

Abstrakt

Uropatogenní bakterie *Escherichia coli* jsou primární příčinou infekcí močového traktu. Jedním z faktorů virulence těchto bakterií je α -hemolysin (HlyA), který patří mezi cytolytické RTX (Repeats in ToXin) toxiny sekretované některými gramnegativními patogenními bakteriemi. RTX toxiny sdílí několik charakteristických strukturních a funkčních domén a segmentů: (1) N-koncovou hydrofobní doménu tvořící membránové póry, (2) acylovaný segment, v němž jsou dva lysinové zbytky modifikovány řetězci mastných kyselin, (3) repetitivní (RTX) doménu vázající vápenaté ionty a (4) C-koncový sekreční signál, který je rozpoznáván sekrečním systémem typu 1. HlyA je syntetizován jako neaktivní protoxin (proHlyA), k jehož aktivaci dochází kovalentní acylací ϵ -aminoskupiny dvou konzervovaných lysinových zbytků, K564 a K690, pomocí koexprimované acyltransferasy HlyC. Jako donor acylového řetězce slouží acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP). Molekulární mechanismus, kterým acyltransferasa HlyC interaguje s acyl-ACP a proHlyA je prozatím jen málo prozkoumán.

Cílem předkládané bakalářské práce bylo nalézt aminokyselinové zbytky účastnící se interakce mezi proteiny HlyC a ACP. Na základě *in silico* interakčního modelu HlyC s ACP byly v HlyC predikovány kladně nabitě zbytky a v ACP negativně nabitě zbytky, které by se mohly účastnit elektrostatické interakce mezi oběma proteiny díky tvorbě následujících interakčních párů: R49–E61, K105–D57, R108–E48, R120–D36 a K129–D39. Nejdříve byly připraveny mutantní varianty HlyC, resp. ACP se zavedenými bodovými substitucemi predikovaných interagujících zbytků. Následně byl pomocí bakteriálního dvouhybridního systému testován vliv mutantních variant HlyC na interakci s ACP. Byly nalezeny zbytky R108 a R120 v proteinu HlyC jako nezbytné pro interakci s ACP. Zbylé testované substituce v acyltransferase (R49A, K105A a K129A) interakci výrazně neovlivnily. Testováním vlivu mutantních variant ACP na interakci s HlyC byly nalezeny zbytky E48 a D36 v ACP jako nezbytné pro interakci s HlyC. Substituce D57A a D39A v ACP snížily interakci s HlyC přibližně na polovinu a substituce E41A výrazně neovlivnila interakci s HlyC. Tyto výsledky ukazují, že pro interakci HlyC s ACP jsou zcela zásadní dva interakční páry, R108–E48 a R120–D36.

Klíčová slova:

α -hemolysin HlyA, acyltransferasa, posttranslační modifikace, acyl carrier protein, bakteriální dvouhybridní systém