Úhly α a β však nemohou současně nabývat hodnoty 0° nebo 180° . Vztah mezi jednotlivými dovolenými úhly je zde složitější.
- 3) Při antiparalelním uspořádání dvou molekul ($\gamma = 180^\circ$, Obr. 9 D-E, Obr. 11 zelené body, pouze přibližně), budou hodnoty zbývajících úhlů „antikorelovat“: $\alpha = 180 - \beta$.

4) Při náhodném (libovolném) uspořádání molekul budou hodnoty jakýchkoliv úhlů mezi molekulami (α , β , γ) velmi pravděpodobně blízké hodnotě 90° . Naopak hodnoty úhlů blízké 0° budou zcela výjimečné (částečně patrné v Obr. 10).

Je patrné, že čím striktnější filtr při výběru struktur použijeme, tím výraznější jsou pozorované artefakty (histogramy vykazují ostřejší kontury). Lze tedy doporučit, data na prostorovou orientaci před analýzou nijak nefiltrovat.

Shrnuto, náhodná prostorová orientace molekul (nebo třeba residuí aminokyselin a jiných částic) může pro pozorovatele vykazovat výrazné rysy, které nijak nesouvisejí s fyzickou interakcí těchto molekul, ale pouze s vlastnostmi prostoru, který je pro popis systému využíván. Tento jev je dán „podmíněnou pravděpodobností“⁸, kterou je potřeba při podobných analýzách vždy uvažovat. Prakticky lze doporučit, kromě výzkumu dostupných databází struktur, vždy provádět kontrolní simulace (generování náhodných datasetů). Vlastní pozorování je pak nutné se simulací porovnávat, případně simulovaná data od reálných odečítat (nebo na ně jinak normalizovat). Při posuzování náhodnosti či spíše „nenáhodnosti“ uspořádání molekul v prostoru jsme patrně z běžného života zvyklí na objekty, které jsou vyrovnané alespoň ve dvojrozměrném prostoru; boty na podlaze, stádo krav na pastvině, auta na parkovišti. Málo kdo si dokáže představit, jaké jsou povolené prostorové orientace pro dva objekty, které jsou vůči sobě odkloněné třeba o 40° .

Za zmínku stojí, že pro popis vzájemného uspořádání makromolekul v prostoru se nejlépe hodí Eulerovy úhly⁹, které se běžně využívají např. v letectví a nepochybně je znají strukturní biologové, specialisté na NMR, apod. Nicméně snadná dostupnost strukturních dat často vede k analýzám lidmi, kteří nemají dostatečné teoretické zázemí. Podobně tomu zpočátku bylo i v našem případě.

V této kapitole jsem se pokusil ukázat vybrané, trochu netradiční, postupy, které využívám při své vědecké práci. Doufám, že poslouží jako inspirace pro ostatní.

8 <https://cs.wikipedia.org/wiki/Pravd%C4%9Bpodobnost>

9 https://en.wikipedia.org/wiki/Euler_angles

5 Seznam literatury

- Aaboud, M., Aad, G., Abbott, B., Abidinov, O., Abeloos, B., Abidi, S.H., AbouZeid, O.S., Abraham, N.L., et al., 2017. Searches for the Z γ decay mode of the Higgs boson a for new high-mass resonances in pp collisions at $\sqrt{s}=13$ TeV with the ATLAS detector. *J. High Energ. Phys.* 2017, 112.
[https://doi.org/10.1007/JHEP10\(2017\)112](https://doi.org/10.1007/JHEP10(2017)112)
- Basar, T., Havlíček, V., Bezousková, S., Hackett, M., Sebo, P., 2001. Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. Substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J Biol Chem* 276, 348–354.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006463200>
- Benz, R., 2016. Channel formation by RTX-toxins of pathogenic bacteria: Basis of their biological activity. *Biochim Biophys Acta* 1858, 526–537.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.025>
- Benz, R., Maier, E., Bauer, S., Ludwig, A., 2014. The deletion of several amino acid stretches of *Escherichia coli* alpha-hemolysin (HlyA) suggests that the channel-forming domain contains beta-strands. *PLoS One* 9, e112248.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112248>
- Benz, R., Maier, E., Ladant, D., Ullmann, A., Sebo, P., 1994. Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels a comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269, 27231–27239.
- Chenal, A., Ladant, D., 2018. Bioengineering of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Antigen-Delivery a Immunotherapy. *Toxins (Basel)* 10, E302.
<https://doi.org/10.3390/toxins10070302>
- Dadaglio, G., Fayolle, C., Zhang, X., Ryffel, B., Oberkampf, M., Felix, T., Hervas-Stubbs, S., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., Leclerc, C., 2014. Antigen targeting to CD11b+ dendritic cells in association with TLR4/TRIF signaling promotes strong CD8+ T cell responses. *J Immunol* 193, 1787–1798.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302974>
- Dobřemyslová, M., 2015. Vzájemné ovlivnění růstu dvou blízkých bakteriálních kolonií - vliv signálních molekul a živin. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Dolejšová, T., 2015. Topologie a funkce transmembránové domény kolicinu U, bakterie *Shigella boydii*. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Gordon, V.M., Gray, L.S., Hewlett, E.L., 1991. Hemolytic activity of adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *FEBS Lett* 278, 79–83. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80088-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80088-k)
- Fayolle, C., Osickova, A., Osicka, R., Henry, T., Rojas, M.J., Saron, M.F., Sebo, P., Leclerc, C., 2001. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective antiviral immunity. *J Virol* 75, 7330–7338. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7330-7338.2001>
- Gasymov, O.K., Abduragimov, A.R., Glasgow, B.J., 2015. Double tryptophan exciton probe to gauge proximal side chains in proteins: augmentation at low temperature. *J Phys Chem B* 119, 3962–3968.
<https://doi.org/10.1021/jp512864s>

- Glaser, P., Ladant, D., Sezer, O., Pichot, F., Ullmann, A., Danchin, A., 1988a. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning a expression in Escherichia coli. Mol Microbiol 2, 19–30.
- Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A., 1988b. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. EMBO J 7, 3997–4004. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03288.x>
- Guo, Q., Shen, Y., Lee, Y.-S., Gibbs, C.S., Mrksich, M., Tang, W.-J., 2005. Structural basis for the interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin with calmodulin. EMBO J 24, 3190–3201. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600800>
- Hájek, J., Bieringer, S., Voráčková, K., Macho, M., Saurav, K., Delawská, K., Divoká, P., Fišer, R., Mikušová, G., Cheel, J., Fewer, D.P., Vu, D.L., Paichlová, J., Riepl, H., Hrouzek, P., 2021. Semi-synthetic puwainaphycin/minutesamide cyclic lipopeptides with improved antifungal activity a limited cytotoxicity. RSC Adv 11, 30873–30886. <https://doi.org/10.1039/d1ra04882a>
- Hrouzek, P., Kuzma, M., Černý, J., Novák, P., Fišer, R., Simek, P., Lukešová, A., Kopecký, J., 2012. The cyanobacterial cyclic lipopeptides puwainaphycins F/G are inducing necrosis via cell membrane permeabilization a subsequent unusual actin relocation. Chem Res Toxicol 25, 1203–1211. <https://doi.org/10.1021/tx300044t>
- Kalinin, S., Johansson, L.B.A., 2004. Utility a considerations of donor-donor energy migration as a fluorescence method for exploring protein structure-function. J Fluoresc 14, 681–691. <https://doi.org/10.1023/b:jofl.0000047218.51768.59>
- Knapp, O., Maier, E., Masín, J., Sebo, P., Benz, R., 2008. Pore formation by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin in lipid bilayer membranes: role of voltage a pH. Biochim Biophys Acta 1778, 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.026>
- Krtková, J., Havelková, L., Křepelová, A., Fišer, R., Vosolsobě, S., Novotná, Z., Martinec, J., Schwarzerová, K., 2012. Loss of membrane fluidity a endocytosis inhibition are involved in rapid aluminum-induced root growth cessation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol Biochem 60, 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.07.030>
- Ladant, D., 2021. Bioengineering of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Vaccine Development a Other Biotechnological Purposes. Toxins (Basel) 13, 83. <https://doi.org/10.3390/toxins13020083>
- Ladant, D., Ullmann, A., 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. Trends Microbiol 7, 172–176. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01468-7](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01468-7)
- Ladokhin, A.S., Wimley, W.C., Hristova, K., White, S.H., 1997. Mechanism of leakage of contents of membrane vesicles determined by fluorescence quenching. Methods Enzymol 278, 474–486. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)78025-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)78025-x)
- Ladokhin, A.S., Wimley, W.C., White, S.H., 1995. Leakage of membrane vesicle contents: determination of mechanism using fluorescence quenching. Biophys J 69, 1964–1971. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80066-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80066-4)
- Mascarell, L., Fayolle, C., Bauche, C., Ladant, D., Leclerc, C., 2005. Induction of neutralizing antibodies a Th1-polarized a CD4-independent CD8+ T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein

- by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *J Virol* 79, 9872–9884. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9872-9884.2005>
- Mašín, J., Konopásek, I., Svobodová, J., Šebo, P., 2004. Different structural requirements for adenylate cyclase toxin interactions with erythrocyte a liposome membranes. *Biochim Biophys Acta* 1660, 144–154.
- Matoušková, J., Janda, M., Fišer, R., Sašek, V., Kocourková, D., Burketová, L., Dušková, J., Martinec, J., Valentová, O., 2014. Changes in actin dynamics are involved in salicylic acid signaling pathway. *Plant Sci* 223, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.03.002>
- Menestrina, G., 1988. *Escherichia coli* hemolysin permeabilizes small unilamellar vesicles loaded with calcein by a single-hit mechanism. *FEBS Lett* 232, 217–220. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80420-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80420-4)
- Moserová, A., 2010. Fyziologické rozdíly r a K strategií u bakterií. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Motlová, L., 2021. Konformace adenylátcyklázového toxinu *Bordetella pertussis*. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Nicolai, C., Sachs, F., 2013. Solving ion channel kinetics with the QuB software. <https://doi.org/10.1142/S1793048013300053>
- Osička, R., Procházková, K., Sulc, M., Linhartová, I., Havlíček, V., Sebo, P., 2004. A novel “clip-and-link” activity of repeat in toxin (RTX) proteins from gram-negative pathogens. Covalent protein cross-linking by an Asp-Lys isopeptide bond upon calcium-dependent processing at an Asp-Pro bond. *J Biol Chem* 279, 24944–24956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314013200>
- Osičková, A., Osička, R., Maier, E., Benz, R., Šebo, P., 1999. An amphipathic alpha-helix including glutamates 509 a 516 is crucial for membrane translocation of adenylate cyclase toxin a modulates formation a cation selectivity of its membrane channels. *J Biol Chem* 274, 37644–37650.
- Palmer, M., 2004. Cholesterol a the activity of bacterial toxins. *FEMS Microbiol Lett* 238, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.059>
- Pinkas, D., Fišer, R., Kozlík, P., Dolejšová, T., Hryzáková, K., Konopásek, I., Mikušová, G., 2020. *Bacillus subtilis* cardiolipin protects its own membrane against surfactin-induced permeabilization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862, 183405. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183405>
- Rejman, D., Rabatinová, A., Pombinho, A.R., Kovačková, S., Pohl, R., Zborníková, E., Kolář, M., Bogdanová, K., Nyč, O., Sanderová, H., Látal, T., Bartůněk, P., Krásný, L., 2011. Lipophosphonoxins: new modular molecular structures with significant antibacterial properties. *J Med Chem* 54, 7884–7898. <https://doi.org/10.1021/jm2009343>
- Schwarz, G., Arbuzova, A., 1995. Pore kinetics reflected in the dequenching of a lipid vesicle entrapped fluorescent dye. *Biochim Biophys Acta* 1239, 51–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00134-o](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00134-o)
- Scott, D.W., Tapia, R.A., Thompson, J.R., 1977. Kernel density estimation revisited. *Nonlinear Analysis: Theory, Methods & Applications* 1, 339–372. [https://doi.org/10.1016/S0362-546X\(97\)90003-1](https://doi.org/10.1016/S0362-546X(97)90003-1)
- Šebo, P., Osička, R., Mašín, J., 2014. Adenylate cyclase toxin-hemolysin relevance for pertussis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 13, 1215–1227. <https://doi.org/10.1586/14760584.2014.944900>

- Seydlová, G., Fišer, R., Cabala, R., Kozlík, P., Svobodová, J., Pátek, M., 2013. Surfactin production enhances the level of cardiolipin in the cytoplasmic membrane of *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 1828, 2370–2378. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.032>
- Seydlová, G., Halada, P., Fišer, R., Toman, O., Ulrych, A., Svobodová, J., 2012. DnaK a GroEL chaperones are recruited to the *Bacillus subtilis* membrane after short-term ethanol stress. *J Appl Microbiol* 112, 765–774. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05238.x>
- Sigworth, F.J., Sine, S.M., 1987. Data transformations for improved display a fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys J* 52, 1047–1054. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(87\)83298-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(87)83298-8)
- Sokol, A., 2019. Nekovalentní interakce tryptofanu ve struktuře proteinu. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Stockbridge, R.B., 2021. The application of Poisson distribution statistics in ion channel reconstitution to determine oligomeric architecture. *Methods Enzymol* 652, 321–340. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.02.018>
- Suk, D.-H., Rejman, D., Dykstra, C.C., Pohl, R., Pankiewicz, K.W., Patterson, S.E., 2007. Phosphonoxins: rational design a discovery of a potent nucleotide anti-Giardia agent. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 2811–2816. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.02.063>
- Tomek, P., Hrouzek, P., Kuzma, M., Sýkora, J., Fišer, R., Černý, J., Novák, P., Bártová, S., Simek, P., Hof, M., Kavan, D., Kopecký, J., 2015. Cytotoxic Lipopeptide Muscotoxin A, Isolated from Soil Cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*, Permeabilizes Phospholipid Membranes by Reducing Their Fluidity. *Chem Res Toxicol* 28, 216–224. <https://doi.org/10.1021/tx500382b>
- Uribe, K.B., Etxebarria, A., Martín, C., Ostolaza, H., 2013. Calpain-Mediated Processing of Adenylate Cyclase Toxin Generates a Cytosolic Soluble Catalytically Active N-Terminal Domain. *PLoS One* 8, e67648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067648>
- Uttlová, P., Pinkas, D., Bechyňková, O., Fišer, R., Svobodová, J., Seydlová, G., 2016. *Bacillus subtilis* alters the proportion of major membrane phospholipids in response to surfactin exposure. *Biochim Biophys Acta* 1858, 2965–2971. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.006>
- Valcu, M., Valcu, C.-M., 2011. Data transformation practices in biomedical sciences. *Nat Methods* 8, 104–105. <https://doi.org/10.1038/nmeth0211-104>
- Vaňousová, K., Beranová, J., Fišer, R., Jemiola-Rzemińska, M., Matyska Lišková, P., Cybulski, L., Strzałka, K., Konopásek, I., 2018. Membrane fluidization by alcohols inhibits DesK-DesR signalling in *Bacillus subtilis*. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 718–727. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.12.015>
- Weber, G., 1960. Fluorescence-polarization spectrum a electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan a related compounds. *Biochem J* 75, 335–345. <https://doi.org/10.1042/bj0750335>
- Xu, F., Chen, X., Shi, A., Yang, B., Wang, J., Li, Y., Guo, X., Blackall, P.J., Yang, H., 2006. Characterization a immunogenicity of an apxIA mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol* 118, 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.013>

6 Přílohy - publikace obsažené v habilitační práci