

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



Lucia Nemčková

**Studium proteinových interakcí podílejících se na acylaci  $\alpha$ -hemolyzinu bakterie  
*Escherichia coli***

Investigation of the protein interactions involved in the acylation of *Escherichia coli*  
 $\alpha$ -hemolysin

Bakalářská práce

Školitelka: Ing. Adriana Osičková, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 23. 05. 2024

Lucia Nemčková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych především ráda poděkovala své školitelce Ing. Adrianě Osičkové, Ph.D., za odbornou pomoc, vedení, cenné rady a informace, které mi poskytla během realizace a psaní předkládané práce. Její důvěra, ochota a organizovanost byly pro mě inspirací. Mé upřímné poděkování patří také Ing. Radimovi Osičkovi, Ph.D., za jeho neocenitelné rady při sepisování práce, odborné vedení v průběhu realizace projektu a také za jeho vstřícnost při konzultacích.

Současně bych chtěla poděkovat laborantce Soně Kozubové, Bc. Michaelae Lichvárové a MSc. Kevinovi Navarette, za jejich zaučení a pomoc při realizaci praktické části této práce. Děkuji také kolektivu Laboratoře molekulární biologie bakteriálních patogenů MBÚ, AV ČR za příjemné a inspirativní pracovní prostředí.

Na závěr ještě jedno obrovské poděkování patří Haně Hraškové, Zdeňkovi Kříčkovi a mé rodině za jejich neocenitelnou podporu během celého mého studia.

## Abstrakt

Uropatogenní bakterie *Escherichia coli* jsou primární příčinou infekcí močového traktu. Jedním z faktorů virulence těchto bakterií je  $\alpha$ -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  $\epsilon$ -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:

$\alpha$ -hemolysin HlyA, acyltransferasa, posttranslační modifikace, acyl carrier protein, bakteriální dvouhybridní systém

## Abstract

Uropathogenic bacteria *Escherichia coli* are the primary cause of urinary tract infections. One of the virulence factors of these bacteria is  $\alpha$ -hemolysin (HlyA), a protein belonging to the cytolytic RTX (Repeats in ToXin) toxins secreted by some gram-negative pathogenic bacteria. RTX toxins share several characteristic structural and functional domains and segments: (1) an N-terminal hydrophobic pore-forming domain, (2) an acylated segment where two lysine residues are modified by fatty acid chains, (3) a repetitive (RTX) domain binding calcium ions, and (4) a C-terminal secretion signal recognized by the type 1 secretion system. HlyA is synthesized as an inactive protoxin (proHlyA), which is activated by covalent acylation of the  $\epsilon$ -amino groups of two conserved lysine residues, K564 and K690, by the co-expressed acyltransferase HlyC. Acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) serves as the acyl chain donor. However, the molecular mechanism by which the acyltransferase HlyC interacts with acyl-ACP and proHlyA is currently poorly understood.

The aim of this bachelor thesis was to identify amino acid residues involved in the interaction between HlyC and ACP proteins. Based on an *in silico* interaction model of HlyC and ACP, positively charged residues in HlyC and negatively charged residues in ACP were predicted to participate in the electrostatic interactions between the two proteins due to the formation on the following interaction pairs: R49–E61, K105–D57, R108–E48, R120–D36, and K129–D39. First mutant variants of HlyC and ACP, respectively, were prepared with introduced point substitutions of the predicted interacting residues. Subsequently, the effect of mutant HlyC variants on the interaction with ACP was tested using a bacterial two-hybrid system. The residues R108 and R120 in the HlyC structure were found to be essential for the interaction with ACP. The remaining tested substitutions of acyltransferase R49A, K105A, and K129A did not significantly affect the interaction. By testing the influence of mutant variants of ACP on the interaction with HlyC, residues E48 and D36 in ACP were found to be essential for the interaction with HlyC. The substitutions D57A and D39A in ACP reduced the interaction with HlyC by approximately half, and the substitution E41A did not significantly affect the interaction with HlyC. These results indicate that two interaction pairs, R108–E48 and R120–D36, are crucial for the interaction of HlyC with ACP.

## Key words

$\alpha$ -hemolysin HlyA, acyltransferase, posttranslational modification, acyl carrier protein, bacterial two-hybrid system

# Obsah

Seznam zkratk a symbolů .....	9
1 Teoretický úvod .....	11
1.1 Bakterie <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.1.1 Uropatogenní <i>E. coli</i> a infekce močového traktu .....	12
1.1.2 Faktory virulence uropatogenních <i>E. coli</i> .....	12
1.1.3 $\alpha$ -hemolysin HlyA .....	14
1.1.3.1 Geny nezbytné pro produkci, aktivaci a sekreci HlyA .....	14
1.1.3.2 N-koncová část s hydrofobní doménou tvořící póry .....	16
1.1.3.3 Acylovaný segment a jeho modifikace .....	17
1.1.3.4 Repetitivní (RTX) doména .....	19
1.1.3.5 C-koncový sekreční signál a sekreční systém typu 1 .....	20
1.2 Bakteriální adenylátcyklasový dvouhybridní systém .....	22
1.2.1 Princip dvouhybridního systému .....	23
1.2.2 Testování proteinových interakcí pomocí dvouhybridního systému .....	24
1.2.3 MacConkey agar .....	26
1.2.4 Měření aktivity $\beta$ -galaktosidasy .....	27
2 Cíle práce .....	29
3 Přístroje a materiály .....	30
3.1 Přístroje .....	30
3.2 Materiály .....	31
3.2.1 Použité chemikálie .....	31
3.2.2 Použité primery .....	32
3.2.3 Použité plasmidy .....	33
3.2.4 Použité enzymy .....	34
3.2.4.1 Restrikční endonukleasy .....	34
3.2.5 Použité bakteriální kmeny .....	35

3.2.6	Použité soupravy .....	35
3.2.7	Použité roztoky .....	35
3.2.7.1	Roztoky pro měření aktivity $\beta$ -galaktosidasy .....	36
3.2.8	Použitá kultivační a indikační média .....	36
4	Metody .....	37
4.1	Techniky přípravy plasmidové DNA .....	37
4.1.1	Ředění primerů .....	37
4.1.2	Polymerasová řetězová reakce .....	37
4.1.3	Elektroforéza v agarosovém gelu .....	38
4.1.4	Izolace PCR fragmentů z gelu .....	38
4.1.5	Štěpení a defosforylace plasmidů .....	39
4.1.6	Štěpení DNA fragmentů .....	39
4.1.7	Ligace štěpených DNA fragmentů a plasmidové DNA .....	40
4.1.8	Transformace plasmidové DNA do kmene <i>E. coli</i> XL1-Blue .....	40
4.1.9	Minipreparace plasmidové DNA .....	41
4.1.10	Ověření plasmidové DNA .....	41
4.1.10.1	Štěpení pomocí restričních endonukleas .....	41
4.1.10.2	Sekvence .....	42
4.2	Cílená mutageneze .....	42
4.2.1	Kombinovaná PCR mutageneze .....	42
4.2.2	Vložení PCR fragmentů s mutacemi do původních plasmidů .....	43
4.3	BACTH systém .....	44
4.3.1	Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů .....	44
4.3.1.1	Geny kódující HlyC a fragment HlyA .....	44
4.3.1.2	Mutantní varianty genu kódujícího acyltransferasu HlyC .....	46
4.3.2	Kotransformace plasmidů do kmene <i>E. coli</i> BTH101 .....	47
4.3.3	Stanovení enzymové aktivity $\beta$ -galaktosidasy .....	47

5	Výsledky .....	49
5.1	Analýza interakcí HlyC s ACP .....	49
5.1.1	Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů .....	49
5.1.2	Testování interakcí fúzních proteinů .....	51
5.2	Příprava mutantních variant HlyC .....	54
5.3	Analýza interakcí mutovaných variant HlyC s ACP .....	57
5.3.1	Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů .....	57
5.3.2	Kvalitativní analýza interakcí .....	58
5.3.3	Kvantitativní analýza interakcí .....	59
5.4	Analýza interakcí HlyC s mutantními variantami ACP.....	60
5.5	Analýza interakcí HlyC s HlyA <sub>535-719</sub> .....	62
6	Diskuze .....	65
7	Závěr .....	70



## Seznam zkratk a symbolů

ABC	ATP-vázající kazeta, z angl. ATP-binding cassette
AC	adenylátcyklasa
Amp	ampicilin
ATP	adenosintrifosfát, z angl. adenosine triphosphate
BACTH	bakteriální adenylátcyklasový dvouhybridní (systém), z angl. bacterial adenylate cyclase two hybrid (system)
bp	pár bází, z angl. base pair
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát, z angl. cyclic adenosinmonophosphate
CAP	katabolický aktivační protein, z angl. catabolite activator protein
CyaA	adenylátcyklasový toxin
Da	Dalton, hmotnostní jednotka
DNA	deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát, z angl. deoxynucleotide triphosphate
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová, z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
HlyA	$\alpha$ -hemolyzin
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid, z angl. isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside
Kan	kanamycin
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolysacharid
MCS	vícenásobné klonovací místo, z angl. multiple cloning site
MFP	membránový fúzní protein, z angl. membrane fusion protein
OD	optická denzita, z angl. optical density
OMP	protein vnější membrány, z angl. outer membrane protein
ONPG	ortho-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid, z angl. ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside

PCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. polymerase chain reaction
RTX	repetice v toxinu, z angl. Repeats in ToXin
SDS	dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate
T1SS	sekreční systém typu 1, z angl. type 1 secretion system
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPEC	uropatogenní <i>Escherichia coli</i> , z angl. uropathogenic <i>E. coli</i>
wt	divoký typ, z angl. wild type

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Bakterie *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní nesporeující bakterie, kterou objevil a popsal německý pediatr Theodor Escherich v roce 1885<sup>1,2</sup>. Izoloval ji z výkalů kojenců a pojmenoval ji *Bacterium coli commune*<sup>1</sup>. Označení „commune“ v názvu se vztahovalo na běžný výskyt tohoto organismu jak u kojenců, tak i u dospělých. Později byla bakterie pojmenována *Escherichia coli* podle svého objevitele.<sup>3</sup>

Buňka *E. coli* má tyčinkovitý tvar s délkou kolem 2–3  $\mu\text{m}$  a průměrem 0,5–0,8  $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>. *E. coli* může žít na široké škále substrátů a používá smíšenou kyselou fermentaci v anaerobních podmínkách, přičemž produkuje laktát, sukcinát, ethanol, acetát a oxid uhličitý<sup>5</sup>. Optimální růst je při 37 °C, ale některé laboratorní kmeny dokáží růst i při teplotách až 49 °C<sup>6</sup>. *E. coli* je tedy možné pěstovat na běžných i selektivních médiích, ale v klinické praxi se nejčastěji kultivuje na selektivním MacConkey agaru s laktosou, kterou je schopna fermentovat<sup>7</sup>.

Bakterie *E. coli* běžně tvoří střevní mikroflóru teplokrevných živočichů a podílí se na trávení a syntéze určitých vitamínů, především vitaminu K<sup>2,8</sup>. Je to převládající anaerobní organismus v gastrointestinálním traktu, přestože ji aerobní bakterie počtem převyšují. Bakterie *E. coli* je jednou z prvních bakteriálních druhů, které kolonizují střevo kojenců po narození. Po dvou letech se jejich hustota osídlení stabilizuje, dokud se v pokročilém věku nezačne snižovat. Počáteční kmeny mohou pocházet z fekální mikroflóry matky, popřípadě od personálu v porodnicích.<sup>2</sup> Tyto komenzální kmeny zřídka způsobují onemocnění. Některé klony ovšem získaly specifické faktory virulence, které jim umožňují adaptovat se na nová místa v těle hostitele a tím vyvolat široké spektrum nemocí.<sup>9</sup>

Dle faktorů virulence můžeme kmeny *E. coli* dělit na komenzální a patogenní, zodpovědné za střevní a mimostřevní onemocnění. Skupina mimostřevních patogenů zahrnuje uropatogenní *E. coli* (UPEC, z angl. uropathogenic *E. coli*), *E. coli* spojenou s neonatální meningitidou, sepsí a ptačí patogenní *E. coli*.<sup>8</sup>

### 1.1.1 Uropatogenní *E. coli* a infekce močového traktu

Infekce močového traktu jsou nejčastěji se vyskytující bakteriální infekce u lidí, většinou jsou získány v nemocnici.<sup>10,11</sup> Nejčastější příčinou jejich vzniku jsou uropatogenní kmeny *E. coli* (UPEC). Kromě nich mohou občasné vyvolat infekce močového traktu i bakterie *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus bovis* a kvasinka *Candida albicans*.<sup>12</sup>

Vznik infekce močových cest nastává, když uropatogeny osídlující střevo kolonizují močovou trubici a následně močový měchýř působením specifických adhezínů. Pokud se bakterie dokážou vyhnout imunitnímu systému, začnou se množit a produkovat toxiny a enzymy podporující jejich přežití. Vytváří se bakteriální biofilmy s tvorbou intracelulárních komunit močového měchýře, které hrají důležitou roli, neboť jsou zodpovědné za přetrvávání a opakované vracení se infekcí. V této formě jsou bakterie schopny obejít vrozené imunitní odpovědi hostitele.<sup>11,13</sup>

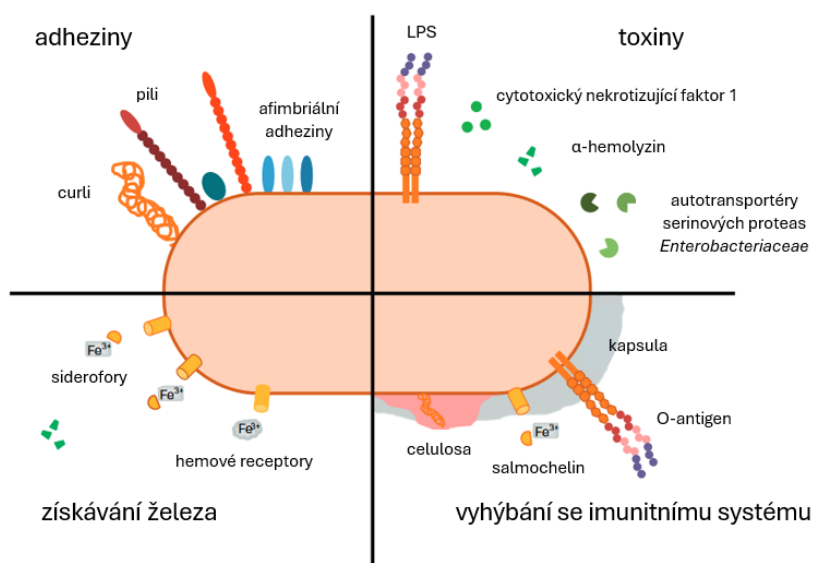
Díky různým faktorům virulence se mohou patogenní bakterie dostat z dolních močových cest do ledvin a způsobit tam akutní pyelonefritidu. Pokud patogen překročí epiteliální bariéru ledvin a dostane se do krevního oběhu, infekce může přerůst až do bakteriémie<sup>9,11</sup>.

### 1.1.2 Faktory virulence uropatogenních *E. coli*

Virulence je kvantitativní vyjádření patogenity určitého kmene bakterií. Faktory virulence jsou buněčné struktury, molekuly a regulační systémy, které umožňují bakteriálním patogenům například kolonizovat hostitele, obejít jeho imunitní systém, získávat od hostitele výživu, ale i způsobit jeho poškození. Jsou nezbytné pro přežití bakterií a přispívají ke vzniku onemocnění.<sup>14</sup> Jednotlivé faktory virulence UPEC jsou znázorněny na obrázku (Obr. 1, str. 13).

Hlavními faktory virulence UPEC jsou adheziny (fimbriální i afimbriální), které bakteriím umožňují přilnout k buňkám hostitele a zabezpečují tak kolonizaci. Jedná se zejména o fimbrie typu 1 a P fimbrie. Hlavními receptory pro vazbu UPEC jsou glykoproteiny uroplakiny exprimované buňkami povrchu močového měchýře a močovodů. Tyto receptory obsahují D-manosu a jsou tak rozpoznávány fimbriemi typu 1. P fimbrie se váží na glykolipidové struktury hostitelských buněk a jsou nezbytné pro úspěšnou kolonizaci ledvin.<sup>9,13</sup> Mezi další typy adhezínů patří i curli ze třídy

amyloidů, které jsou spolu s celulosou hlavními složkami biofilmu chránícího bakterie před nepříznivými podmínkami prostředí<sup>13</sup>.



Obr. 1: **Faktory virulence uropatogenních kmenů *E. coli*.** Bakterie využívají různé adheziny, toxiny a strategie, díky nimž dokážou infikovat močové cesty, obejít imunitní systém hostitele a přežít v něm. Obrázek byl převzat a upraven<sup>13</sup>.

Získávání železa je kritickým požadavkem pro přežití UPEC v prostředí močových cest, kde je železa nedostatek. Železo se v organismu vyskytuje vázané na různé hemoproteiny, zejména jako součást hemu, a není pro bakterie volně dostupné.<sup>13</sup> Bakterie si pro jeho vychytávání vyvinuly specializované molekuly, siderofory, které chelatují železité kationty<sup>15</sup>. Na vnější membráně mají bakterie i hemové receptory, které vážou hem po lýze erytrocytů<sup>13</sup>.

UPEC také produkují toxiny narušující integritu hostitelských buněk, což umožňuje šíření bakterií do hlubších vrstev tkáně, kde mají přístup k dalším živinám. Složkou buněčné stěny je endotoxin – lipopolysacharidový komplex (LPS). Skládá se z hydrofobního lipidu A zodpovědného za toxicitu. Na něm jsou přes oligosacharidové jádro navázány specifické O-antigeny, které jsou zodpovědné za schopnost UPEC tlumit indukci cytokinů a chemokinů v buňkách epitelu.<sup>13,16</sup> LPS rovněž poskytuje bakteriím odolnost vůči hydrofobním antibiotikům<sup>12</sup>.

Mezi nejdůležitější toxiny produkované kmeny UPEC patří  $\alpha$ -hemolysin (HlyA) a cytotoxický nekrotizující faktor<sup>11</sup>. HlyA vyvolává oscilace vápenatých kationtů v tubulárních epiteliálních buňkách ledvin, čímž potenciálně zvyšuje kolonizaci

močových a ledvinového parenchymu narušením normálního toku moči. Tento toxin je také spojen s poškozením a zjizvením ledvin.<sup>12</sup>

Přibližně polovina kmenů UPEC byla schopna lyzovat erythrocyty. V 60. letech 20. století se ukázalo, že hemolýza byla zprostředkována právě sekretovaným HlyA. Geny zodpovědné za jeho sekreci a aktivaci byly identifikovány během následujících desetiletí.<sup>17</sup>

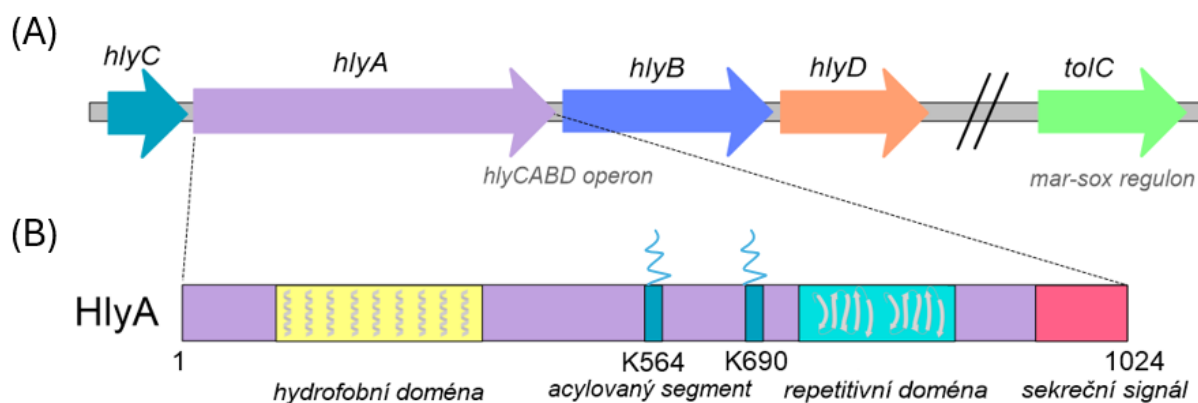
### 1.1.3 $\alpha$ -hemolyzin HlyA

HlyA je polypeptid o délce 1024 aminokyselinových zbytků a molekulové hmotnosti 110 kDa. Patří do skupiny RTX (Repeats in ToXin) cytotoxinů, které jsou produkovány gramnegativními bakteriemi.<sup>18</sup> Jak anglický název této skupiny napovídá, všechny RTX toxiny nesou ve své C-koncové části opakující se nonapeptidové sekvence (repetice), které tvoří místa pro vazbu vápenatých iontů<sup>19</sup>.

Na základě druhové a buněčné specifity můžeme RTX toxiny rozdělit na dvě skupiny. Do první skupiny patří tzv. RTX hemolyziny, které dokážou lyzovat erythrocyty, ale jsou toxické i pro jiné typy buněk. Nejlépe charakterizovaným hemolyzinem této skupiny je právě HlyA produkováný uropatogenní bakterií *E. coli*, jehož cytolytická aktivita byla poprvé pozorována na krevních agarrech. Do druhé skupiny pak patří tzv. RTX leukotoxiny, které jsou naopak úzce druhově a buněčně specifické díky jejich interakci se specifickými buněčnými receptory, kterými jsou  $\beta_2$  integriny leukocytů.<sup>18,20</sup>

#### 1.1.3.1 Geny nezbytné pro produkci, aktivaci a sekreci HlyA

Geny kódující HlyA a další proteiny potřebné k jeho aktivaci a sekreci jsou umístěny v operonu *hlyCABD* (Obr. 2: ). Gen *hlyC* kóduje acyltransferasu aktivující protoxin hemolyzinu (proHlyA), který je exprimován z genu *hlyA*. Zbývající dva geny tohoto operonu kódují proteiny sekrečního systému typu 1 (T1SS, z angl. type 1 secretion system) potřebné pro sekreci toxinu z bakteriální buňky do extracelulárního prostoru. Gen *hlyB* kóduje ABC transportér (ABC, z angl. ATP-binding cassette) a gen *hlyD* kóduje membránový fúzní protein (MFP, z angl. membrane fusion protein).<sup>18,21</sup> Třetí protein sekrečního systému, protein vnější membrány (OMP, z angl. outer membrane protein) je kódován genem *tolC*, který se nachází na chromozomu *E. coli* mimo *hlyCABD* operon a je součástí tzv. *mar-sox* regulonu<sup>22</sup>.

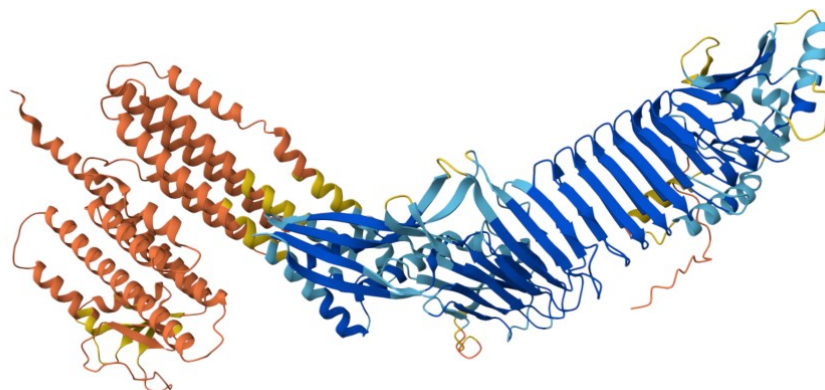


Obr. 2: (A) **Schematické znázornění operonu *hlyCABD***. Geny pro acyltransferasu HlyC, protoxin HlyA a transportní proteiny jsou umístěny v operonu *hlyCABD*. Gen *tolC* kódující OMP se nachází mimo tento operon a je součástí tzv. *mar-sox* regulonu. Šipky v rámci operonu znázorňují směr transkripce jednotlivých genů. (B) **Schematické znázornění struktury HlyA kódovaného genem *hlyA***. Toxin se skládá z hydrofobní domény tvořící póry, acylovaného segmentu, repetitivní domény a sekrečního signálu. Schémata byla vytvořena pomocí programu ChemSketch.

Charakteristické strukturní a funkční domény a segmenty, které sdílí skupina RTX toxinů, a tedy i HlyA jako jejich prototyp (Obr. 2B), jsou:

- 1.) N-koncová hydrofobní doména tvořící membránové póry,
- 2.) acylovaný segment nesoucí dva lysinové zbytky (K564 a K690), které jsou acylovány acyltransferasou HlyC,
- 3.) repetitivní (RTX) doména, do níž se vážou vápenaté ionty,
- 4.) C-koncový sekreční signál zajišťující sekreci toxinu z bakteriální buňky pomocí T1SS (HlyB, HlyD a TolC).<sup>23</sup>

Predikovaná terciární struktura HlyA je vyobrazena na obrázku (Obr. 3).

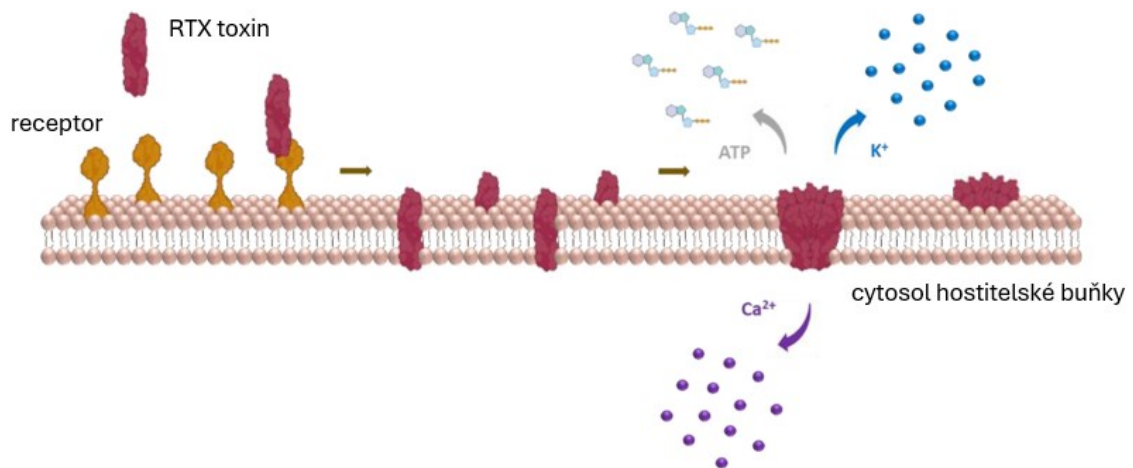


Obr. 3: **Terciární struktura toxinu HlyA** predikovaná pomocí programu AlphaFold z jeho aminokyselinové sekvence. AlphaFold Protein Structure Database: *Hemolysin A*. Dostupné z URL: <<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q1R2T5>> [cit. 27. 4. 2024]

### 1.1.3.2 N-koncová část s hydrofobní doménou tvořící póry

N-koncovou část toxinu HlyA tvoří hydrofobní doména nesoucí několik transmembránových  $\alpha$ -helixů (Obr. 2, str. 15). Ty se vkládají do membrány cílové buňky a vytváří v ní pór umožňující obousměrný tok iontů, který může vést až ke koloidně-osmotické lýze buňky (Obr. 4).<sup>18,24</sup>

HlyA interaguje s cílovou buňkou pravděpodobně ve dvou krocích. Nejdříve se naváže na povrchový receptor hostitelské buňky a následně se nevratně zanoří do buněčné membrány.<sup>25</sup> V kontextu hemolýzy bylo zjištěno, že HlyA k interakci s membránou erytrocytů využívá jako receptor protein glykoforin<sup>26</sup>. N-koncová hydrofobní doména je nezbytná pro pórotvornou aktivitu HlyA<sup>18</sup>. Toxin je schopen se zanořit do lipidové dvouvrstvy, vytvořit v ní hydrofilní transmembránový pór a poškodit tak membránu hostitelské buňky<sup>24</sup>. Po inserci dochází k nevratné konformační změně<sup>27</sup>. Předpokládá se, že tvorba póru vyžaduje oligomerizaci dvou nebo více molekul toxinu v membráně cílových buněk<sup>28</sup>. Oligomerní membránový pór pak umožňuje tok vápenatých iontů do cytosolu buňky a únik draselných iontů ven z buňky, čímž dojde k rozvrácení iontové homeostázy vedoucí až k buněčné smrti. Pór tvořený molekulami HlyA také umožňuje uvolňování ATP z hostitelských buněk.<sup>23,24</sup>

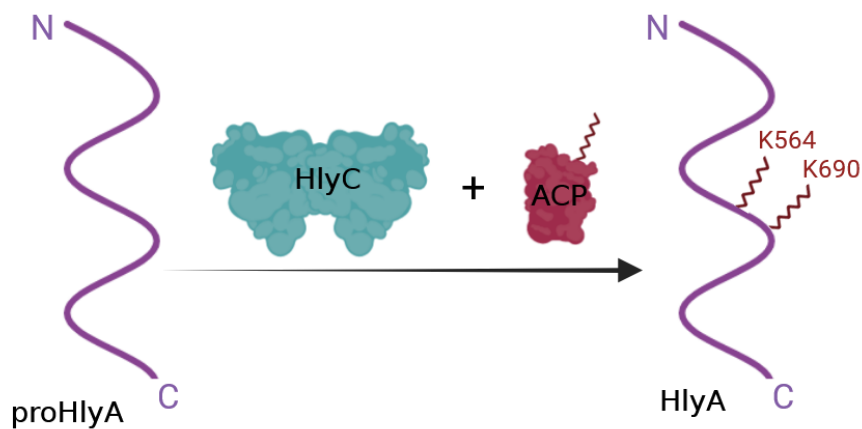


Obr. 4: **Předpokládaný způsob tvorby pórů RTX toxiny.** RTX toxiny se po sekreci z bakteriální buňky nejprve navážou na povrchový receptor hostitelské buňky, poté následuje inserce toxinu do buněčné membrány, a nakonec dojde pravděpodobně k oligomerizaci několika molekul toxinu za tvorby kation selektivního póru. Membránovými póry následně prochází vápenaté ionty dovnitř napadené buňky a draselné ionty ven z buňky. Obrázek byl převzat a upraven<sup>23</sup>.



### 1.1.3.3 Acylovaný segment a jeho modifikace

HlyA je v bakteriální buňce syntetizován jako neaktivní protoxin proHlyA<sup>29</sup>, který je aktivován kovalentní acylací  $\epsilon$ -aminoskupiny dvou konzervovaných lysinových zbytků, K564 a K690. Aktivaci zprostředkovává koexprimovaná specifická acyltransferasa HlyC, která využívá acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) jako donor acylového zbytku. Interakcí mezi negativně nabitým acyl-ACP a pozitivně nabitými skupinami acyltransferasy HlyC se přenesou a kovalentně navážou zbytky mastných kyselin přes amidovou vazbu na konzervované lysinové zbytky protoxinu, jehož specifické sekvence také interagují s acyltransferasou (Obr. 5).<sup>30,31</sup>



Obr. 5: Schematické znázornění aktivace proHlyA. Aktivace netoxického proHlyA syntetizovaného uropatogenními kmeny bakterie *E. coli* je zprostředkována acyltransferasou HlyC a acyl-ACP jako donorem acylového zbytku. Po kovalentní acylaci dvou vnitřních lysinových zbytků, K564 a K690, je HlyA sekretován z cytosolu bakteriální buňky. Schéma bylo vytvořeno pomocí programu BioRender.

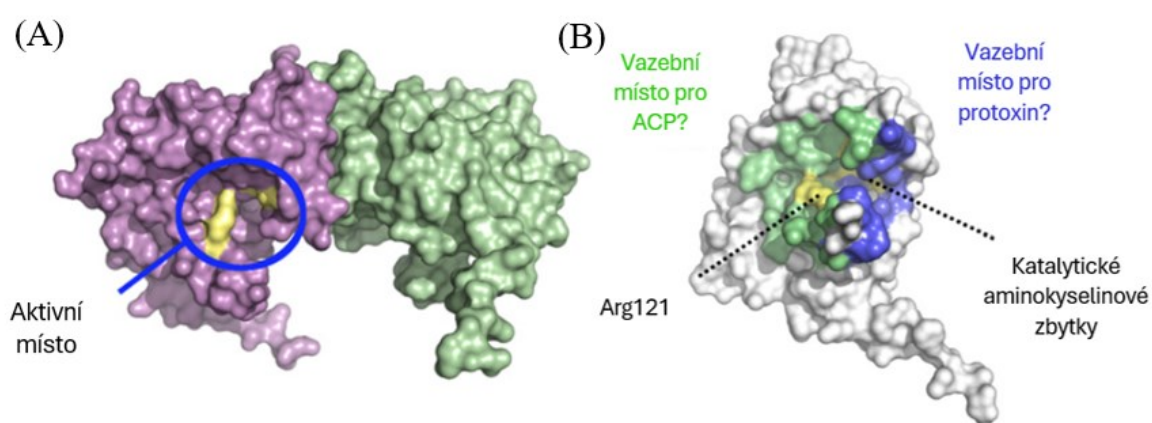
K acylaci proHlyA dokáže acyltransferasa HlyC využít pouze acyl-ACP, ne acyl-CoA ani volné mastné kyseliny<sup>30</sup>. Acyltransferasa HlyC si navíc k aktivaci protoxinu cíleně vybírá z cytosolického rezervoáru acyl-ACP téměř výhradně takové molekuly acyl-ACP, které nesou vázané acyly o délce 14 atomů uhlíku (C14). V případě HlyA produkovaného v kmenu *E. coli* BL21 byly oba lysinové zbytky (K564 a K690) acylovány pomocí HlyC nejčastěji řetězcem kyseliny myristové (C14:0) a hydroxymyristové (C14:0-OH).<sup>32</sup>

Molekulární mechanismus aktivace RTX toxinů dosud není zcela prozkoumán. Jediná acyltransferasa aktivující RTX toxin, u které byla zjištěna rentgenová struktura, je acyltransferasa ApxIC z patogenní bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Je dlouhá 172 aminokyselinových zbytků a s HlyC, kterou umí přímo nahradit v aktivaci proHlyA

*in vivo*, sdílí v rámci primární sekvence přibližně 70% homologii. Kombinací různých přístupů a technik bylo prokázáno, že ApxIC zaujímá dimerní strukturu (Obr. 6A). Rozhraní tohoto dimeru je do značné míry hydrofobní s přiblížením N-koncových helixů, které zprostředkovávají interakci mezi jednotlivými monomery.<sup>33</sup>

Byly navrženy dva obecné mechanismy aktivace protoxinu. V prvním vzniká terciární komplex mezi enzymem a oběma substráty, zabezpečující přímý nukleofilní útok lysinu protoxinu na thioester acyl-ACP s následným uvolněním ACP. Druhým navrhovaným je dvoukrokový mechanismus přes vytvoření meziprojektu acyl-enzym, který následně acyluje konečný lysinový zbytek protoxinu.<sup>33</sup>

Každý monomer ApxIC obsahuje aktivní místo vazby substrátu, které se pravděpodobně nachází v hlubokém žlábků (Obr. 6B). V tomto místě byly vytipovány 3 aminokyselinové zbytky, H24, S21 a D93, připomínající katalytickou triádu nalezenou v jiných acyltransferasách a proteasách. Pro potvrzení hypotézy byly dané aminokyselinové zbytky substituovány za zbytek alaninu. Výrazné snížení aktivity se projevilo jen při substitucích D93A a H24A. Role S21 jako nukleofilu v rámci katalytické triády se nepotvrdila. Žádná z těchto alaninových substitucí neovlivnila tvorbu dimeru ani interakci s protoxinem. Aminokyseliny H24 a D93 se tedy pravděpodobně účastní katalýzy reakce. Po zavedení bodové mutace R121A se také výrazně snížila aktivita acyltransferasy. Tato mutace dokonce zrušila interakci ApxIC s ACP.<sup>33</sup>

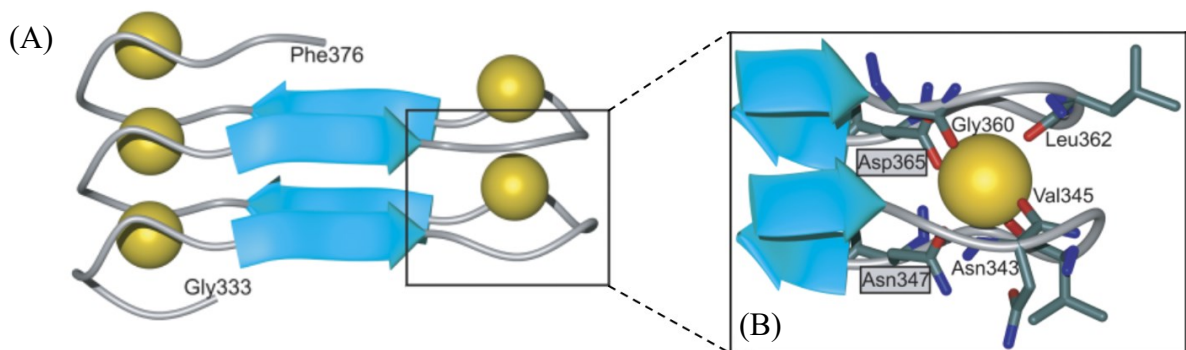


Obr. 6: **Struktura acyltransferasy ApxIC z bakterie *A. pleuropneumoniae*.** (A) Dimerní struktura ApxIC s vyznačeným aktivním místem, které se nachází v hlubokém žlábků obou monomerů. (B) Monomer ApxIC znázorňující navrhovaná vazebná místa pro acyl-ACP a protoxin na opačných stranách acyltransferasy. Katalytické aminokyselinové zbytky jsou vyznačeny žlutě a uvedený Arg121 je nezbytný pro vazbu s ACP. Obrázek byl převzat a upraven<sup>33</sup>.

### 1.1.3.4 Repetitivní (RTX) doména

Repetitivní doména HlyA, do níž se vážou vápenaté ionty, se nachází v C-koncové části toxinu a skládá se z 11 až 17 opakujících se nonapeptidových sekvencí bohatých na zbytky aspartátu a glycinu. Tyto sekvence jsou tvořeny konzervovaným motivem G-G-X-G-X-D-X-U-X, kde X představuje libovolný aminokyselinový zbytek a U hydrofobní zbytek isoleucinu, leucinu nebo valinu.<sup>18,34</sup>

Prvních šest aminokyselinových zbytků motivu (G-G-X-G-X-D) tvoří  $\beta$ -smyčku zapojenou do vazby vápenatého iontu, zatímco zbylé tři (X-U-X) tvoří krátký  $\beta$ -skládaný list. Opakující se nonapeptidové sekvence s tímto motivem pak vytváří pravotočivý helix paralelních  $\beta$ -skládaných listů, kde U zbytky vytváří hydrofobní jádro. Vápenaté kationty se po sekreci RTX toxinu z buňky vážou do hexa-koordinovaného vazebného místa  $\beta$ -smyček přes záporně nabitě zbytky aspartátu a karbonylových funkčních skupin (Obr. 7).<sup>23,34</sup>



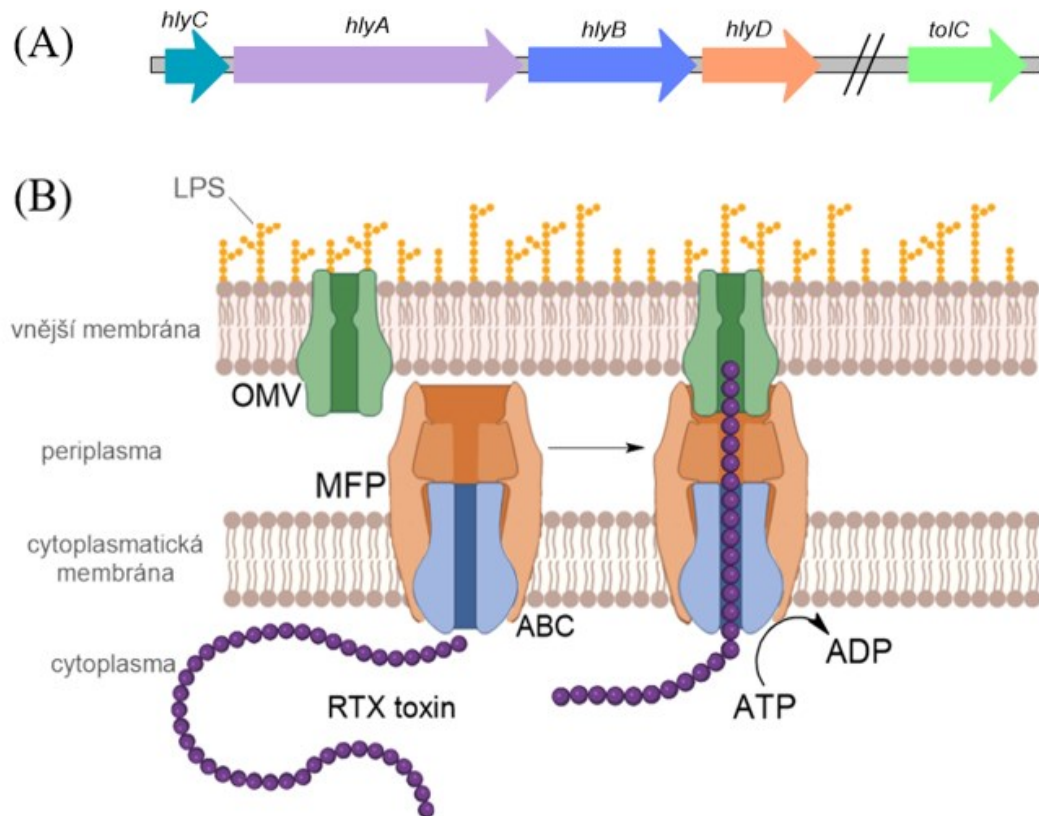
Obr. 7: **Struktura repetitivní domény RTX toxinů.** (A) Zobrazení opakujících se nonapeptidových sekvencí zahrnujících zbytky Gly333 a Phe376 z trojrozměrného modelu alkalické proteasy bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>34</sup> (B) Hexa-koordinované vazebné místo dvou po sobě jdoucích  $\beta$ -smyček. Zvýrazněné aminokyselinové zbytky přímo koordinují vápenaté kationty. Obrázek byl převzat a upraven<sup>18</sup>.

RTX toxiny vyžadují pro svou biologickou aktivitu ionty vápníku, které nelze nahradit většinou dvojmocných iontů bez snížení aktivity toxinů. V nepřítomnosti vápenatých kationtů je RTX doména neuspořádaná, nestabilní a vysoce hydratovaná.<sup>23,35</sup>

### 1.1.3.5 C-koncový sekreční signál a sekreční systém typu 1

Dalším charakteristickým rysem RTX toxinů je přítomnost sekrečního signálu na C-konci molekuly, který je tvořen přibližně 60 aminokyselinovými zbytky a je rozpoznán proteiny T1SS, které zajišťují translokaci RTX toxinu z cytoplazmy bakteriální buňky do extracelulárního prostoru<sup>18,36</sup>.

T1SS se skládá ze tří proteinů – ATP-vázacího ABC transportéru, MFP a OMP z rodiny TolC proteinů. ABC transportér je protein vnitřní membrány s cytoplazmatickou ATPasovou doménou, který funguje jako ABC exportér. MFP v prostoru periplazmy spojuje ABC transportér a OMP, který se částečně nachází v periplazmě a částečně je zabudován ve vnější membráně bakterií.<sup>37</sup> Na počátku sekrece dochází k rozpoznání C-koncového sekrečního signálu RTX toxinu ABC transportérem a MFP (Obr. 8). Následně, díky energii poskytnuté ABC transportérem, MFP spouští sestavení translokačního kanálu interakcí s OMP v periplazmě. Tento komplex propojující vnitřní a vnější membránu pak translokuje RTX toxin jedнокrokovým mechanismem přímo z bakteriálního cytosolu do extracelulárního prostoru (Obr. 8, str. 21).<sup>37,38</sup> Vzhledem k tomu, že je koncentrace vápenatých kationtů v bakteriální buňce řádově nižší než v extracelulárním prostoru, zůstává toxin v cytoplazmě v rozvolněné formě a lze jej tak lehce transportovat přes membránu<sup>18,39</sup>. Během sekrece se vápenaté kationty přítomné ve vnějším prostředí postupně vážou do opakujících se nonapeptidových sekvencí sekretovaného toxinu, což zajistí jeho správné seskládání do aktivní terciární struktury. Je zajímavé, že funkce proteinů ABC a MFP je jedinečná pro T1SS, zatímco OMP je pleiotropní a má řadu dalších funkcí, jako je například zbavování se toxických molekul<sup>23</sup>.



Obr. 8: Schematické znázornění sekrece RTX toxinu prostřednictvím T1SS. (A) Geny kódující proteiny T1SS – *hlyB* kóduje ABC transportér, *hlyD* kóduje MFP (membránový fúzní protein) a *tolC* kóduje OMP (protein vnější membrány). (B) Sekreční signál na C-konci RTX toxinu je rozpoznán ABC transportérem v komplexu s MFP. Následně periplazmatická část MFP interaguje s OMP a vytvoří transmembránový kanál přes obě bakteriální membrány. Jednokrokovým mechanismem pak dochází k transportu toxinu sekrečním kanálem z bakteriálního cytosolu přímo do extracelulárního prostoru. Schéma bylo vytvořeno pomocí programu BioRender.

## 1.2 Bakteriální adenylátcyklasový dvouhybridní systém

Proteiny jsou nejdůležitější výkonné molekuly, jejichž struktura je zakódovaná v genetické informaci každé buňky. Většina biologických procesů v buňkách je založena na interakcích proteinů. Identifikace jejich interakcí je proto zcela zásadní pro biochemické zkoumání proteinů a dějů, kterých se účastní. Metod detekce existuje mnoho. Prvním systémem testování interakcí proteinů *in vivo* byl kvasinkový dvouhybridní systém<sup>40</sup>. Využívá koexpresi dvouhybridních proteinů ve stejné buňce, kterou lze detekovat na základě fenotypového screeningu nebo selekce<sup>41</sup>. Jako alternativa ke kvasinkovému systému bylo vytvořeno několik systémů pro sledování protein-proteinových interakcí v bakteriích. Bakteriální adenylátcyklasový dvouhybridní (BACTH, z angl. bacterial adenylate cyclase two hybrid) systém je jednou z metod k sledování protein-proteinových interakcí *in vivo* v bakterii *E. coli*. Byl vytvořen a popsán skupinou Dr. D. Ladanta v Pasteurově institutu v roce 1998.<sup>42</sup>

Tento systém využívá specifické vlastnosti adenylátcyklasového toxinu (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis*. Pokud do bakterie *cya* kmene *E. coli*, který postrádá endogenní adenylátcyklastu (AC), vložíme dvě části (T25 a T18) katalytické domény tohoto toxinu fúzované s testovanými proteiny, tak se v případě jejich interakce obnoví v buňce AC aktivita a začne se tvořit cyklický adenosinmonofosfát (cAMP, z angl. cyclic adenosinmonophosphate). cAMP se jako druhý posel váže na katabolický aktivační protein (CAP, z angl. catabolite activator protein), přičemž vzniklý komplex cAMP/CAP reguluje expresi různých genů, mimo jiné i geny *lac* a *mal* operonu zahrnutých v katabolismu laktosy a maltosy. Jejich aktivace může být snadno detekovatelná v bakteriálních buňkách *E. coli*.<sup>42</sup>

Výhodou BACTH systému je schopnost spouštět signální kaskádu využívající difúzní regulační molekulu cAMP. Díky tomu může být fyzikální spojení interagujících proteinů prostorově odděleno od aktivace transkripce. BACTH systém umožňuje sledovat interagující proteiny v cytosolu, na úrovni vnitřní membrány nebo na DNA.<sup>43</sup> Tento systém byl úspěšně využit při sledování interakcí proteinů různého původu, velikostí, funkcí i umístění v buňce<sup>44</sup>.

Další z výhod detekce proteinových interakcí v bakteriích *E. coli* je jednoduchá manipulace s bakteriálními buňkami. V porovnání s kvasinkami rostou bakterie rychleji a transformují se snadno, s vysokou účinností.<sup>44</sup>

### 1.2.1 Princip dvouhybridního systému

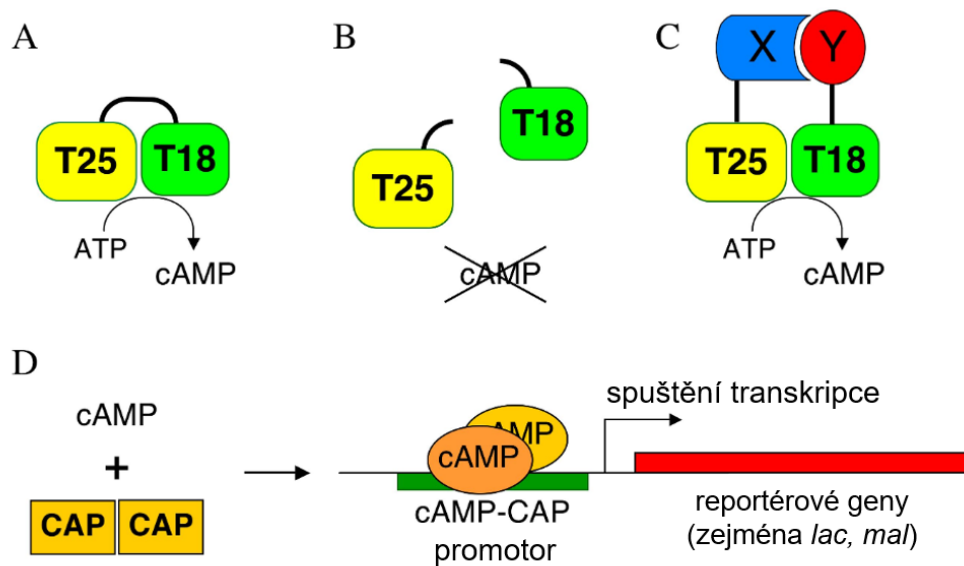
*B. pertussis*, která je původcem černého kašle produkuje toxin CyaA o délce 1706 aminokyselinových zbytků<sup>43,45,46</sup>. Enzymová AC doména CyaA je aktivována kalmodulinem, což je vápník vázající protein nacházející se v eukaryotních buňkách, do nichž CyaA svoji enzymovou AC doménu přímo translokuje<sup>45,47</sup>. AC doména může být produkována samostatně (bez zbytku molekuly CyaA) a v přítomnosti kalmodulinu, jakožto aktivátoru, má zachovanou vysokou katalytickou aktivitu. Bez něj naopak nízkou, avšak detekovatelnou.<sup>42</sup>

AC doména se skládá z prvních 400 aminokyselinových zbytků CyaA, který je kódován genem *cyaA*. AC doména může být limitovanou proteolýzou rozdělena na dva fragmenty – T25 a T18. N-koncový fragment T25 o molekulové hmotnosti 25 kDa (zbytky 1-235/237) nese část vazebného místa pro kalmodulin, a navíc vykazuje nízkou, avšak měřitelnou enzymovou aktivitu, což značí přítomnost katalytického místa. C-koncový fragment T18 s molekulovou hmotností 18 kDa (zbytky 236/238–399) nese druhou část vazebného místa pro kalmodulin. Díky tomu se tyto dva rozštěpené fragmenty mohou v přítomnosti kalmodulinu opětovně spojit, čímž dojde k obnovení vysoké enzymové AC aktivity. Je tedy zjevné, že oba fragmenty spolu s kalmodulinem jsou nezbytné k dosažení vysoké úrovně enzymové aktivity katalytické AC domény.<sup>48</sup>

V prostředí bez kalmodulinu, v prokaryotické bakteriální buňce *E. coli*, vykazuje celá, nerozdělená katalytická AC doména (aminokyselinové zbytky 1–399) po expresi bazální AC aktivitu nezávislou na kalmodulinu a dochází k tvorbě cAMP (Obr. 9A, str. 24). V případě, kdy jsou ale fragmenty T25 a T18 AC domény koexprimovány v buňce *E. coli* samostatně, nedokážou se spojit a nedochází tedy ani k bazální produkci cAMP (Obr. 9B, str. 24). Pokud v *cya* kmenu *E. coli*, deficientním na AC, exprimujeme ale oba fragmenty, každý fúzovaný s jedním testovaným proteinem, tak v případě interakce daných proteinů dojde k opětovnému spojení fragmentů T25 a T18 a obnově syntézy cAMP (Obr. 9C, str. 24).<sup>42</sup>

Syntéza cAMP spouští expresi několika genů *E. coli*, díky čemuž vzniká detekovatelný fenotyp. cAMP je klíčovou signální molekulou vázající se na pleiotropní transkripční aktivátor CAP. Vzniklý komplex cAMP/CAP řídí expresi velkého počtu genů, včetně genů zapojených do katabolismu disacharidů jako je laktosa

nebo maltosa (Obr. 9D).<sup>43</sup> Tyto bakterie dokážou využít laktosu a maltosu jako jedinečný zdroj uhlíku a lze je tak snadno rozlišit na selektivních médiích.<sup>44</sup>



Obr. 9: **Princip bakteriálního adenylátcyklusového dvouhybridního systému.** (A) Celá katalytická AC doména (aminokyselinové zbytky 1–399), která po expresi v *E. coli* vykazuje bazální AC aktivitu nezávislou na kalmodulinu a katalyzuje tvorbu cAMP. (B) Pokud jsou dva samostatné fragmenty katalytické domény, T25 a T18, exprimovány v *E. coli* společně, nejsou tyto fragmenty schopny interagovat za vzniku funkční AC domény, a proto se cAMP netvoří. (C) Oba fragmenty katalytické domény jsou fúzovány s interagujícími proteiny, X a Y, které pokud spolu interagují, tak obnoví katalytickou funkci AC domény, a tím i syntézu cAMP. (D) Syntetizovaný cAMP se váže na CAP a komplex cAMP/CAP může následně rozpoznávat specifické promotory, a tím spouštět expresi různých genů. Obrázek byl převzat a upraven<sup>44</sup>.

*Cya*<sup>-</sup> kmeny *E. coli* mají odstraněný gen kódující endogenní adenylátcyklasu a tedy nejsou schopny tvořit cAMP. Patří mezi ně kmeny BTH101 a DHM1, jejichž různé genotypy vedou například ke komplementaci s různou účinností. Kmen BTH101 vykazuje vynikající účinnost BACTH a rychlý růst, ale v důsledku *rec*<sup>+</sup> charakteru kmene se může objevit určitá nestabilita plasmidů. Naopak DHM1 je kmen *recA*<sup>-</sup> s nižší účinností komplementace a pomalejším růstem.<sup>44</sup>

### 1.2.2 Testování proteinových interakcí pomocí dvouhybridního systému

Na začátku je potřeba si pomocí technik genového inženýrství připravit rekombinantní plasmidy pro produkci příslušných fúzních proteinů, k čemuž slouží výchozí plasmidy poskytované společností Euromedex (Paříž, Francie). Plasmidy pKNT25 a pKT25 nesou pod transkripční kontrolou *lac* promotoru sekvenci DNA kódující fragment T25 (zbytky 1–224)<sup>42</sup>, k jehož N-konci (pKNT25), resp. C-konci (pKT25) může být na genetické úrovni



fúzován první testovaný protein (Obr. 14, str. 33). Jedná se o plasmidy s nízkým počtem kopií, s počátkem replikace p15A a kanamycinovou rezistencí jako selektivním markerem. Plasmidy pUT18 anebo pUT18C pak nesou pod transkripční kontrolou *lac* promotoru sekvenci DNA kódující fragment T18 (zbytky 225–399)<sup>42</sup>, k jehož N-konci (pUT18), resp. C-konci (pUT18C) může být na genetické úrovni fúzován druhý testovaný protein (Obr. 15, str. 34). Tyto plasmidy se vyznačují vysokým počtem kopií, nesou počátek replikace ColE1 a jako selektivní marker gen pro rezistenci vůči ampicilinu. Do vícenásobného klonovacího místa (MCS, z angl. multiple cloning site) prvního setu plasmidů (pKNT25 a pKT25) tak může být vložen DNA segment kódující první testovaný protein, pro produkci prvního fúzního partnera. Do MCS druhého setu plasmidů (pUT18 anebo pUT18C) je pak vkládán DNA segment kódující druhý testovaný protein, pro produkci druhého fúzního partnera.<sup>44,49</sup>

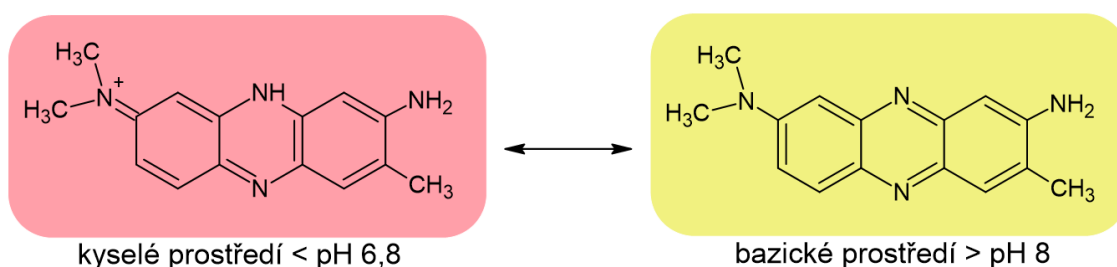
Jako pozitivní kontrola slouží plasmidy pKT25-*zip* a pKT18-*zip*, z nichž jsou produkovány fúzní proteiny T25-LeuZip a T18-LeuZip, kde LeuZip je označení pro leucinový zip o délce 35 aminokyselinových zbytků z proteinu GCN4, kvasinkového transkripčního aktivátoru.<sup>42</sup> Jako negativní kontroly pak slouží původní plasmidy, z nichž se produkují samotné fragmenty T25 a T18.<sup>41</sup>

Druhým krokem je kotransformace dvojice plasmidů, z nichž jsou exprimovány fragmenty T25 a T18 fúzované s příslušnými testovanými proteiny, do *cya*<sup>-</sup> kmene *E. coli*. Kotransformované buňky se následně inokulují na indikátorové nebo selektivní médium, aby se odhalil výsledný *cya*<sup>+</sup> fenotyp. Pozitivní interakce mezi fúzovanými proteiny lze pak snadno kvantifikovat měřením hladiny cAMP anebo stanovením enzymové aktivity  $\beta$ -galaktosidasy v permeabilizovaných bakteriálních buňkách s použitím ortho-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosidu (ONPG, z angl. ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside) jako substrátu.  $\beta$ -galaktosidasa je tak reportérem pro kvantitativní analýzu interakce mezi testovanými proteiny.<sup>49</sup>

Princip námi používaných detekčních metod je uveden v následujících odstavcích.

### 1.2.3 MacConkey agar

Médium s MacConkey agarem je bakteriální selektivní a diferenační kultivační médium používané k izolaci gramnegativních bakterií a jejich rozlišení podle schopnosti fermentace laktosy<sup>50</sup>. Mezi klíčové složky MacConkey agaru patří barvivo krystalová violet, žlučové soli, laktosa a neutrální červeň. Obsažené žlučové soli a krystalová violet inhibují růst grampozitivních bakterií.<sup>51</sup> Neutrální červeň je pH indikátorem, který se v kyselém prostředí při pH 6,8 zbarvuje do červena (Obr. 10).



Obr. 10: Chemická struktura barviva neutrální červeň v kyselém a bazickém prostředí. Schéma bylo vytvořeno v programu ChemSketch.

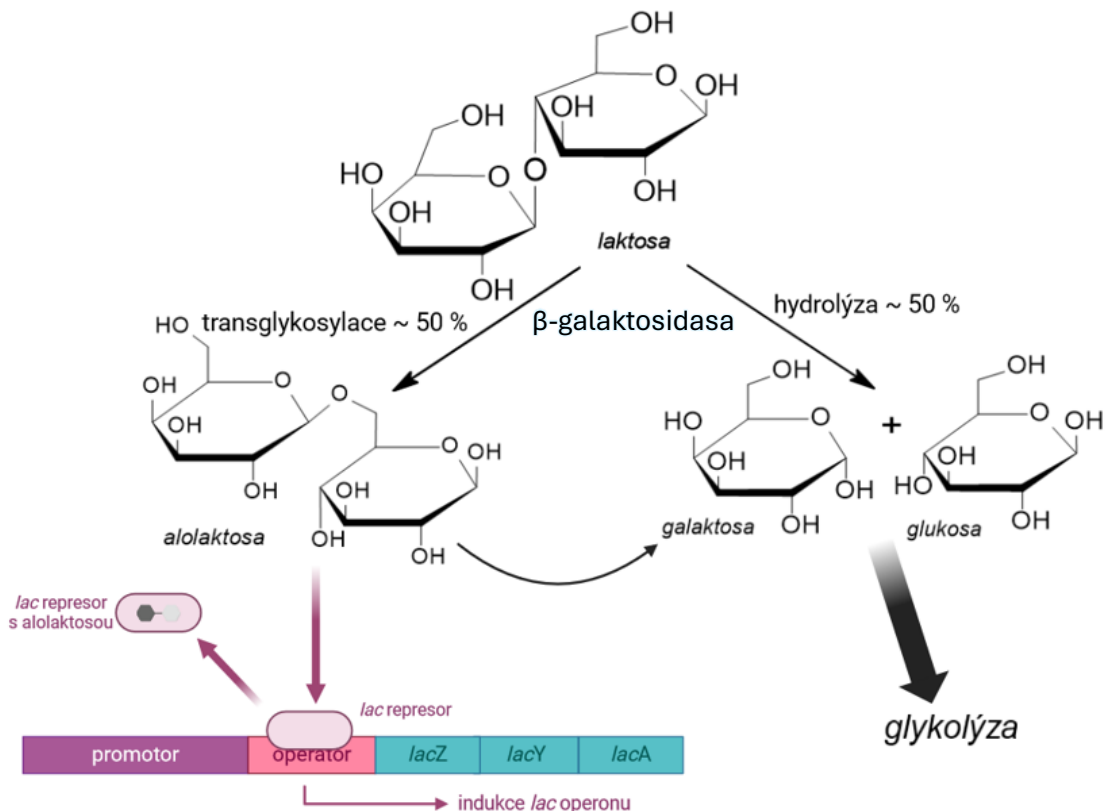
Fermentací laktosy bakteriemi vznikají organické kyseliny, zejména laktát, který snižuje pH agaru a tím mění barvu neutrální červeneš.<sup>52,53</sup> Barvivo je přijímáno i bakteriálními buňkami, což vede k červenému zbarvení bakteriálních kolonií schopných fermentovat laktosu. Gramnegativní druhy neschopné fermentace laktosy budou naopak tvořit bílé kolonie. Do žluta se agar zbarvuje díky barvě indikátoru v bazickém prostředí (může vznikat například v důsledku deaminace aminokyselin při využití proteinů jako zdroje energie).<sup>53,54</sup>

K bakteriím fermentujícím laktosu patří bakterie *E. coli*<sup>1</sup>. Prvním krokem přeměny laktosy na pyruvát je její hydrolýza na glukosu a galaktosu. To zajišťuje enzym  $\beta$ -galaktosidasa, jejíž expresi pozitivně reguluje komplex cAMP/CAP.<sup>55</sup> Ve dvouhybridním systému se používají *cya*<sup>-</sup> kmeny *E. coli* postrádající schopnost tvořit cAMP. Tyto bakterie nejsou schopny fermentovat laktosu, proto jsou jejich kolonie na MacConkey agaru bílé. Máme-li ve dvouhybridním systému fúzované dva interagující proteiny, které zajistí interakci fragmentů T25 a T18, a tím obnovu AC aktivity a tvorbu cAMP, spustí se exprese  $\beta$ -galaktosidasy a bakterie budou opět schopny využít laktosu

jako zdroj energie. Jejich kolonie budou červené a budou indikovat interakci dvou testovaných proteinů.<sup>44,54</sup>

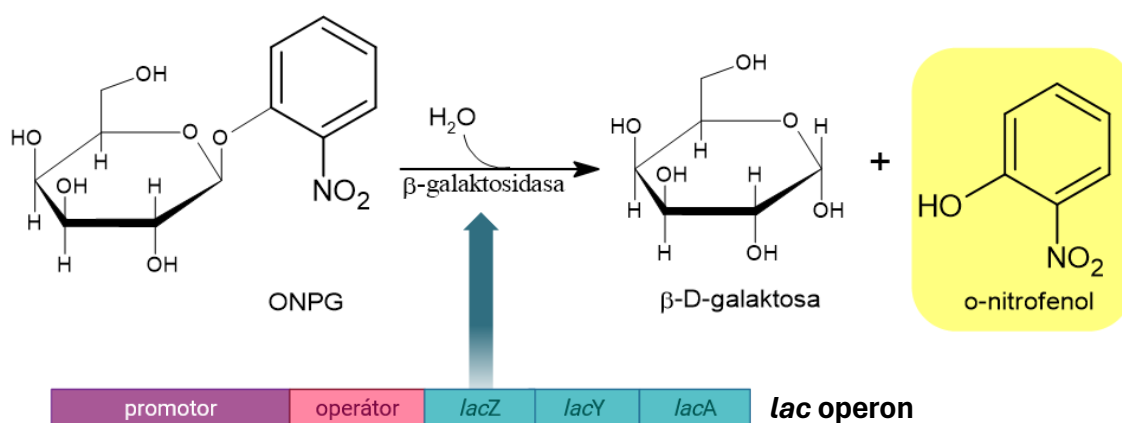
### 1.2.4 Měření aktivity $\beta$ -galaktosidasy

Interakci fragmentů T25 a T18, která obnovuje AC aktivitu v buňce, lze kvantifikovat přímo měřením hladiny cAMP buď pomocí radioimunoanalýzy nebo metody enzymové imunosorbentní analýzy, nebo i nepřímo pomocí měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy<sup>44</sup>. Již zmíněný komplex cAMP/CAP spouští expresi různých operonů v bakteriální buňce, mimo jiné i *lac* operonu<sup>43</sup>. První gen *lac* operonu, *lacZ*, kóduje enzym  $\beta$ -galaktosidasu katalyzující dvě enzymové reakce: hydrolýzu  $\beta$ -D-galaktopyranosidů (enzym je nezbytný pro hydrolýzu disacharidu laktosy na glukosu a galaktosu) a trans-glykosylační reakce, při které se laktosa mění na allolaktosu (Obr. 11). Allolaktosa po vazbě na *lac* represor indukuje expresi genů *lac* operonu.<sup>55</sup> Enzym  $\beta$ -galaktosidasa interaguje i s dalšími syntetickými analogy laktosy, ve kterých byla glukosa nahrazena jinými skupinami<sup>56</sup>.



Obr. 11: Schéma funkce  $\beta$ -galaktosidasy. Schéma bylo vytvořeno pomocí programů ChemSketch a BioRender.

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy a tedy i její množství v bakteriálních kulturách se obvykle měří spektrofotometricky. Vzhledem k tomu, že enzym štěpí  $\beta$ -galaktosidové vazby, bude hydrolyzovat syntetický chromogenní substrát ONPG za vzniku o-nitrofenolu, který je ve vodném roztoku žlutý (Obr. 12). Po proběhnutí a zastavení reakce se změří absorbance při 420 nm, jejíž hodnota bude odpovídat množství  $\beta$ -galaktosidasy, což odpovídá množství cAMP a tedy i míře interakce mezi dvěma testovanými proteiny, sledované pomocí dvouhybridního systému.<sup>56,57</sup>



Obr. 12: **Reakce hydrolytického štěpení ONPG  $\beta$ -galaktosidasou** za vzniku  $\beta$ -D-galaktosy a barevného produktu o-nitrofenolu. Schéma bylo vytvořeno pomocí programů ChemSketch a BioRender.

Test využívá bakteriální buňky permeabilizované toluenem nebo chloroformem a resuspendované v pufru s obsahem  $\beta$ -merkaptoethanolu. Po inkubaci s ONPG je reakce zastavena změnou pH, které docílíme přidáním hydrogenuhličitanu sodného, jelikož pH optimum enzymu je okolo 7,2<sup>44,58</sup>. Následně se měří absorbance při 420 nm.<sup>44</sup>

## 2 Cíle práce

Uropatogenní bakterie *E. coli* produkují toxin HlyA, který je syntetizován v bakteriální buňce ve formě neaktivního protoxinu proHlyA. Je to jeden z nejméně prozkoumaných RTX toxinů, avšak mechanismus jeho aktivace doposud není zcela objasněn. V této práci byly studovány proteinové interakce podílející se na aktivaci toxinu HlyA. Byly připraveny mutace v acyltransferase HlyC a následně bylo pomocí BACTH systému sledováno jejich ovlivnění interakce s ACP.

Cíle práce:

- i. Příprava plasmidů pro BACTH systém exprimujících testované proteiny fúzované s fragmenty katalytické AC domény.
- ii. Analýza interakcí HlyC s ACP v BACTH systému a určení jejich nejefektivnější orientace.
- iii. Příprava mutací v acyltransferase HlyC (HlyC<sub>MUT</sub>).
- iv. Analýza interakcí mutovaných variant HlyC<sub>MUT</sub> s ACP v BACTH systému a jejich kvantitativní analýza stanovením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy.
- v. Analýza interakcí mutovaných variant HlyC s ACP<sub>MUT</sub> v BACTH systému a jejich kvantitativní analýza stanovením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy.
- vi. Analýza interakcí HlyC s fragmentem HlyA<sub>535-719</sub> v BACTH systému a určení jejich nejefektivnější orientace.

## 3 Přístroje a materiály

### 3.1 Přístroje

Centrifuga – Sorvall LYNX 4000, Thermo Fisher Scientific, CZE

- Rotor – Thermo Scientific Fiberlite F20-12x50 LEX Rotor

Digitální analytické váhy – Mettler, DEU

Elektroforéza – 2303 Multidrive XL, Pharmacia Biotech, SWE

Elektroforéza – MUPID One, Advance, CZE

Laboratorní váhy – AJ 820CE, Vibra, JPN

Lázeň – Velp Scientifica, ITA

Mikrocentrifuga – Biofuge pico, Heraeus Instruments, DEU

Mrazicí box (–80°C), Jouan, FRA

PCR cyklér – Biometra TAdvanced Twin, Analytik Jena, DEU

pH-metr – MV 870, Präcitronick, DEU

Spektrofotometr/fluorometr – DS-11 FX, DeNovix, SVK

Tepelná třepačka – Thermo-Shaker TS-100C, Biosan, LVA

UV transiluminátor – G:Box, Syngene, USA

Vodní lázeň – Heating immersion circulators, Julabo, CZE

Vodní lázeň – Water Bath GFL 1004 Incubation/Inactivation Bath, CZE

Vortex – MS2 minishaker, IKA-Works, Inc., USA

Vortex – Vortex V-1 plus, Biosan, LVA

## 3.2 Materiály

### 3.2.1 Použité chemikálie

$\beta$ -merkaptoethanol, Sigma-Aldrich, USA  
 $\lambda$ -DNA, Thermo Fisher Scientific, USA  
Ampicilin, Biotika, SVK  
Bakteriologický agar, Oxford, GBR  
Bacto-trypton, Sigma-Aldrich, USA  
Dihydrogenfosforečnan draselný, Sigma-Aldrich, USA  
Dihydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich, USA  
Dodecylsíran sodný (SDS), Serva, DEU  
Ethanol, Lach-Ner, CZE  
Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich, USA  
Vzorkový pufr (6x), New England BioLabs, USA  
Glycerol, Sigma-Aldrich, USA  
Hydrogenfosforečnan sodný, Sigma-Aldrich, USA  
Hydroxid draselný, Lachema, CZE  
Chlorid sodný, Sigma-Aldrich, USA  
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich, USA  
Kanamycin, Biotika, SVK  
Kvasničný extrakt, Sigma-Aldrich, USA  
Kyselina boritá, Lachema, CZE  
Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), Sigma-Aldrich, USA  
Maltosa, Sigma-Aldrich, USA  
o-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid (ONPG), EMD Millipore Corp., USA  
Reakční směs deoxynukleotidů (dNTP), New England BioLabs, USA  
Síran amonný, Sigma-Aldrich, USA  
Síran horečnatý, Sigma-Aldrich, USA  
Síran manganatý, Sigma-Aldrich, USA  
Síran železnatý, Sigma-Aldrich, USA  
Thiamin – vitamin B1, Sigma-Aldrich, USA  
Toluen, Sigma-Aldrich, USA  
Tris-HCl, Serva, DEU  
Uhličitan sodný, Sigma-Aldrich, USA

### 3.2.2 Použité primery

V níže uvedených tabulkách jsou uvedeny primery použité při PCR amplifikacích (Tab. 1, Tab. 2) a při sekvenování (Tab. 3). Primery byly dodány v lyofilizované formě firmou Generi Biotech, CZE.

Tab. 1: Seznam a sekvence přímých primerů použitých v PCR.

<b><i>název</i></b>	<b><i>sekvence 5' → 3'</i></b>
BamHI-hlyA535-For	TAGAGGATCCCTCTGACAGCAAATCTTCTACG
HindIII-hlyA535-For	CGCCAAGCTTGTCTGACAGCAAATCTTCTACG
HindIII-hlyC-For	CGCGAAGCTTAATGAATATAAACAAACCATTAGAG
hlyC-K105Afor	GCCCTGTACGCGTATATGCGAAAAAAATCCCTGATG
hlyC-K129Afor	GTTGGTGCAGTATCAGAATCCATGGAGGTAATAATTGATAAACAG
hlyC-R108Afor	CGGGGCCCTGTACAAATATATGGCAAAAAAATCCCTGATGAACTATTC
hlyC-R120Afor	CAGAGCGATCGCGGTGGATCCCAAACTCATG
hlyC-R49Afor	GTTTTGTTAACCGCGGATGATTACCTGTCCGCG
PstI-hlyC-For	TAGACTGCAGGGATGAATATAAACAAACCATTAGAG
SapIFor	GGAAGCGGAAGAGCGCCC

Tab. 2: Seznam a sekvence zpětných primerů použitých v PCR.

<b><i>název</i></b>	<b><i>sekvence 5' → 3'</i></b>
HindIIIRev	GCTCAGAATGAAGCTTGCTG
hlyC-K105Arev	CGCATATACGCGTACAGGGCACCGTTATCC
hlyC-K129Arev	CATGGAATTCTGATACTGCACCAACATGAGTTTTGGGATCC
hlyC-R108Arev	GCCATATATTTGTACAGGGCCCCGTTATCCCCGAAAGGAGC
hlyC-R120Arev	GGATCCACCGCGATCGCTCTGAATAGTTCATCAGGG
hlyC-R49Arev	GTAATCATCCGCGGTTAACAAAACATATTGGTTAGCCTGTATTG
KpnI-hlyA719-Rev	CTTCGGTACCCGACGGAATATAAGTTATCAGTC
KpnI-hlyC-Rev	CTTAGGTACCCGACCAGTTAATGAAAAATTTAAATCTG
SacI-hlyA719-Rev	CTTCGAGCTCGGCACGGAATATAAGTTATCAGTC
SacI-hlyC-Rev	CGGCGAGCTCGGACCAGTTAATGAAAAATTTAAATCTG

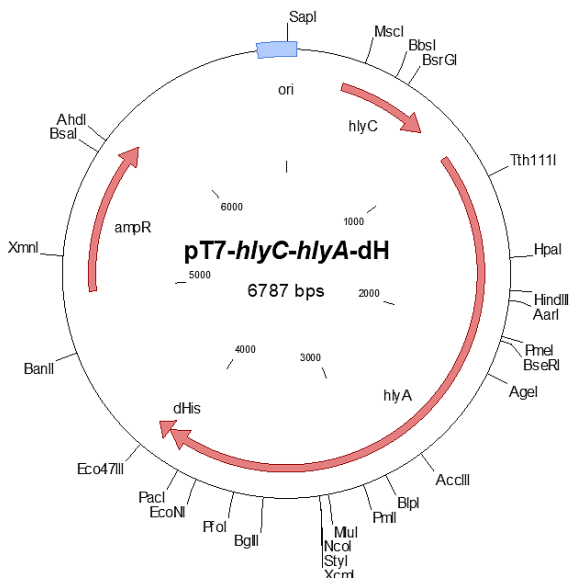
Tab. 3: Seznam a sekvence primerů použitých pro sekvenaci.

<b><i>název</i></b>	<b><i>sekvence 5' → 3'</i></b>
pUTFor	CAGCTGGCACGACAGGTTTC
HlyA-seq1-rev	CTTTGCAGACTGCAGTGTGC
HlyA-seq2-rev	CAACACCTGCTGCAGCTTTAG
pKTFfor	GAGCGCAACGCAATTAATGTG
pKTRev	CGGGTGTGGCGGGTGTC
pKTRev-new	GGAAGGGCGATCGGTGCG
pT7seqORI	CCTGATTCTGTGGATAACCG
pUTRev	CAAGCCCGTCAGGGCGCG
pUTRev-new	GACACGGAAATGTTGAATACTC



### 3.2.3 Použité plasmidy

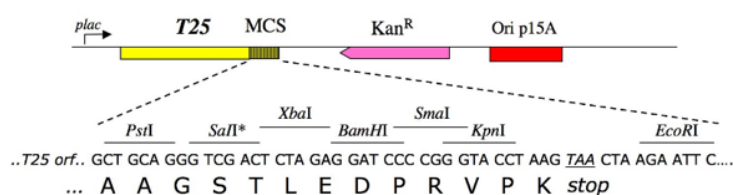
Plasmid pT7-*hlyC-hlyA*-dH nesoucí geny *hlyA* a *hlyC* a gen *amp* kódující rezistenci vůči ampicilinu (Obr. 13).



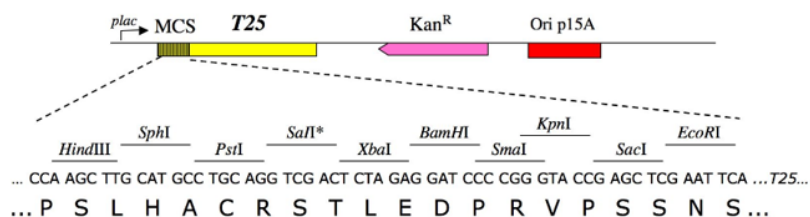
Obr. 13: Mapa plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH. Na okrajích jsou znázorněna unikátní restrikční místa s názvy příslušných restrikčních endonukleas.

Na obrázku jsou znázorněny plasmidy pKNT25 a pKT25 nesoucí DNA segment kódující fragment T25 katalytické AC domény (Obr. 14) a plasmidy pUT18 a pUT18C nesoucí DNA segment kódující fragment T18 (Obr. 15, str. 34). Všechny čtyři plasmidy byly dodány v soupravě pro BACTH systém firmou EUROMEDEX (Paříž, Francie).

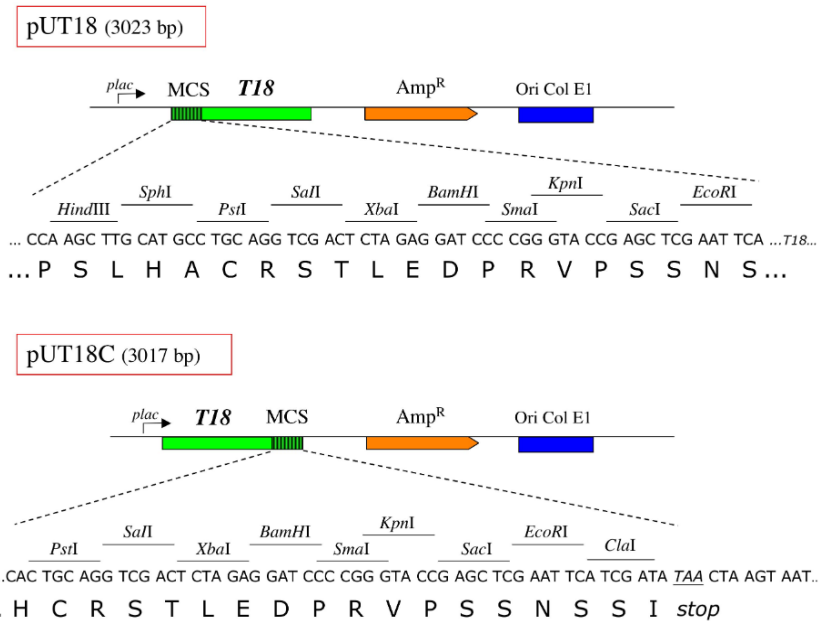
pKT25 (3442 bp)



pKNT25 (3469 bp)



Obr. 14: Mapy částí plasmidů pKT25 a pKNT25 z BACTH systému. Plasmid pKT25 nese MCS na 3'-konci DNA segmentu kódujícího fragment T25, a naopak plasmid pKNT25 na jeho 5'-konci. Plasmidy nesou počátek replikace p15A a gen pro rezistenci ke kanamycinu jako selektivní marker. Obrázek byl převzat<sup>44</sup>.



Obr. 15: **Mapy části plasmidů pUT18 a pUT18C z BACTH systému.** Plasmid pUT18 nese MCS na 5'-konci DNA segmentu kódujícího fragment T18, naopak plasmid pUT18C na jeho 3'-konci. Plasmidy nesou počátek replikace Col E1 a gen pro rezistenci k ampicilinu jako selektivní marker. Obrázek byl převzat<sup>44</sup>.

### 3.2.4 Použité enzymy

QuickCIP fosfatasa, New England BioLabs, USA

Q5 HF DNA polymerasa, New England BioLabs, USA

#### 3.2.4.1 Restrikční endonukleasy

Restrikční endonukleasy jsou enzymy, které štěpí DNA na specifických místech. V tabulce (Tab. 4, str. 35) je uveden seznam použitých restrikčních endonukleas spolu s restrikčním místem, reakčním puřrem a reakční teplotou.

Tab. 4: Seznam použitých restričních endonukleas, jejich restriční místo, reakční pufr a reakční teplota.

<b>Restriční endonukleasa<sup>1</sup></b>	<b>Restriční místo (5'→ 3')</b>	<b>Reakční pufr</b>	<b>Reakční teplota</b>
<i>ApaI</i>	GGGCC/C	CutSmart	25 °C
<i>BamHI-HF</i>	G/GATCC	CutSmart	37 °C
<i>BsrGI</i>	T/GTACA	CutSmart	37 °C
<i>HindIII-HF</i>	A/AGCTT	CutSmart	37 °C
<i>HpaI</i>	GTT/AAC	CutSmart	37 °C
<i>KpnI-HF</i>	GGTAC/C	CutSmart	37 °C
<i>MluI</i>	A/CGCGT	CutSmart	37 °C
<i>NcoI</i>	C/CATGG	CutSmart	37 °C
<i>PstI-HF</i>	CTGCA/G	CutSmart	37 °C
<i>PvuI-HF</i>	CGAT/CG	CutSmart	37 °C
<i>SacI-HF</i>	GAGCT/C	CutSmart	37 °C
<i>SapI</i>	GCTCTTC(N)1/	CutSmart	37 °C
<i>ScaI-HF</i>	AGT/ACT	CutSmart	37 °C
<i>SphI</i>	GCATG/C	CutSmart	37 °C

<sup>1</sup>Všechny restriční endonukleasy jsou od firmy New England BioLabs, USA.

### 3.2.5 Použité bakteriální kmeny

*E. coli* XL1-Blue – Stratagene, USA

*E. coli* BTH101 – Euromedex, FRA

### 3.2.6 Použité soupravy

Monarch® DNA Gel Extraction Kit, New England BioLabs, USA

Monarch® Plasmid Miniprep Kit, New England BioLabs, USA

Quick Ligation™ Kit, New England BioLabs, USA

BACTH System Kit, Euromedex, FRA

### 3.2.7 Použité roztoky

**TBE pufr** (pH 8,3)

- 90 mM Tris-HCl
- 90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
- 2 mM EDTA (pH 8,3)

**TE pufr** (pH 8,0)

- 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 1 mM EDTA (pH 8,3)

**PCR reakční pufr** – Q5 HF Reaction Buffer (5x), New England BioLabs, USA

**GC Enhancer**, New England BioLabs, USA

**CutSmart pufr**, New England BioLabs, USA

### **3.2.7.1 Roztoky pro měření aktivity $\beta$ -galaktosidasy**

#### **M63/maltosové minimální médium**

Na přípravu 5x koncentrovaného:

- 10 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 2,5 mg  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5 mg vitamínu B1

Doplnit sterilní vodou do objemu 1 l a upravit na pH 7,0 s použitím KOH. Médium je nutno před použitím klávkovat.

#### **PM2 pufr (pH 7,0)**

- 70 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- 30 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 1 mM  $\text{MgSO}_4$
- 0.2 mM  $\text{MnSO}_4$

Těsně před použitím přidat 100 mM  $\beta$ -merkapt ethanol.

#### **ONPG (ortho-nitrofenyl- $\beta$ -D-galaktosid)**

Roztok 4 mg/ml v PM2 pufru bez přidaného  $\beta$ -merkapt ethanolu.

### **3.2.8 Použitá kultivační a indikační média**

#### **LB médium (Luria-Bertani médium)**

- 10 g/l Bacto-trypton
- 5 g/l kvasničný extrakt
- 10 g/l NaCl

#### **MacConkey médium**

- 40 g/l MacConkey agar
- 1% maltosa

## 4 Metody

### 4.1 Techniky přípravy plasmidové DNA

#### 4.1.1 Ředění primerů

Primery, dodávané v lyofilizované formě, byly resuspendovány v TE pufru v objemu uvedeném na štítku zkumavky tak, aby bylo dosaženo koncentrace 100  $\mu\text{M}$ . Pro PCR však bylo nutné primery naředit na koncentraci 10  $\mu\text{M}$ , tzn. k 5  $\mu\text{l}$  100 $\mu\text{M}$  roztoku primeru bylo přidáno 45  $\mu\text{l}$  sterilní deionizované vody.

#### 4.1.2 Polymerasová řetězová reakce

Metoda polymerasové řetězové reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction) se používá k amplifikaci určitého úseku DNA. Daná sekvence je definována použitými primery.

Do 200  $\mu\text{l}$  PCR mikrozkušavky byly přidány následující reagenty:

- 0,5  $\mu\text{l}$  10x ředěného templátu (~0,05  $\mu\text{g}$  DNA)
  - 10  $\mu\text{l}$  pufru 5xQ5 HF Reaction Buffer
  - 10  $\mu\text{l}$  GC Enhanceru
  - 21  $\mu\text{l}$  sterilní vody
  - 5  $\mu\text{l}$  2 mM dNTP mixu
  - 1,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  přímého primeru
  - 1,5  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  zpětného primeru
  - 0,5  $\mu\text{l}$  Q5 HF DNA polymerasy
- 

$\Sigma$ 50  $\mu\text{l}$

Reakční směs byla umístěna do PCR termocykléru s následujícím nastavením amplifikačního programu:

- 1) počáteční denaturace DNA po dobu 30 s při 98  $^{\circ}\text{C}$
- 2) denaturační fáze po dobu 10 s při 98  $^{\circ}\text{C}$
- 3) hybridizační fáze po dobu 30 s při 58  $^{\circ}\text{C}$
- 4) elongační fáze po dobu 30-50 s při 72  $^{\circ}\text{C}$

Poté se cyklus 30krát opakoval od fáze 2) po fázi 4).

- 5) 10 min při 72 °C
- 6) ochlazení 5 min na 4 °C

Časové rozsahy elongační fáze jsou přizpůsobeny délce a složení daných DNA fragmentů a primerů. Vzorky po PCR byly dále zpracovány nebo uloženy při –20 °C.

#### **4.1.3 Elektroforéza v agarosovém gelu**

Byl připraven 0,8–2% (w/v) agarosový gel rozpuštěním agarosy v TBE pufru a přidáním ethidiumbromidu do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml. Gel byl nalit do připravené vaničky s hřebenem. Ke vzorkům po PCR amplifikaci bylo přidáno 10 µl vzorkového pufru. λ DNA štěpená restriční endonukleasou PstI byla použita jako velikostní marker.

Po ztuhnutí gelu byl hřeben vytažen a gel vložen do aparatury na gelovou elektroforézu naplněnou TBE puftrem. Do první jamky bylo nanášeno 20 µl λ DNA markeru. Do následujících dvojic jamek bylo postupně aplikováno 30 µl jednotlivých vzorků DNA. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 40 minut. Jednotlivé rozdělené fragmenty DNA s interkalovaným ethidiumbromidem byly po ukončení vizualizovány pomocí UV transiluminátoru.

#### **4.1.4 Izolace PCR fragmentů z gelu**

Po vizualizaci byly jednotlivé DNA fragmenty z gelu vyříznuty skalpelem a izolovány pomocí soupravy Monarch® DNA Gel Extraction Kit, jejíž součástí byly použité roztoky. K vyříznutým vzorkům DNA bylo přidáno 800 µl rozpouštěcího pufru (Gel Dissolving Buffer) a směs byla do rozpuštění inkubována na třepačce při 55 °C po dobu 15 minut. Po rozpuštění a ochlazení na pokojovou teplotu byla směs přenesena na kolonku s fritou ústící do sběrné zkumavky. Zkumavky byly centrifugovány 30 sekund při 4 000× g a poté 1 minutu při 16 000× g. Roztok ze sběrné zkumavky byl vylit a fritu 2x promyta nanášením 200 µl promývacího pufru (DNA Wash Buffer) a centrifugací 1 minutu při 16 000× g. Následně byla promytá kolonka s fritou umístěna do nové sterilní mikrozukavky bez víčka. Na fritě zachycená DNA byla 1 minutu inkubována se 30 µl elučního pufru (DNA Elute Buffer) předehřátého na 55 °C. Po inkubaci proběhla centrifugace 1 min při 16 000× g a eluát s izolovanými fragmenty DNA byl přemístěn do sterilní mikrozukavky s víčkem. Izolované fragmenty byly uchovávány v chladu při –20 °C.

#### 4.1.5 Štěpení a defosforylace plasmidů

Pro přípravu štěpených a defosforylovaných vektorů byly použity plasmidy: pT7-*hlyC-hlyA*-dH, pKNT25, pKT25, pUT18 a pUT18C.

Do sterilní mikrozkušavky Eppendorf byly přidány jednotlivé reagenty štěpící směsi:

- 5  $\mu$ l DNA plasmidu (0,5  $\mu$ g DNA)
  - 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného CutSmart pufru
  - 12  $\mu$ l sterilní vody
  - 0,5  $\mu$ l restriční endonukleasy I
  - 0,5  $\mu$ l restriční endonukleasy II
- 

$\Sigma$ 20  $\mu$ l

Mikrozkušavky byly umístěny na 1 hodinu do vodní lázně s teplotou 37 °C a rozštěpené plasmidy byly následně defosforylovány přidáním 1  $\mu$ l fosfatasy QuickCIP. Směs byla inkubována dalších 10 minut ve vodní lázni při 37 °C. Po přidání 5  $\mu$ l vzorkového pufru byla následně provedena elektroforéza v agarosovém gelu (kapitola 4.1.3). Vyříznutý defosforylovaný linearizovaný plasmid byl izolován pomocí sady Monarch DNA Gel Extraction Kit (kapitola 4.1.4).

#### 4.1.6 Štěpení DNA fragmentů

Připravené PCR fragmenty byly před vložením do štěpeného a defosforylovaného plasmidu štěpeny příslušnými restričními endonukleasami. Štěpící směs se skládá z:

- 10  $\mu$ l PCR fragmentu
  - 4  $\mu$ l 10x koncentrovaného CutSmart pufru
  - 24  $\mu$ l sterilní vody
  - 1  $\mu$ l restriční endonukleasy I
  - 1  $\mu$ l restriční endonukleasy II
- 

$\Sigma$ 40  $\mu$ l

Takto vzniklý mix s výsledným objemem 40  $\mu$ l byl inkubován ve vodní lázni při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Po přidání 8  $\mu$ l vzorkového pufru byla provedena elektroforéza v agarosovém gelu, z něhož byly štěpené PCR fragmenty vyříznuty a opět izolovány pomocí soupravy Monarch DNA Gel Extraction Kit (kapitoly 4.1.3 a 4.1.4).

#### 4.1.7 Ligace štěpených DNA fragmentů a plasmidové DNA

Pro vložení štěpeného PCR fragmentu do štěpeného a defosforylovaného plasmidu byl použit Quick Ligation™ Kit. Do mikrozkušavky bylo přidáno:

- 2 µl štěpeného a defosforylovaného plasmidu
  - 8 µl štěpeného PCR fragmentu
  - 15 µl ligačního pufru (Quick Ligation Buffer)
  - 3,5 µl sterilní vody
  - 1,5 µl DNA ligasy (Quick Ligase)
- 

Σ30 µl

Ligační směs s objemem 30 µl byla inkubována při pokojové teplotě 10 minut a následně transformována do bakterií *E. coli* XL1-Blue nebo uchována při teplotě -20 °C. Zároveň byla pro kontrolu efektivity připravena i negativní kontrola, při které bylo do ligační směsi místo štěpeného PCR fragmentu přidáno 8 µl sterilní vody.

#### 4.1.8 Transformace plasmidové DNA do kmene *E. coli* XL1-Blue

K 15 µl ligační směsi bylo přidáno 150 µl kompetentních buněk *E. coli* XL1-Blue a směs byla ponechána 10 minut na ledu. Byl proveden tepelný šok umístěním zkumavek do vodní lázně o teplotě 37 °C na 5 minut a následně opět zchlazením na ledu na 5 minut. Poté byl k buňkám přidán 1 ml LB média a směs byla ponechána ve vodní lázni při teplotě 37 °C na 90 minut. Po transformaci bylo 100 µl bakteriální suspenze rozetřeno na LB agarové plotny s přídatkem ampicilinu s výslednou koncentrací 150 µg/ml nebo kanamycinu s koncentrací 50 µg/ml, dle příslušného plasmidu.

Zbytek bakteriální suspenze po transformaci byl centrifugován 1 minutu při 16 000× g. Supernatant byl odstraněn tak, aby zůstatek objemu činil přibližně 100 µl, v kterém byl buněčný pelet následně resuspendován a rozetřen na LB agarové plotny s příslušnými antibiotiky. Plotny byly následně inkubovány v invertované poloze přes noc při 37 °C.



#### **4.1.9 Minipreparace plasmidové DNA**

Den předem byly do skleněných kultivačních zkumavek přidány 2 ml tekutého LB média s přídatkem příslušného antibiotika, ampicilinu (150 µg/ml) nebo kanamycinu (50 µg/ml). Po transformaci bylo z každé plotny zaočkováno 6 zkumavek, vždy jednou bakteriální kolonií. Vzorke byly inkubovány na třepačce v šikmé poloze přes noc při 37 °C.

Noční kultury byly centrifugovány v mikrozkuvkách Eppendorf po dobu 1 minuty při 16 000× g a supernatant byl následně odstraněn. K minipreparaci plasmidové DNA byla použita souprava Monarch® Plasmid Miniprep Kit, která obsahovala použité roztoky. Peleta byla resuspendována ve 200 µl suspenzního pufru (Resuspension Buffer). Následně byly buňky lyzovány přidáním 200 µl lyzačního pufru (Lysis Buffer), promíchány inverzí a inkubovány 1 minutu. Po neutralizaci a vysrážení proteinů bylo přidáno 400 µl neutralizačního pufru (Neutralization Buffer). Směs byla míchána inverzí až do zneutralizování celého objemu a inkubována 1 minutu. Následně byla provedena 7minutová centrifugace při 16 000× g a supernatant byl převeden pomocí pipety na kolonku s fritou ústící do sběrné nádoby. Zkumavky byly centrifugovány 30 sekund při 4 000× g a následně 1 minutu při 16 000× g. Poté byly kolonky promyty nejprve 200 µl promývacího roztoku 1 (Wash Buffer 1) a pak 400 µl promývacího roztoku 2 (Wash Buffer 2). Po každém promytí byly zkumavky centrifugovány 1 minutu při 16 000× g a obsah sběrné nádoby odstraněn. Kolonky s fritou byly přemístěny do sterilní mikrozkuvky bez uzávěru. Zachycená plasmidová DNA byla inkubována po dobu 1 minuty se 40–50 µl zahřátého elučního pufru a následně z kolonky eluována centrifugací po dobu 1 minuty při 16 000× g. Eluát s plasmidovou DNA byl přemístěn do nové sterilní mikrozkuvky a uložen při –20 °C.

#### **4.1.10 Ověření plasmidové DNA**

Ověření správnosti připravených konstruktů bylo nejprve provedeno analýzou pomocí restrikčních endonukleas a následně sekvenováním.

##### **4.1.10.1 Štěpení pomocí restrikčních endonukleas**

Analýzou pomocí restrikčních endonukleas byla ověřena správnost vnesení DNA fragmentu do plasmidové DNA. V případě mutagenese byly ověřeny i vnesené tiché mutace.

Do mikrozkušavky bylo přidáno:

- 5  $\mu$ l plasmidové DNA (~0,5  $\mu$ g)
- 2  $\mu$ l 10x koncentrovaného CutSmart pufru
- 12  $\mu$ l sterilní vody
- 0,5  $\mu$ l restriční endonukleasy I
- 0,5  $\mu$ l restriční endonukleasy II

---

$\Sigma$ 20  $\mu$ l

Pro jednotlivé konstrukty byly zvoleny vhodné dvojice restričních endonukleas a směs byla inkubována 1 hodinu ve vodní lázni při teplotě 37 °C. Následně byla štěpená plasmidová DNA dělena elektroforézou v agarosovém gelu (kapitola 4.1.3), která umožnila na základě velikosti vzniklých DNA fragmentů určit, zda byl daný plasmidový konstrukt připraven správně.

#### 4.1.10.2 Sekvence

Do mikrozkušavky bylo přidáno 5  $\mu$ l plasmidové DNA o koncentraci 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l a 5  $\mu$ l 5  $\mu$ M primeru. Vzorke byly odeslány k sekvenování firmou Eurofins Genomic, Ebersberg, Německo.

## 4.2 Cílená mutagenese

K zavedení specifických bodových mutací v genu kódujícím acyltransferasu HlyC byla použita metoda kombinované PCR mutagenese.

### 4.2.1 Kombinovaná PCR mutagenese

V prvním kroku byla provedena PCR reakce podle postupu uvedeného v kapitole 4.1.2. Jako templát byl použit plasmid pT7-*hlyC-hlyA*-dH nesoucí gen *hlyC* kódující intaktní acyltransferasu HlyC. Požadovaná bodová mutace byla do genu *hlyC* zavedena pomocí komplementárních mutagenních primerů tak, aby vznikly dva částečně se překrývající fragmenty A a B. Primery použité pro jednotlivé mutace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5, str. 43). Výsledné fragmenty A a B byly separovány elektroforézou v agarosovém gelu a izolovány (kapitoly 4.1.3 a 4.1.4).

Tab. 5: Primery použité pro vytvoření bodových mutací v genu *hlyC*.

Mutace v <i>hlyC</i>	Primery		
	Fragment A	Fragment B	Fragment C
R49A	SapIFor, hlyC-R49Arev	hlyC-R49Afor, HindIIIRev	SapIFor, HindIIIRev
K105A	SapIFor, hlyC-K105Arev	hlyC-K105Afor, HindIIIRev	SapIFor, HindIIIRev
R108A	SapIFor, hlyC-R108Arev	hlyC-R108Afor, HindIIIRev	SapIFor, HindIIIRev
R120A	SapIFor, hlyC-R120Arev	hlyC-R120Afor, HindIIIRev	SapIFor, HindIIIRev
K129A	SapIFor, hlyC-K129Arev	hlyC-K129Afor, HindIIIRev	SapIFor, HindIIIRev

Ve druhém kroku následovala PCR reakce s použitím fragmentů A a B jako templátů, přičemž reakční směs obsahovala:

- 5 µl fragmentu A
- 5 µl fragmentu B
- 10 µl pufru 5xQ5 HF Reaction Buffer
- 10 µl GC Enhanceru
- 11 µl sterilní vody
- 5 µl 2 mM dNTP mixu
- 1,5 µl 10 µM přímého primeru
- 1,5 µl 10 µM zpětného primeru
- 1 µl Q5 HF DNA polymerasy

---

Σ50 µl

Po provedení druhé PCR byl získán výsledný fragment C se zavedenou bodovou mutací. Jednotlivé primery pro dané mutace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 5).

#### 4.2.2 Vložení PCR fragmentů s mutacemi do původních plasmidů

Výsledné PCR fragmenty C s vnesenými bodovými mutacemi byly separovány elektroforézou v agarosovém gelu. Fragmenty odpovídající velikosti 1793 bp byly vyříznuty a izolovány (kapitoly 4.1.3, 4.1.4)

Izolované fragmenty DNA kódující jednotlivé HlyC mutantní varianty byly štěpeny restrikcími endonukleasami *SapI* a *HindIII-HF*. Původní plasmid pT7-*hlyC-hlyA*-dH byl štěpen stejnými restrikcími endonukleasami a následně defosforylován (kapitoly 4.1.5 a 4.1.6).

Štěpené PCR fragmenty byly opět děleny elektroforézou v agarosovém gelu (kapitola 4.1.3) a izolovány (kapitola 4.1.4). Následně byly ligovány s příslušným štěpeným

a defosforylovaným plasmidem. Ligační směsi byly transformovány (kapitola 4.1.8) do buněk *E. coli* kmene XL1-Blue, z nichž byla po noční kultivaci izolována plasmidová DNA (kapitola 4.1.9). Vnesení mutací do genu *hlyC* v jednotlivých plasmidových konstruktech bylo ověřeno analýzou pomocí restričních endonukleas (Tab. 6) a sekvenováním (kapitoly 4.1.7 až 4.1.10). Takto byly získány plasmidy pT7-*hlyC*-R49A-*hlyA*-dH, pT7-*hlyC*-K105A-*hlyA*-dH, pT7-*hlyC*-R108A-*hlyA*-dH, pT7-*hlyC*-R120A-*hlyA*-dH a pT7-*hlyC*-K129A-*hlyA*-dH.

Tab. 6: Restriční endonukleasy použité pro ověření plasmidových konstruktů nesoucích gen *hlyC* s vnesenou bodovou mutací.

Plasmid ( <i>amp</i> ) <sup>1</sup>	Ověření klonovacích míst		Substituce – tichá mutace	
	Restriční endonukleasy	Délka [bp]	Restriční endonukleasy	Délka [bp]
pT7- <i>hlyC</i> -R49A- <i>hlyA</i> -dH	<i>SapI, HindIII-HF</i>	5016, 1775	<i>HpaI</i>	1169, 5622
pT7- <i>hlyC</i> -K105A- <i>hlyA</i> -dH	<i>SapI, HindIII-HF</i>	5016, 1775	<i>MluI</i>	4223, 2568
pT7- <i>hlyC</i> -R108A- <i>hlyA</i> -dH	<i>SapI, HindIII-HF</i>	5016, 1775	<i>ApaI, HpaI</i>	5788, 1003
pT7- <i>hlyC</i> -R120A- <i>hlyA</i> -dH	<i>SapI, HindIII-HF</i>	5016, 1775	<i>PvuI</i>	3694, 2040, 1057
pT7- <i>hlyC</i> -K129A- <i>hlyA</i> -dH	<i>SapI, HindIII-HF</i>	5016, 1775	<i>NcoI</i>	4267, 2524

<sup>1</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu.

## 4.3 BACTH systém

### 4.3.1 Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů

Pro testování interakcí proteinů v BACTH systému bylo nejprve nutné fúzovat gen *hlyC*, resp. DNA segment kódující fragment HlyA nesoucí zbytky 535–719 (HlyA<sub>535-719</sub>) s DNA sekvencemi kódujícími fragmenty T25, resp. T18 katalytické AC domény. Gen *hlyC* tak byl vložen do plasmidů pKNT25 a pKT25, zatímco DNA segment pro HlyA<sub>535-719</sub> do plasmidů pUT18 a pUT18C, které byly součástí soupravy od firmy EUROMEDEX (Paříž, Francie). Tyto plasmidy obsahují sekvence DNA, které kódují fragment katalytické domény T25, resp. T18, s MCS na jejich 3'- nebo 5'-konci (kapitola 3.2.3).

#### 4.3.1.1 Geny kódující HlyC a fragment HlyA

Gen *hlyC* a DNA segment kódující fragment HlyA<sub>535-719</sub> byly amplifikovány z plasmidu pT7-*hlyC*-*hlyA*-dH (templát) metodou PCR (kapitola 4.1.2) s použitím primerů uvedených v tabulce (Tab. 7, str. 45).

Tab. 7: Primery použité k amplifikaci příslušných PCR fragmentů spolu s délkou fragmentů a jejich výslednou orientací v plasmidu.

Fragment	Výsledná orientace	Přímý primer	Zpětný primer	Délka [bp]
F1 ( <i>hlyC</i> )	5'-konec T25	HindIII- <i>hlyC</i> -For	SacI- <i>hlyC</i> -Rev	533
F2 ( <i>hlyC</i> )	3'-konec T25	PstI- <i>hlyC</i> -For	KpnI- <i>hlyC</i> -Rev	533
F3 ( <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> )	5'-konec T18	HindIII- <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> -For	SacI- <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> -Rev	578
F4 ( <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> )	3'-konec T18	BamHI- <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> -For	KpnI- <i>hlyA<sub>535-719</sub></i> -Rev	578

PCR fragmenty byly separovány elektroforézou v 1,5% agarosovém gelu, vyříznuty a izolovány pomocí soupravy pro izolaci DNA (kapitoly 4.1.3 a 4.1.4). PCR fragmenty byly následně štěpeny restričními endonukleasami (Tab. 8), separovány elektroforézou a znovu izolovány (kapitoly 4.1.3, 4.1.4 a 4.1.6).

Takto připravené PCR fragmenty byly vloženy do příslušných plasmidů BACTH systému (pro zjednodušení označených jako V1 – V4), které byly štěpeny stejnými restričními endonukleasami (Tab. 8) jako kompatibilní PCR fragmenty, následně defosforylovány, separovány agarosovou elektroforézou v 0,8% gelu a izolovány (kapitoly 4.1.3 až 4.1.5).

Tab. 8: Dvojice restričních endonukleas pro štěpení fragmentů po PCR amplifikaci (F1 – F4) a plasmidů do BACTH systému (V1 – V4) s příslušnou rezistencí k antibiotikům. V tabulce je rovněž uvedena výsledná délka fragmentů po štěpení. V řádcích jsou vedle sebe uvedeny kompatibilní dvojice fragment – plasmid pro následnou ligaci.

PCR fragment	Restriční endonukleasy	Délka [bp]	Plasmid (Atb rezistence) <sup>1</sup>	Restriční endonukleasy	Délka [bp]
F1	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523	V1 – pKNT25 (kan)	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF, CIP	3420
F2	<i>PstI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF	519	V2 – pKT25 (kan)	<i>PstI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF, CIP	3414
F3	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	568	V3 – pUT18 (amp)	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF, CIP	2974
F4	<i>BamHI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF	568	V4 – pUT18C (amp)	<i>BamHI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF, CIP	3004

<sup>1</sup>Plasmidy obsahují gen pro rezistenci voči příslušnému antibiotiku uvedenému v závorce.

Štěpené PCR fragmenty byly ligovány s odpovídajícími štěpenými a defosforylovanými plasmidy (kapitola 4.1.7). Poté byly ligační směsi transformovány do buněk *E. coli* XL1-Blue, které byly následně kultivovány na plotnách s obsahem příslušného antibiotika (kapitola 4.1.8). Plasmidy kódující fragment T25 katalytické AC domény nesou rezistenci ke kanamycinu jako selektivnímu markeru a plasmidy kódující fragment T18 naopak dodávají bakteriím rezistenci k ampicilinu. Po noční kultivaci byly z jednotlivých bakteriálních kolonií na plotně zaočkovány malé kultury

pro izolaci plasmidové DNA. Pro každý typ konstruktů bylo připraveno šest kultur, z nichž byla pomocí soupravy Monarch® Plasmid Miniprep Kit izolována plasmidová DNA, jejíž správnost byla ověřena analýzou pomocí restrikčních endonukleas podle tabulky (Tab. 9). Z každého konstruktů byla vybrána jedna správná varianta a odeslána k sekvenování (kapitoly 4.1.8 až 4.1.10).

Tab. 9: Výsledné plasmidy do BACTH systému kódující T25 a T18 fragmenty katalytické AC domény fúzané s testovanými proteiny. Tabulka obsahuje jednotlivé dvojice štěpeného a defosforylovaného plasmidu se štěpeným PCR fragmentem, které byly ligovány. V druhé polovině tabulky jsou uvedeny použité restrikční endonukleasy pro ověření správnosti výsledných konstruktů.

Plasmid (Atb rezistence) <sup>1</sup>	Fragment	Plasmid	Restrikční endonukleasy	Délka [bp]	Restrikční endonukleasy	Délka [bp]
			Ověření klonovacích míst		Ověření insertu	
pKN- <i>hlyC</i> -T25 (kan)	F1	V1	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>BsrGI</i> , <i>NcoI</i>	1626, 2317
pKT25- <i>hlyC</i> (kan)	F2	V2	<i>PstI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF	519, 3414	<i>BsrGI</i> , <i>NcoI</i>	850, 3084
pU- <i>hlyA535-719</i> -T18 (amp)	F3	V3	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	568, 2974	<i>SphI</i> , <i>ScaI</i> -HF	1612, 1930
pUT18C- <i>hlyA535-719</i> (amp)	F4	V4	<i>BamHI</i> -HF, <i>KpnI</i> -HF	568, 3004	<i>SphI</i> , <i>ScaI</i> -HF	1090, 2482

<sup>1</sup>Plasmidy obsahují gen pro rezistenci vůči příslušnému antibiotiku uvedenému v závorce.

#### 4.3.1.2 Mutantní varianty genu kódujícího acyltransferasu HlyC

Obdobně byly připraveny plasmidy pro BACTH systém nesoucí geny *hlyC* se zavedenými bodovými mutacemi. Mutované sekvence genu *hlyC* byly fúzovány s 5'-koncem DNA sekvence kódující fragment T25 katalytické AC domény v plasmidu pKNT25. Tato orientace byla zvolena experimentálně (viz výsledky kapitola 5.1).

Stejně jako u původního genu *hlyC* byly připravené mutantní varianty nejprve amplifikovány pomocí PCR. Pro mutantní varianty *hlyC* byl jako přímý primer použit *HindIII*-*hlyC*-For a jako zpětný primer *SacI*-*hlyC*-Rev (kapitola 4.1.2). Výsledné fragmenty v délce 533 bp byly separovány pomocí agarosové elektroforézy, izolovány a následně štěpeny restrikčními endonukleasami *HindIII*-HF a *SacI*-HF (kapitoly 4.1.3, 4.1.4 a 4.1.6). Separované a izolované PCR fragmenty byly poté ligovány s plasmidem V1, štěpeným stejnými restrikčními endonukleasami *HindIII*-HF a *SacI*-HF (kapitoly 4.1.5 a 4.1.7). Výsledné připravené plasmidy s kanamycinovou rezistencí pro BACTH systém jsou pKN-*hlyC*-R49A-T25, pKN-*hlyC*-K105A-T25, pKN-*hlyC*-R108A-T25, pKN-*hlyC*-R120A-T25 a pKN-*hlyC*-K129A-T25. Tyto plasmidy byly následně transformovány do buněk *E. coli* XL1-Blue, z nichž byla po noční kultivaci izolována

plasmidová DNA. Správnost plasmidů byla ověřena analýzou pomocí restrikčních endonukleas (Tab. 10) a sekvenováním (kapitoly 4.1.8 až 4.1.10).

Tab. 10: Použité restrikční endonukleasy pro ověření plasmidových konstruktů pro BACTH systém se substitucemi v genu *hlyC*.

Plasmid ( <i>kan</i> ) <sup>1</sup>	Ověření klonovacích míst		Ověření insertu	
	Restrikční endonukleasy	Délka [bp]	Restrikční endonukleasy	Délka [bp]
<b>pKN-<i>hlyC</i>-R49A-T25</b>	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>HpaI</i> , <i>NcoI</i>	1794, 2149
<b>pKN-<i>hlyC</i>-K105A-T25</b>	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>MluI</i> , <i>NcoI</i>	1623, 2320
<b>pKN-<i>hlyC</i>-R108A-T25</b>	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>ApaI</i> , <i>NcoI</i>	1628, 2315
<b>pKN-<i>hlyC</i>-R120A-T25</b>	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>PvuI</i> , <i>NcoI</i>	1578, 2365
<b>pKN-<i>hlyC</i>-K129A-T25</b>	<i>HindIII</i> -HF, <i>SacI</i> -HF	523, 3420	<i>NcoI</i>	1535, 2408

<sup>1</sup>Plasmidy obsahují gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

#### 4.3.2 Kotransformace plasmidů do kmene *E. coli* BTH101

K 20 µl kompetentních buněk *E. coli* kmene BTH101 bylo přidáno po 100 ng příslušných plasmidů. Směs byla ponechána na ledu po dobu 15 minut. Umístěním mikrozkuvek do vodní lázně při teplotě 37 °C na 5 minut a následným zchlazením na ledu na 2 minuty byl proveden tepelný šok. Poté bylo k buňkám přidáno 980 µl přehřátého LB média a mikrozkuvky byly následně umístěny zpět do vodní lázně na 2 hodiny. Během inkubace byly připraveny plotny, k čemuž byl použit MacConkey agar, ke kterému byla před nalitím ploten přidána maltosa (výsledný 1% roztok), 100 mM IPTG (na výsledných 0,5 mM) a obě antibiotika – ampicilin (výsledná koncentrace 100 µg/ml) a kanamycin (50 µg/ml). Po kotransformaci bylo 10 µl bakteriální suspenze vyředěno 90 µl tekutého LB média a celý tento objem byl nanesen na připravené MacConkey plotny. Plotny byly následně inkubovány 3 dny v invertované poloze při teplotě 30 °C. Podle zabarvení selektivního média byla poté vyhodnocena interakce daných kombinací fúzních proteinů produkovaných transformovanými buňkami.

#### 4.3.3 Stanovení enzymové aktivity β-galaktosidasy

Den předem byl do plastových zkuvek s 2,5 ml tekutého LB média a s přídatkem IPTG (0,5mM), ampicilinu (100 µg/ml) a kanamycinu (50 µg/ml) pomocí očka zaočkován sěr 3 kolonií. Z každé plotny byly, ze tří různých míst plotny připravené

tři nezávislé vzorky (triplikáty). Zároveň s kulturami byl připraven i kontrolní vzorek 1 obsahující pouze 2,5 ml LB média s antibiotiky a IPTG. Inokulované kultury byly kultivovány na třepačce ve 30 °C přes noc. Druhý den byly do 50ml zkumavek s otvory ve víčku, kvůli odpaření toluenu, přidány 2 ml média M63 a 0,5 ml noční kultury zamíchané pomocí vortexu. Přidáním 30 µl toluenu a 30 µl 0,1% roztoku SDS byly bakteriální buňky permeabilizovány. Zkumavky s promíchanou směsí byly umístěny na třepačku ve 37 °C na 30 minut. Mezitím byl změřen nárůst jednotlivých triplicátů vzorků nočních kultur. K 0,5 ml noční kultury bylo přidáno 1,5 ml LB média a následně byla změřena optická denzita při 600 nm ( $OD_{600}$ ) proti kontrolnímu vzorku 1. Po uplynutí 30 minut byl do nových plastových zkumavek přenesen objem 0,3 ml permeabilizovaných buněk a 0,7 ml PM2 pufru s přídavkem  $\beta$ -merkapt ethanolu o výsledné koncentraci 0,1 M. Simultánně byl připraven také kontrolní vzorek 2 obsahující 1 ml PM2 pufru, s kterým byla též provedena následující reakce. Zkumavky i roztok ONPG substrátu byly na 5 minut umístěny do vodní lázně a temperovány na 28 °C, což je optimální teplota pro průběh  $\beta$ -galaktosidasové reakce. Samotná reakce byla zahájena přidáním 0,25 ml 0,4% roztoku ONPG v PM2 pufru do roztoku permeabilizovaných buněk v PM2 pufru. Po zabarvení reakční směsi do žluta (1 minuta), byla reakce zastavena změnou pH, tedy přidáním 0,5 ml 1M  $Na_2CO_3$ . Následně byla pomocí spektrofotometru změřena absorbance při 420 nm ( $A_{420}$ ) proti kontrolnímu vzorku 2.

Výsledná enzymová aktivita,  $A$  [units/ml] byla vypočtena pro každý vzorek pomocí následujícího vzorce:

$$A = 200 \cdot \frac{A_{420}}{\text{doba inkubace}} \cdot \text{\textit{\textit{ředící faktor}}} \quad [1]$$

Jedna jednotka aktivity  $\beta$ -galaktosidasy odpovídá 1 nmol hydrolyzovaného ONPG za minutu při 28 °C. Faktor 200 ve výše uvedeném vzorci [1] je převrácená hodnota absorpčního koeficientu o-nitrofenolu, což je 0,005 nmol/ml při pH 11,0 (tj. po přidání  $Na_2CO_3$ ).

Výsledky jsou obecně uvedeny v jednotkách units/mg suché hmotnosti bakterií, která se určí z optické denzity bakteriální kultury při 600 nm, přičemž se bere v úvahu, že 1 ml kultury s  $OD_{600} = 1$  odpovídá 300 µg suché hmotnosti bakterií.<sup>44</sup>



## 5 Výsledky

### 5.1 Analýza interakcí HlyC s ACP

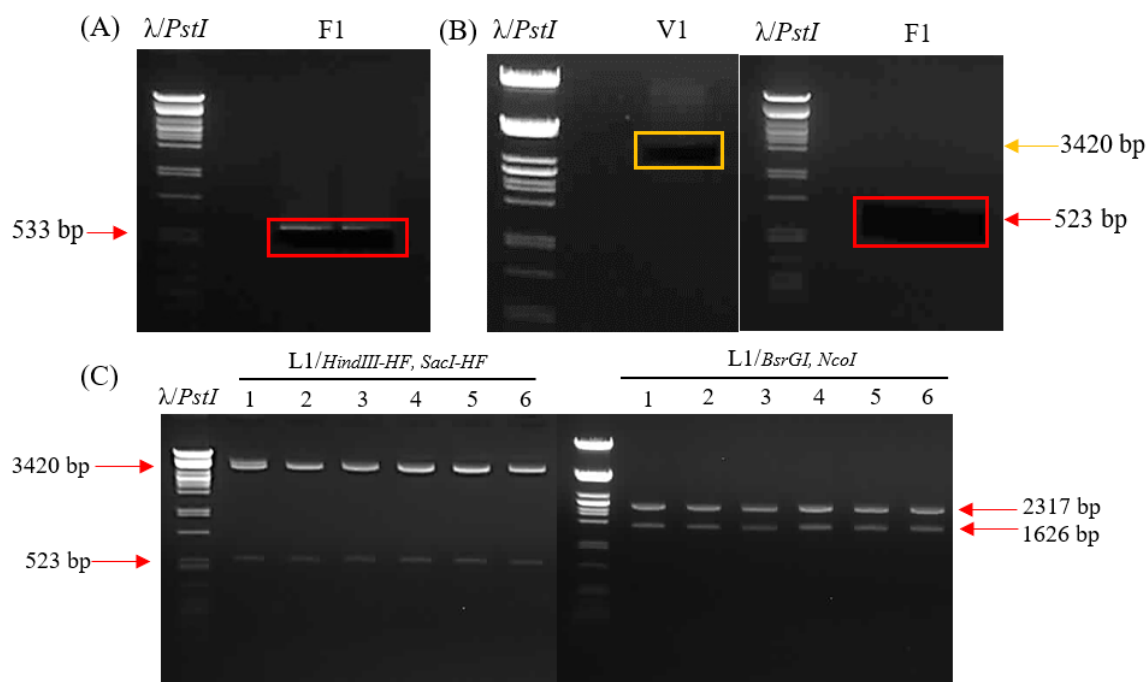
Na základě *in silico* interakčního modelu mezi proteiny HlyC a ACP, který byl sestaven z modelů struktur HlyC a ACP získaných pomocí programu AlphaFold2 (Dr. J. Černý, BTÚ AV ČR), byly vytipovány pozitivně nabitě zbytky v HlyC a negativně nabitě zbytky v ACP, které by spolu mohly interagovat a tvořit tak interakční rozhraní mezi HlyC a ACP. Před samotnou analýzou interakcí mezi mutantními variantami HlyC a ACP bylo nejdříve nezbytné otestovat, která z možných dvojic fúzních proteinů použitého BACTH systému vykazuje nejvyšší míru interakce. Testovány tak byly čtyři dvojice fúzních proteinů, v nichž HlyC byl fúzován k N- nebo C-konci fragmentu T25 a ACP k N- nebo C-konci fragmentu T18.

#### 5.1.1 Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů

Při přípravě fúzních variant HlyC s T25 byl gen *hlyC* kódující acyltransferasu HlyC vložen buď na 5'-konec, nebo 3'-konec DNA sekvence kódující fragment T25 v plasmidu pKNT25, resp. v plasmidu pKT25.

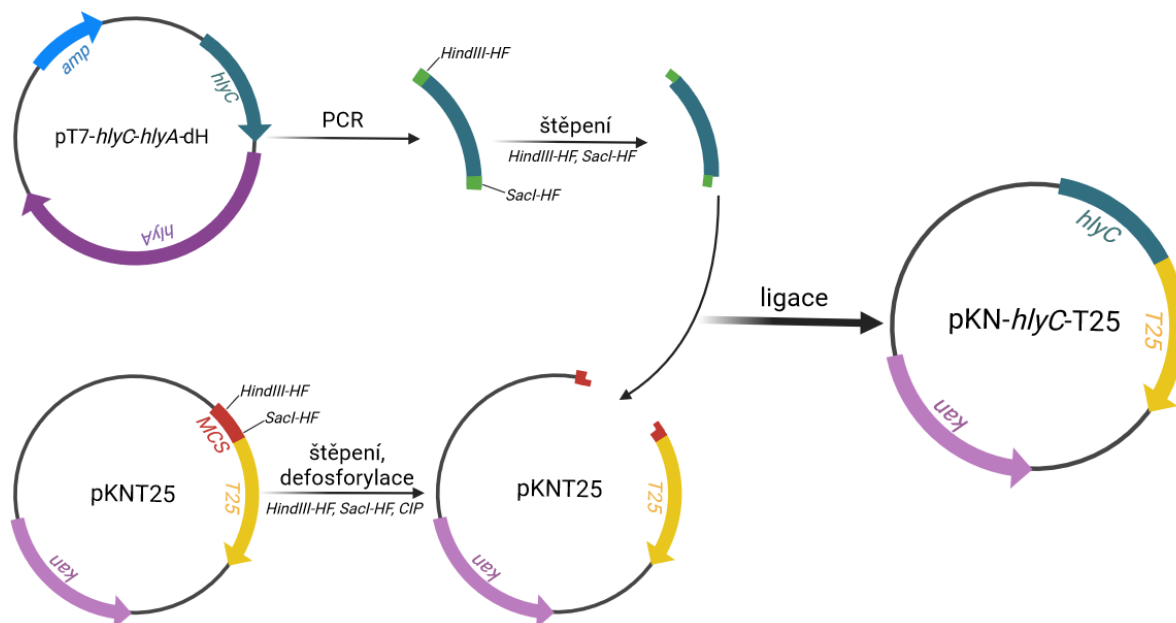
Prvním krokem byla PCR amplifikace genu *hlyC* z plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH. Vzniklé PCR fragmenty byly separovány elektroforézou v agarosovém gelu, vyříznuty (Obr. 16A, str. 50) a izolovány. Následně byly izolované PCR fragmenty štěpeny příslušnými restrikčními endonukleasami.

Pro vkládání PCR fragmentů do plasmidů pKNT25 a pKT25 byla využita jejich MCS, která byla štěpena vhodnými restrikčními endonukleasami a štěpené plasmidy byly navíc ještě defosforylovány. Štěpené PCR fragmenty a fragmenty plasmidů byly separovány elektroforézou v agarosovém gelu, vyříznuty (Obr. 16B, str. 50) a znovu izolovány.



Obr. 16: Jednotlivé agarosové gely získané v průběhu překlonoání genu *hlyC* na 5'-konec DNA segmentu kódujícího fragment T25 v plasmidu pKNT25. (A) Gel po vyříznutí PCR fragmentu se správnou velikostí 533 bp (červená šipka a rámeček). (B) Gel po vyříznutí fragmentu štěpeného restrikčními endonukleasami *HindIII-HF* a *SacI-HF* a defosforylovaného plasmidu pKNT25 (V1) s velikostí 3420 bp (žlutá šipka a rámeček) a štěpeného fragmentu *hlyC* stejnými restrikčními endonukleasami s velikostí 523 bp (červená šipka a rámeček). Na gelu (C) jsou fragmenty zkonstruovaných plasmidů (1–6) po štěpení restrikčními endonukleasami. Na levém gelu byla za pomoci restrikčních endonukleas *HindIII-HF* a *SacI-HF* overěna klonovací místa použitá při konstrukci plasmidu. Správné velikosti 3420 a 523 bp po štěpení jsou označeny červenými šipkami. Na pravém gelu byl overěn insert s použitím restrikční endonukleasy *BsrGI* a *NcoI*. Správné fragmenty mají velikost 2317 a 1626 bp. K porovnání velikostí byla použita  $\lambda$  DNA štěpená restrikční endonukleasou *PstI* ( $\lambda/PstI$ ).

Štěpené PCR fragmenty byly ligovány s odpovídajícími štěpenými fragmenty plasmidů a ligační směsi byly transformovány do buněk *E. coli* XL1-Blue, z jejichž kultur byla následně izolována plasmidová DNA. Správně zkonstruované plasmidy pak byly vybrány na základě analýzy pomocí restrikčních endonukleas (Obr. 16C) a výsledků sekvenování. Jako příklad výše zmíněného postupu je na obrázku (Obr. 17, str. 51) znázorněno schéma překlonoání genu *hlyC* na 5'-konec DNA sekvence kódujícího fragment T25 v plasmidu pKNT25. Příslušné fotografie agarosových gelů jsou pak uvedeny na obrázku (Obr. 16). Při přípravě dalších tří plasmidových konstruktů se postupovalo obdobným způsobem a schémata jejich přípravy ani fotografie agarosových gelů proto nejsou ukázány.



Obr. 17: Schéma překlonoání genu *hlyC* na 5'-konec DNA segmentu kódujícího fragment T25 v plasmidu pKNT25. Schéma bylo vytvořeno v programu BioRender.

Obdobně byl na 5'- i 3'-konec DNA sekvence kódující fragment T18 v rámci plasmidů pUT18 a pUT18C vložen gen kódující ACP. Tyto plasmidy pro BACTH systém kódující ACP byly v naší laboratoři již připraveny.

### 5.1.2 Testování interakcí fúzních proteinů

Pomocí BACTH systému byly testovány interakce čtyř možných kombinací fúzních proteinů produkovaných plasmidy, které byly zkonstruovány v předešlé kapitole. Jako negativní kontrola byly použity původní plasmidy exprimující fragmenty katalytické AC domény bez fúzovaných testovaných proteinů. Jako pozitivní kontrola byly použity plasmidy pKT25-Zip a pUT18C-Zip exprimující fúzní proteiny T25-LeuZip a T18-LeuZip.

Dvojice plasmidů produkujících fúzní proteiny byly kotransformovány do buněk *cya<sup>-</sup>* kmene *E. coli* BTH101. Každý z dvojice plasmidů nese rezistenci vůči jinému antibiotiku, a lze tak po kotransformaci na plotnách s obsahem obou antibiotik lehce selektovat kolonie bakterií, které přijaly oba plasmidy. Jednotlivé kombinace plasmidů a z nich exprimovaných testovaných fúzních proteinů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 11, str 52).

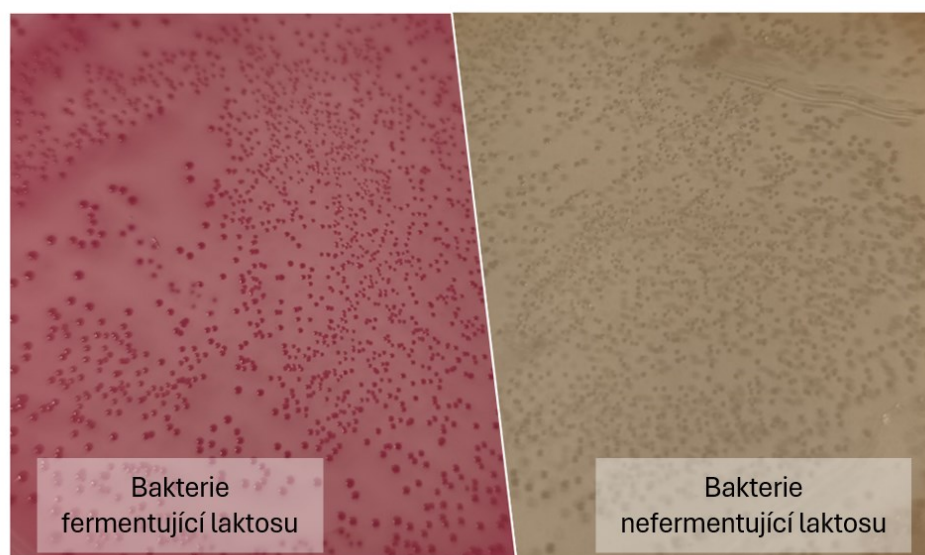
Tab. 11: **Kombinace fúzních proteinů, jejichž interakce byly analyzovány pomocí BACTH systému.** V tabulce jsou uvedeny dvojice testovaných fúzních proteinů a k nim příslušné plasmidy, které je kódují.

Konstrukt	Fúzní protein	Plasmid (kan) <sup>1</sup>	Fúzní protein	Plasmid (amp) <sup>2</sup>
<b>Kombinace</b>	<b>HlyC s ACP</b>			
	T25-HlyC	pKT25- <i>hlyC</i>	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	T25-HlyC	pKT25- <i>hlyC</i>	ACP-T18	pU- <i>acp</i> -T18
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	ACP-T18	pU- <i>acp</i> -T18
<b>Kombinace</b>	<b>Pozitivní kontrola</b>			
	T25-LeuZip	pKT25-Zip	T18-LeuZip	pUT18C-Zip
<b>Kombinace</b>	<b>Negativní kontrola (pozadí)</b>			
	T25-MCS	pKT25	T18-MCS	pUT18C
	T25-MCS	pKT25	MCS-T18	pUT18
	MCS-T25	pKNT25	T18-MCS	pUT18C
	MCS-T25	pKNT25	MCS-T18	pUT18

<sup>1</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

<sup>2</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu.

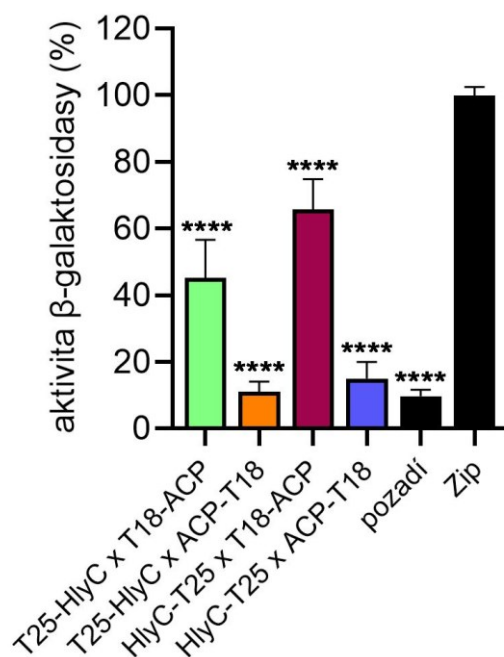
Suspenze kotransformovaných bakterií byly inokulovány na indikační plotny s MacConkey agarem. Po čtyřech dnech inkubace při teplotě 30 °C dosáhlo zbarvení indikačních ploten dostatečné intenzity pro vyhodnocení. Na plotnách s negativními kontrolami byly pozorovány bílé bakteriální kolonie a na plotnách s pozitivní kontrolou byly kolonie zbarveny červeně. Kontroly potvrdily správnost procesu. Na obrázku (Obr. 17, str. 53) jsou fotografie ploten s pozitivní a negativní kontrolou znázorňující rozdíly v zbarvení indikačních ploten při interagujících (pozitivní kontrola) a neinteragujících proteinech (negativní kontrola). U bakterií, v nichž dochází k interakci testovaných proteinů, se obnovuje AC aktivita a jsou proto schopny fermentovat laktosu, což vede k červenému zbarvení MacConkey agaru.



Obr. 18: **Fotografie indikačních ploten s MacConkey agarem s viditelnými bakteriálními koloniemi pozitivní (vlevo) a negativní (vpravo) kontroly.** Červeně zbarvené kolonie pozitivní kontroly (produkují interagující fúzní proteiny T25-LeuZip a T18-LeuZip) představují bakterie fermentující laktosu a naopak bílé kolonie jsou tvořeny bakteriemi neschopnými fermentace laktosu (negativní kontrola s neinteragujícími proteiny T25 a T18). Bakterie *E. coli* kmene BTH101 použité v BACTH systému postrádají AC enzym, a tudíž nefermentují laktosu. V případě interakce testovaných proteinů se u bakterií obnoví schopnost fermentace laktosu a barva indikačních ploten bude červená.

Při interakci HlyC s ACP došlo k dostatečnému pozitivnímu zbarvení kolonií pouze v případě kombinace fúzních proteinů T25-HlyC s T18-ACP a HlyC-T25 s T18-ACP (první a třetí orientace v tabulce (Tab. 11, str. 52)), a to až po čtyřech dnech. Bakterie produkující kombinaci T25-HlyC nebo HlyC-T25 s fúzním proteinem, v němž byl ACP fúzován s N-koncem fragmentu T18, tvořily bílé kolonie, a interakce na indikačních plotnách tedy nebyla pozorována.

Míra interakce fúzních proteinů byla následně kvantifikována měřením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy. Z jedné inokulované plotny byly stěrem ze tří různých míst připraveny tři různé vzorky pro měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy. Poté byla kotransformace a měření aktivity opakováno podruhé. Bylo tedy celkem provedeno 6 nezávislých měření. Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla stanovena měřením absorbance vzniklého o-nitrofenolu při 420 nm a pomocí vzorce [1] vyjádřena v jednotkách units/mg suché hmotnosti bakterií. Nakonec byly jednotlivé aktivity vyjádřeny v procentech vztažených vůči aktivitě pozitivní kontroly dané interakcí fúzních proteinů T25-LeuZip a T18-LeuZip (bráno jako 100 %) a vyneseny v grafu.



**Graf 1: Aktivita β-galaktosidasy po interakci mezi HlyC s ACP fúzovanými s T25, resp. T18.** Aktivita β-galaktosidasy pozitivní kontroly (interakce mezi fúzními proteiny s leucinovým zipem) byla vzata jako 100 %. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou a vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA; n=6; \*\*\*\* – p<0,0001).

Na grafu (Graf 1) vidíme, že výsledky měření aktivity β-galaktosidasy korelují s konečným zabarvením indikačních ploten. Pouze kombinace fúzních proteinů T25-HlyC s T18-ACP a HlyC-T25 s T18-ACP vykazují pozitivní interakce a zbývající dvě jsou na úrovni pozadí (negativní kontroly). Nejvyšší míru interakce HlyC s ACP vykazuje kombinace, v níž je HlyC fúzovaný s N-koncem fragmentu T25 a ACP s C-koncem fragmentu T18.

Tato kombinace fúzních proteinů (HlyC-T25 s T18-ACP) proto byla použita v další části práce pro přípravu a testování mutantních variant HlyC a ACP.

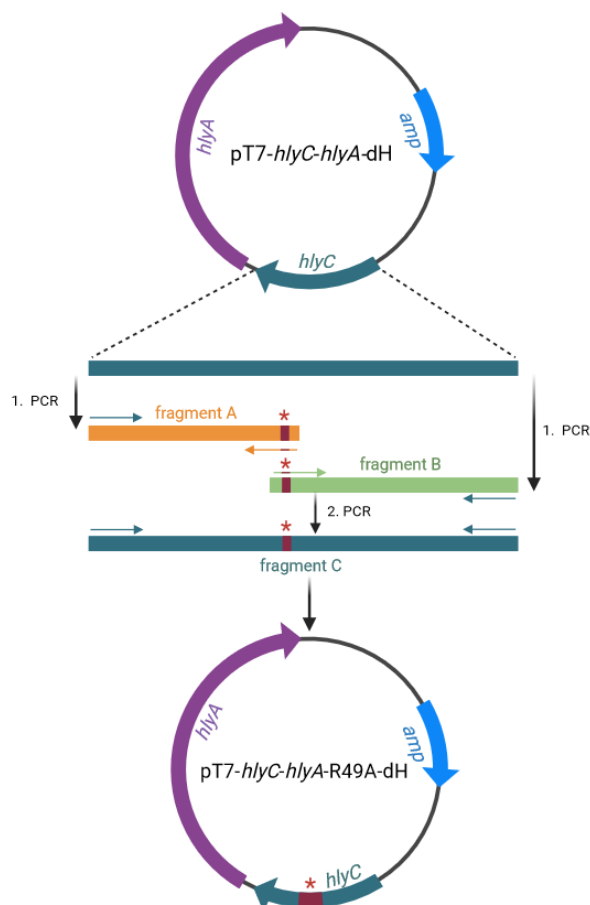
## 5.2 Příprava mutantních variant HlyC

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5.1, k vytipování klíčových zbytků zapojených do interakce HlyC s ACP byl při návrhu tohoto projektu použit interakční model sestavený ze struktur HlyC a ACP získaných pomocí programu AlphaFold2. Na základě tohoto modelu bylo identifikováno několik kladně nabitých argininových a lysinových zbytků v C-koncové části HlyC, které by mohly interagovat se záporně nabitými aspartátovými a glutamátovými zbytky proteinu ACP. Nejpravděpodobnějšími interakčními páry aminokyselinových zbytků proteinů HlyC a ACP jsou: R49–E61,

K105–D57, R108–E48, R120–D36 a K129–D39. Testování interakcí variant HlyC a ACP nesoucích substituce navržených zbytků je součástí širšího projektu laboratoře s názvem „Strukturní a funkční aspekty acylace RTX toxinů“.

V této části práce byly do genu *hlyC* vneseny mutace, které vedly k zavedení následujících substitucí do acyltransferasy HlyC: R49A, K105A, R108A, R120A a K129A.

Mutace byly vneseny do genu *hlyC* v plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH metodou kombinované PCR mutagenese. Reakce probíhala ve dvou krocích. V prvním kroku byl použit jako templát plasmid pT7-*hlyC-hlyA*-dH a byly amplifikovány dva fragmenty A a B. Ty se částečně překrývaly v místě bodové mutace, která byla zavedena na požadované místo pomocí dvojice mutagenních primerů. Ve druhém kroku byly jako templát PCR reakce použity fragmenty A a B se zavedenou mutací. Amplifikací pomocí vnějších primerů byl připraven fragment C o velikosti 1793 bp nesoucí požadovanou mutaci v genu *hlyC*. Schéma kombinované PCR metody pro vložení mutace do genu *hlyC* vedoucí k zavedení substituce R49A je znázorněno na obrázku (Obr. 19, str. 56). Ostatní substituce byly do genu *hlyC* zavedeny obdobným způsobem a schémata jejich přípravy proto nejsou ukázána.



Obr. 19: Schematické znázornění PCR mutagenese genu *hlyC* vedoucí k vnesení substituce **R49A** do **HlyC**. Krátké šipky znázorňují použité primery – SapIFor, HindIIIRev (modré), *hlyC*-R49Arev (oranžová) a *hlyC*-R49Afor (zelená). Kodon kódující mutovaný aminokyselinový zbytek má červenou barvu a v jednotlivých fragmentech je označen \*. Schéma bylo vytvořeno v programu BioRender.

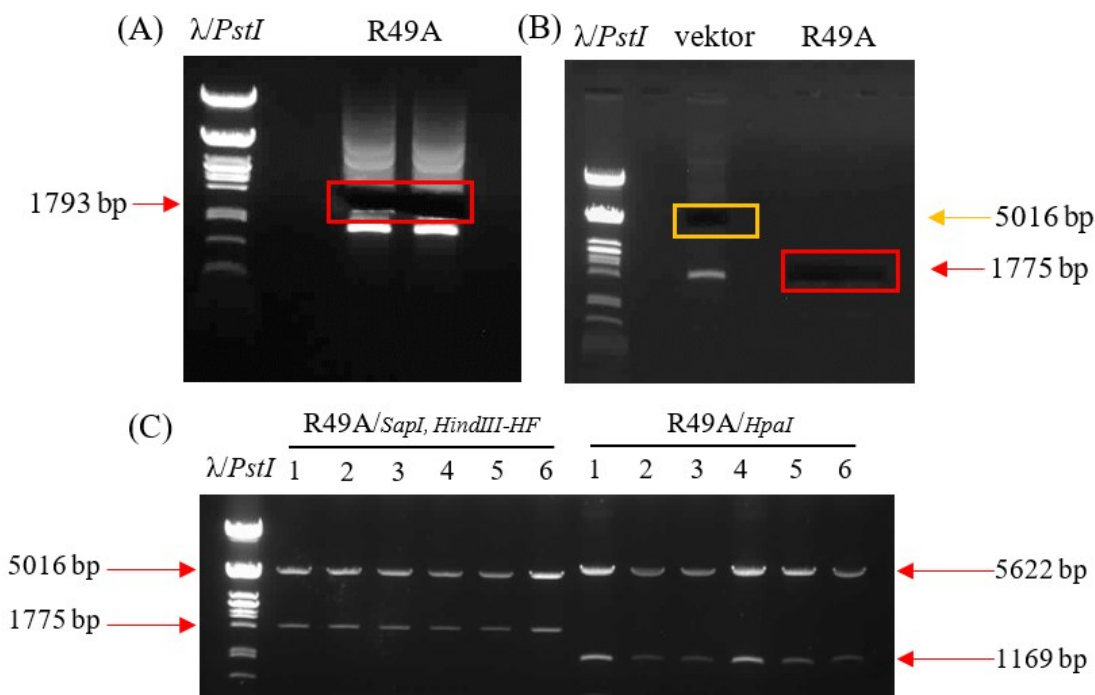
Přítomnost a velikost fragmentů C byla ověřena pomocí elektroforézy v agarosovém gelu, z něhož byly fragmenty se správnou velikostí vyříznuty (Obr. 20A, str. 57) a izolovány. Izolované fragmenty byly štěpeny restričními endonukleasami *HindIII-HF* a *SapI*.

Plasmid pT7-*hlyC-hlyA*-dH byl štěpen stejnými restričními endonukleasami, díky čemuž se z něj vyštěpila sekvence původního genu *hlyC*. Štěpený plasmid byl následně defosforylován a spolu se štěpenými fragmenty C separován elektroforézou v agarosovém gelu. Fragmenty C o velikosti 1775 bp a fragment plasmidu o velikosti 5016 bp byly vyříznuty (Obr. 20B, str. 57) a izolovány.

Následně byly štěpené PCR fragmenty C ligovány se štěpeným a defosforylovaným fragmentem plasmidu. Ligační směsi byly poté transformovány do buněk *E. coli* XL1-Blue, z jejichž kultur byla následně izolována plasmidová DNA.



Získané konstrukty plasmidů s bodovými mutacemi byly ověřeny analýzou pomocí restričních endonukleas (Obr. 20C) a sekvenováním. Výsledky sekvenování potvrdily správné vložení mutací do genu *hlyC*.



Obr. 20: Jednotlivé agarosové gely získané v průběhu mutagenese genu *hlyC* pro zavedení kodonu kódujícího substituci R49A. (A) Gel po vyříznutí PCR fragmentu C se správnou velikostí 1793 bp (červená šipka a rámeček). (B) Gel po vyříznutí fragmentu štěpeného a defosforylovaného plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH s velikostí 5016 bp (žlutá šipka a rámeček) a štěpeného fragmentu C s velikostí 1775 bp (červená šipka a rámeček). Na gelu (C) jsou fragmenty zkonstruovaných plasmidů (1–6) po štěpení restričními endonukleasami. V levé části gelu byla za pomoci restričních endonukleas *SapI* a *HindIII-HF* overěna klonovací místa použitá při konstrukci plasmidu. Správné velikosti 5016 a 1775 bp po štěpení jsou označeny červenými šipkami. V pravé části gelu je overěna vložená substituce s použitím restriční endonukleasy *HpaI*. Správné fragmenty mají velikost 5622 a 1169 bp. K porovnání velikostí byla použita  $\lambda$  DNA štěpená restriční endonukleasou *PstI* ( $\lambda PstI$ ).

## 5.3 Analýza interakcí mutovaných variant HlyC s ACP

### 5.3.1 Příprava plasmidů pro produkci fúzních proteinů

Analýza interakce různých kombinací fúzních proteinů HlyC s T25 a ACP s T18 ukázala, že k nejsilnější interakci mezi testovanými proteiny dochází, když je HlyC fúzován s N-koncem fragmentu T25 a ACP s C-koncem fragmentu T18 (kapitola 5.1.2). Proto byly mutantní varianty HlyC fúzovány na genetické úrovni s N-koncem fragmentu T25. K tomuto účelu byly DNA sekvence *hlyC* s jednotlivými bodovými mutacemi zkonstruovanými v plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH (kapitola 5.2) překlonoány na 5'-konec

DNA segmentu kódujícího fragment T25 v rámci plasmidu pKNT25. Tyto plasmidy pro expresi fúzních proteinů mutantních variant, HlyC<sub>MUT</sub>-T25, byly připraveny a ověřeny obdobně jako nemutovaná varianta HlyC-T25, dle postupu popsaného v kapitole 4.3.1.

### 5.3.2 Kvalitativní analýza interakcí

Takto připravené plasmidy exprimující varianty HlyC<sub>MUT</sub>-T25 byly postupně, v kombinaci s plasmidem exprimujícím fúzní protein T18-ACP, kotransformovány do bakterií *E. coli* kmene BTH101. Pro následné porovnání byly rovněž kotransformovány plasmidy exprimující původní nemutovaný fúzní protein HlyC-T25 a fúzní protein T18-ACP. Pro ověření postupu byla také připravena negativní a pozitivní kontrola. Všechny testované kombinace jsou uvedeny v tabulce (Tab. 12).

Tab. 12: **Kombinace mutantních variant HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP, jejichž interakce byly analyzovány pomocí BACTH systému.** V tabulce jsou uvedeny dvojice testovaných fúzních proteinů a k nim příslušné plasmidy, které je kódují. Pro srovnání a kontrolu byly také testovány interakce mezi nemutovaným fúzním proteinem HlyC-T25 a fúzním proteinem T18-ACP, pozitivní kontrola kódující fúze s leucinovým zipem a negativní kontrola bez fúzních proteinů.

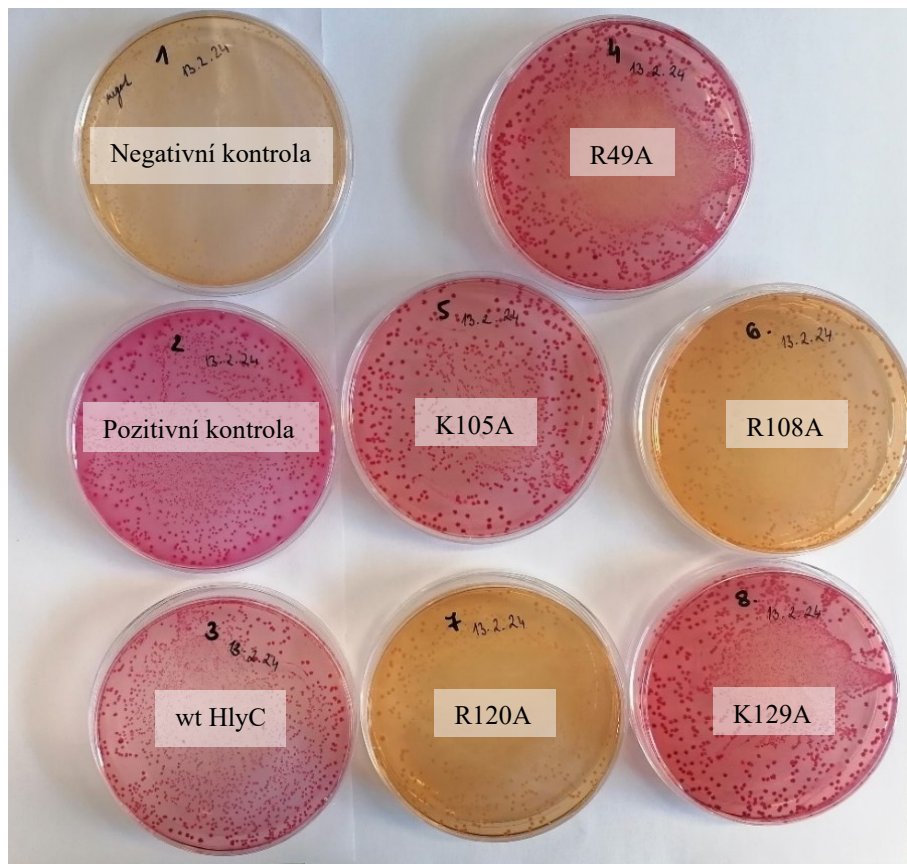
Konstrukt	Fúzní protein	Plasmid (kan) <sup>1</sup>	Fúzní protein	Plasmid (amp) <sup>2</sup>
<b>Kombinace</b>	<b>HlyC<sub>MUT</sub> s ACP</b>			
	HlyC-R49A-T25	pKN- <i>hlyC</i> -R49A-T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	HlyC-K105A-T25	pKN- <i>hlyC</i> -K105A-T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	HlyC-R108A-T25	pKN- <i>hlyC</i> -R108A-T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	HlyC-R120A-T25	pKN- <i>hlyC</i> -R120A-T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
	HlyC-K129A-T25	pKN- <i>hlyC</i> -K129A-T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>
<b>Kombinace</b>	<b>Kontroly</b>			
	T25-LeuZip	pKT25-Zip	T18-LeuZip	pUT18C-Zip
	MCS-T25	pKNT25	T18-MCS	pUT18C
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>

<sup>1</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

<sup>2</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu.

Pozorování interakcí fúzních proteinů produkovaných bakteriálními buňkami, které byly kultivovány na MacConkey agaru ukazuje, že varianty HlyC-T25 s mutacemi zbytků R108 a R120 v HlyC neinteragovaly s T18-ACP. To znamená, že se neobnovila aktivita AC enzymu, tedy ani tvorba cAMP, který v komplexu s CAP spouští syntézu β-galaktosidasy. To znamená, že příslušné *cyā* bakterie *E. coli* nebyly schopny fermentovat laktosu a jejich kolonie byly zabarveny bíle.

Na druhé straně, fúzní varianty HlyC<sub>MUT</sub>-T25 se substitucemi R49A, K105A a K129A v HlyC interagovali se svým fúzním partnerem T18-ACP, jelikož bakteriální kolonie produkující tyto fúzní partnery byly zbarveny červeně. Plotny inkubované čtyři dny při teplotě 30 °C jsou zobrazeny na fotografii (Obr. 21).

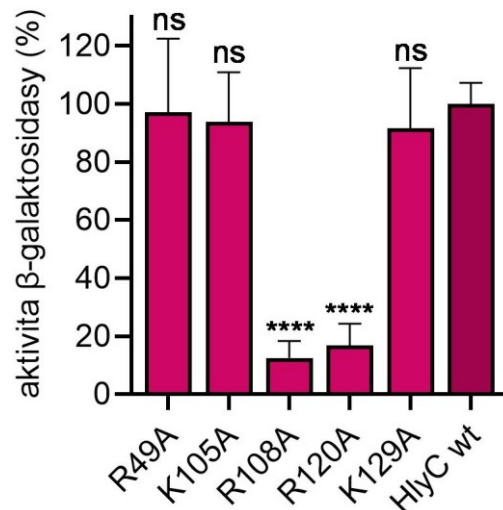


Obr. 21: Fotografie indikačních ploten s MacConkey agarem, které jsou porostlé koloniemi kotransformovaných buněk *E. coli* kmene BTH101. Na plotně č. 1 je negativní kontrola, na plotně č. 2 pak pozitivní kontrola. Na plotně č. 3 jsou kolonie produkující původní nemutovaný fúzní protein HlyC-T25 a fúzní protein T18-ACP. Na plotnách č. 4 až 8 jsou kolonie produkující testované mutantní varianty HlyC<sub>MUT</sub>-T25 a fúzní protein T18-ACP.

### 5.3.3 Kvantitativní analýza interakcí

V dalším kroku byly interakce mutantních variant HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s fúzním proteinem T18-ACP kvantifikovány stanovením  $\beta$ -galaktosidasové aktivity. Celkem bylo provedeno 6 nezávislých měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy, a to dle postupu použitého při testování nemutovaných variant fúzních proteinů, který byl popsán v kapitole 5.1.2.

Výsledný graf (Graf 2, str. 60) udává procento míry interakce každé mutantní varianty fúzního proteinu HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP vynesené proti interakci nemutované varianty HlyC-T25 s T18-ACP (vzato jako 100 %).



Graf 2: **Aktivity  $\beta$ -galaktosidasy po interakci mezi HlyC<sub>MUT</sub>-T25 a T18-ACP.** Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy nemutovaného proteinu HlyC s ACP byla vzata jako 100 %. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou a vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA; n=6; ns – p<0,05; \*\*\*\* – p<0,0001).

Graf 2 znázorňuje pokles interakce jednotlivých mutantních variant HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP. Výsledky měření aktivity  $\beta$ -galaktosidasy korelují s konečným zabarvením indikačních ploten (kapitola 5.3.2). Substituce R108A a R120A vnesené do acyltransferasy HlyC výrazně snížily její interakci s proteinem ACP, což ukazuje, že oba kladně nabitě argininové zbytky HlyC (R108 a R120) jsou pro její interakci s ACP nezbytné. Naopak zbylé substituce R49A, K105A a K129A vnesené do HlyC interakci s ACP téměř vůbec neovlivnily.

## 5.4 Analýza interakcí HlyC s mutantními variantami ACP

Na základě navržených interakčních párů aminokyselinových zbytků HlyC a ACP (kapitola 5.2) byly v BACTH systému testovány také varianty ACP nesoucí substituce D36A, D39A, E48A, D57A a E61A. Tyto mutantní varianty byly fúzovány na genetické úrovni s C-koncem fragmentu T18 (T18-ACP<sub>MUT</sub>) a testovány v kombinaci s fúzním proteinem HlyC-T25, tedy v kombinaci vedoucí k nejsilnější interakci mezi dříve testovanými fúzními páry (kapitola 5.1.2). Příslušné plasmidy pro expresi variant T18-ACP<sub>MUT</sub> byly v naší laboratoři již připraveny a zde proto uvádím jen jejich testování v BACTH systému.

Analýza interakcí mezi T18-ACP<sub>MUT</sub> a HlyC-T25 byla provedena obdobně jako analýza interakcí mutantních variant HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP (kapitola 5.3.2). Testované kombinace proteinů i kontrol jsou uvedeny v tabulce (Tab. 13).

Tab. 13: **Kombinace mutantních variant T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25, jejichž interakce byly analyzovány pomocí BACTH systému.** V tabulce jsou uvedeny dvojice testovaných fúzních proteinů a k nim příslušné plasmidy, které je kódují. Pro srovnání a kontrolu byly také testovány interakce mezi fúzním proteinem HlyC-T25 a nemutovaným fúzním proteinem T18-ACP, pozitivní kontrola kódující fúze s leucinovým zipem a negativní kontrola bez fúzních proteinů.

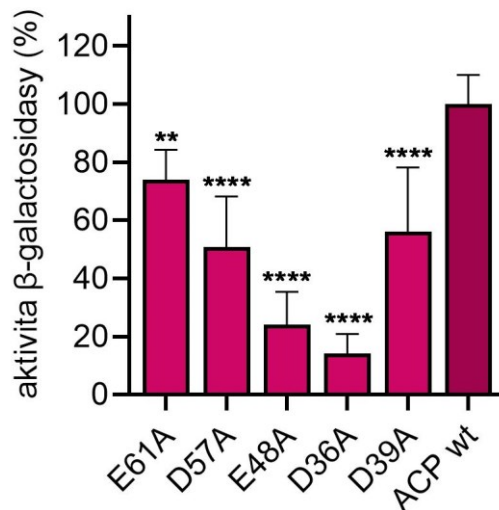
Konstrukt	Fúzní protein	Plasmid (kan) <sup>1</sup>	Fúzní protein	Plasmid (amp) <sup>2</sup>
<b>Kombinace</b>	<b>HlyC s ACP<sub>MUT</sub></b>			
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP-D36A	pUT18C- <i>acp</i> -D36A
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP-D39A	pUT18C- <i>acp</i> -D39A
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP-E48A	pUT18C- <i>acp</i> -E48A
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP-D57A	pUT18C- <i>acp</i> -D57A
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP-E61A	pUT18C- <i>acp</i> -E61A
<b>Kombinace</b>	<b>Kontroly</b>			
	T25-LeuZip	pKT25-Zip	T18-LeuZip	pUT18C-Zip
	MCS-T25	pKNT25	T18-MCS	pUT18C
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-ACP	pUT18C- <i>acp</i>

<sup>1</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

<sup>2</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu.

Po kotransformaci dvojic plasmidů s rezistencí k různým antibiotikům do *cyar* kmene *E. coli* BTH101 byly bakteriální buňky kultivovány na plotnách s MacConkey agarem při 30 °C. Pozorování interakcí fúzních proteinů produkovaných bakteriálními buňkami ukázalo, že interakce T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25 jsou poměrně slabé. Bakteriální kolonie byly zbarveny do bílé až narůžovělé barvy a žádná z nich neměla srovnatelnou barvu s interakcí nemutovaných proteinů. Nejsilnější interakci s HlyC-T25 vykazoval fúzní protein T18-ACP<sub>MUT</sub> s mutací zbytku E61.

Pro kvantifikaci interakce byla stanovena aktivita β-galaktosidasy. Celkem bylo provedeno 9 nezávislých měření obdobně, jak tomu bylo při testování nemutovaných fúzních proteinů (kapitola 5.1.2). Následující graf (Graf 3, str. 62) udává aktivity β-galaktosidasy naměřené při interakci mutovaných fúzních proteinů T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25 v procentech vztahených vůči aktivitě β-galaktosidasy naměřené při interakci nemutovaného fúzního proteinu T18-ACP s HlyC-T25 (vzato jako 100 %).



Graf 3: Aktivity  $\beta$ -galaktosidasy po interakci mezi T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25. Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy naměřená při interakci nemutovaného fúzního proteinu T18-ACP s HlyC-T25 byla vzata jako 100 %. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou a vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA; n=9; \*\* – p<0,01; \*\*\*\* – p<0,0001).

Na grafu (Graf 3) vidíme, že zavedení všech pěti substitucí do ACP vedlo k signifikantnímu poklesu interakce mezi fúzními partnery T18-ACP<sub>MUT</sub> a HlyC-T25. Tento pokles ale nebyl nakonec tak výrazný, jak se předpokládalo na základě kvalitativního vyhodnocení konečného zbarvení indikačních ploten s MacConkey agarem. Všechny substituce v ACP snížily míru interakce mezi T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25 pod 75 % v porovnání s nemutovanými fúzními partnery. Nejméně interakci ovlivnila substituce E61A, což odpovídá i pozorování zbarvení indikačních ploten. Naproti tomu protein ACP s vnesenými substitucemi D36A a E48A s acyltransferasou HlyC téměř neinteragoval a zbývající dvě substituce, D57A a D39A, snížily schopnost interakce ACP s HlyC přibližně na polovinu.

## 5.5 Analýza interakcí HlyC s HlyA<sub>535-719</sub>

Obdobně jako byla pomocí BACTH systému studována interakce mezi HlyC a ACP, bude v budoucnu studována i interakce HlyC s protoxinem proHlyA. V této poslední kapitole je proto provedena analýza ukazující, která z možných dvojic fúzních proteinů T25 s HlyC a T18 s proHlyA je spolu schopna nejlépe interagovat, obdobně jako tomu bylo v kapitole 5.1 při analýze kombinací fúzních proteinů T25 s HlyC a T18 s ACP. Testovány tak byly čtyři dvojice fúzních proteinů, v nichž HlyC byl fúzován k N- nebo C-konci fragmentu T25 a fragment proHlyA k N- nebo C-konci fragmentu T18.



Nejprve byl DNA segment kódující fragment proHlyA nesoucí zbytky 535-719 (v dalším textu bude používáno označení HlyA<sub>535-719</sub>) a obsahující konzervované lysiny K564 a K690 vložen buď na 5'-konec nebo 3'-konec DNA sekvence kódující fragment T18 do plasmidu pUT18, resp. pUT18C. Pro vkládání DNA segmentu kódujícího fragment HlyA<sub>535-719</sub> byla využita MCS příslušných plasmidů, která byla štěpena vhodnými restrikními endonukleasami.

Plasmidy byly připraveny překlónováním fragmentu genu *hlyA* z plasmidu pT7-*hlyC-hlyA*-dH stejným způsobem, jak tomu bylo při překlónování genu *hlyC* do plasmidů pro BACTH systém (kapitola 5.1.1).

Následně byly v BACTH systému testovány interakce čtyř možných kombinací fúzních proteinů produkovaných zkonstruovanými plasmidy. Tyto testované kombinace a příslušné kontroly jsou uvedeny v tabulce (Tab. 14), přičemž jejich analýza probíhala obdobně jako analýza interakce mezi fúzními proteiny HlyC s T25 a ACP s T18 (kapitola 5.1.2).

Tab. 14: **Kombinace fúzních proteinů, jejichž interakce byly analyzovány pomocí BACTH systému.** V tabulce jsou uvedeny dvojice testovaných fúzních proteinů a k nim příslušné plasmidy, které je kódují.

Konstrukt	Fúzní protein	Plasmid (kan) <sup>1</sup>	Fúzní protein	Plasmid (amp) <sup>2</sup>
<b>Kombinace</b>	<b>HlyC-HlyA<sub>535-719</sub></b>			
	T25-HlyC	pKT25-hlyC	T18-HlyA <sub>535-719</sub>	pUT18C- <i>hlyA</i> <sub>535-719</sub>
	T25-HlyC	pKT25- <i>hlyC</i>	HlyA <sub>535-719</sub> -T18	pU- <i>hlyA</i> <sub>535-719</sub> -T18
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	T18-HlyA <sub>535-719</sub>	pUT18C- <i>hlyA</i> <sub>535-719</sub>
	HlyC-T25	pKN- <i>hlyC</i> -T25	HlyA <sub>535-719</sub> -T18	pU- <i>hlyA</i> <sub>535-719</sub> -T18
<b>Kombinace</b>	<b>Pozitivní kontrola</b>			
	T25-LeuZip	pKT25-Zip	T18-LeuZip	pUT18C-Zip
<b>Kombinace</b>	<b>Negativní kontrola (pozadí)</b>			
	T25-MCS	pKT25	T18-MCS	pUT18C
	T25-MCS	pKT25	MCS-T18	pUT18
	MCS-T25	pKNT25	T18-MCS	pUT18C
	MCS-T25	pKNT25	MCS-T18	pUT18

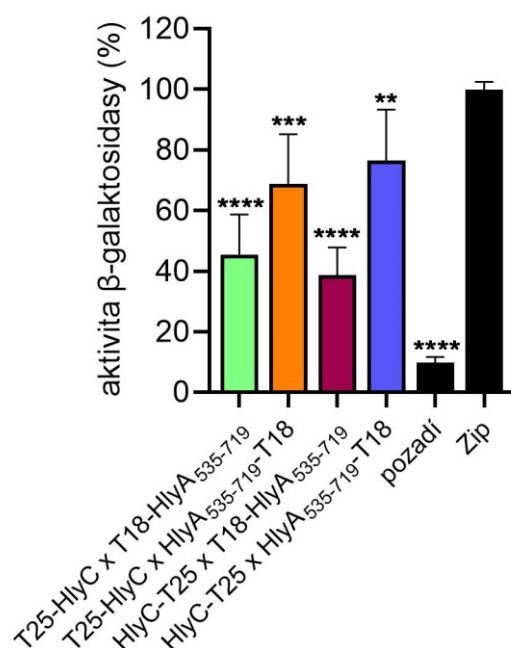
<sup>1</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči kanamycinu.

<sup>2</sup>Plasmid obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu.

Při kvalitativní analýze interakce HlyC s HlyA<sub>535-719</sub> se kotransformované bakterie *E. coli* kmene BTH101 kultivovaly na indikačních plotnách s MacConkey agarem. U všech čtyř

testovaných kombinací došlo po třech dnech k pozitivní interakci mezi HlyC a HlyA<sub>535-719</sub>, což vedlo k zabarvení bakteriálních kolonií do červena.

Míra interakce fúzních proteinů byla následně kvantifikována měřením  $\beta$ -galaktosidasové aktivity, přičemž bylo celkem provedeno 6 nezávislých měření. Výsledný graf udává procento míry interakce každé kombinace vynesené proti pozitivní kontrole interakce fúzních proteinů s leucinovým zipem, která byla vzata jako 100 % (Graf 4).



Graf 4: **Aktivity  $\beta$ -galaktosidasy po interakci mezi HlyC a HlyA<sub>535-719</sub> fúzovanými s T25, resp. T18.** Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy pozitivní kontroly (interakce mezi fúzními proteiny s leucinovým zipem) byla vzata jako 100 %. Výsledky jsou zobrazeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou a vyhodnoceny pomocí analýzy rozptylu (ANOVA; n=6; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0.001; \*\*\*\* – p<0,0001).

Jak ukazuje graf (Graf 4), nejsilnější interakci vykazovaly dva interakční páry, T25-HlyC s HlyA<sub>535-719</sub>-T18 a HlyC-T25 s HlyA<sub>535-719</sub>-T18, u nichž byl vždy fragment HlyA<sub>535-719</sub> fúzován k N-konci fragmentu T18. Na druhé straně, fúzní protein, v němž byl HlyA<sub>535-719</sub> fúzován k C-konci fragmentu T18 (T18-HlyA<sub>535-719</sub>) interagoval jak T25-HlyC, tak s HlyC-T25 výrazně slaběji. Kombinace fúzních proteinů HlyC-T25 s HlyA<sub>535-719</sub>-T18 s nejvyšší  $\beta$ -galaktosidasovou aktivitou budou v další části výzkumu použity pro přípravu a testování mutantních variant HlyA<sub>535-719</sub> a HlyC.



## 6 Diskuze

Uropatogenní kmeny bakterie *Escherichia coli* představují hlavní příčinu infekcí močového traktu, které patří mezi nejčastější infekce u lidí. Tyto bakteriální kmeny disponují různými faktory virulence, které jsou nezbytné pro jejich přežití, kolonizaci hostitele a přispívají tak k jejich celkové patogenitě.<sup>11</sup> Jedním z těchto faktorů virulence je sekretovaný  $\alpha$ -hemolyzin HlyA. HlyA patří do skupiny RTX toxinů, jejichž jedním z charakteristických znaků je, že jsou syntetizovány jako neaktivní protoxiny. K přechodu do aktivní formy vyžadují acylaci dvou konzervovaných lysinových zbytků. Konkrétně u proHlyA je aktivace uskutečňována kovalentní acylací  $\epsilon$ -aminoskupin dvou konzervovaných lysinových zbytků, K564 a K690. Tato modifikace je zprostředkována koexprimovanou acyltransferasou HlyC a jako donor acylového zbytku slouží výhradně acyl-ACP.<sup>30,31</sup> Acylové řetězce navázané na HlyA jsou nezbytné pro ireverzibilní inzerci toxinu do cílové membrány<sup>59</sup> a pro oligomerizaci toxinu v membránových mikrodoménách za vzniku oligomerních pórů<sup>60</sup>. Ty umožňují obousměrný tok iontů přes membránu, což může vést až ke koloidně-osmotické lýze buňky.<sup>24</sup>

Přestože je HlyA nejvíce prozkoumaným toxinem ze skupiny RTX toxinů, přesný mechanismus jeho aktivace zatím není úplně objasněn. Výsledky studia proteinových interakcí mezi proHlyA, HlyC a acyl-ACP vedoucí k detailnímu pochopení mechanismu acylace HlyA by tak mohly napomoci k vývoji specifických sloučenin, které by blokovaly unikátní acyltransferasu HlyC, ale nezasahovaly do funkcí „klasických“ acyltransferas nalezených v hostitelských buňkách a komensálních mikroorganismech. Pouze acylované RTX toxiny totiž mohou působit jako vysoce účinné „kontaktní zbraně“, které pronikají a permeabilizují membrány hostitelských buněk a přispívají tak k patogenezi bakteriálních infekcí.

Zatím jediná acyltransferasa s vyřešenou krystalovou strukturou je acyltransferasa ApxIC z patogenní bakterie *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Bylo prokázáno, že tato acyltransferasa zaujímá dimerní strukturu, kde každý monomer obsahuje aktivní místo pro vazbu substrátu. Acyltransferasa HlyC sdílí v rámci primární sekvence přibližně 70 % homologie s ApxIC a dokáže jí být přímo nahrazena *in vivo*.<sup>33</sup>

Na základě interakčního modelu mezi proteiny HlyC a ACP, který byl sestaven z modelů struktur HlyC a ACP získaných pomocí programu AlphaFold2, byly identifikovány konkrétní páry aminokyselinových zbytků, které by se mohly podílet

na interakci mezi proteiny HlyC a ACP, a to: R49–E61, K105–D57, R108–E48, R120–D36 a K129–D39. To naznačuje, že by mohlo docházet k elektrostatickým interakcím mezi kladně nabitými argininovými a lysinovými zbytky proteinu HlyC se záporně nabitými aspartátovými a glutamátovými zbytky proteinu ACP.

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo připravit mutantní varianty HlyC a ACP nesoucí bodové mutace predikovaných interakčních zbytků a otestovat je pomocí bakteriálního dvouhybridního systému (BACTH), což by umožnilo experimentálně potvrdit, které z predikovaných zbytků jsou v interakci HlyC s ACP skutečně zapojeny.

Zpočátku bylo důležité určit nejvhodnější orientaci fúzních proteinů. Testované proteiny můžeme fúzovat s N- nebo C-koncem fragmentu katalytické domény. Jelikož známe pouze predikované struktury HlyC a HlyA, nemůžeme předpovědět jejich terciární strukturu po fúzování s fragmenty katalytické domény. Vlivem jejich vzájemného sbalení a interakce by mohlo dojít k částečnému zneprístupnění vazebného místa, což by se projevilo jako falešně negativní interakce při měření v BACTH systému. Nemutované varianty proteinů by měly mít v ideálním případě co nejvyšší míru interakce, protože testované mutantní varianty budou vztaheny právě k nim. Stejně tak, čím větší je míra interakce mezi nemutovanou dvojicí proteinů, tím větší je rozsah pro stanovení a porovnání změn interakcí při testování jednotlivých bodových mutací predikovaných interakčních zbytků.

Byly testovány čtyři možné kombinace orientace fúzních proteinů v BACTH systému, ve kterých byl HlyC fúzován k N- nebo C-konci fragmentu T25 a ACP k N- nebo C-konci fragmentu T18. Kvalitativní i kvantitativní analýzou bylo zjištěno, že orientace, ve které byl ACP fúzován s N-koncem fragmentu T18 není pro testování vhodná. V obou případech tato orientace (ACP-T18) nebyla schopna interagovat s HlyC, ať už byl fúzován na N- nebo C-konec fragmentu T25, přestože se jedná o nemutované formy proteinů, které by spolu měly interagovat. Tato skutečnost mohla být způsobená právě sterickým bráněním HlyC-interakčního místa ACP fragmentem T18 po sbalení exprimovaného fúzního proteinu. Nejvyšší míru interakce vykazovala dvojice fúzních proteinů HlyC-T25 a T18-ACP, která byla v dalších experimentech použita k vnesení predikovaných bodových mutací do HlyC, resp. ACP a následnému testování získaných mutantních fúzních variant pomocí BACTH systému.

Dle navrženého interakčního modelu HlyC-ACP byly připraveny mutantní varianty fúzního proteinu HlyC-T25 se zavedenými substitucemi R49A, K105A, R108A, R120A a K129A v HlyC. Jednotlivé nabité aminokyselinové zbytky byly substituovány neutrálním alaninovým zbytkem s krátkým postranním řetězcem.

Analýza interakcí v BACTH systému sestávala vždy z fúzního proteinu se zavedenou substitucí (HlyC<sub>MUT</sub>-T25) a druhého nemutovaného fúzního proteinu (T18-ACP). Síla jejich interakce byla kvantifikována měřením aktivity  $\beta$ -galaktosidasy a ta byla následně vyjádřena v procentech vztažených k aktivitě naměřené při interakci dvou nemutovaných testovaných fúzních proteinů (vzata jako 100 %). Tímto způsobem bylo možné zjistit, do jaké míry jednotlivé mutace ovlivnily danou interakci.

Testování interakcí mutantních variant HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s fúzním proteinem T18-ACP ukázalo, že k výraznému snížení interakce, až na úroveň pozadí, dochází u substitucí R108A a R120A v HlyC. Oba kladně nabitě argininové zbytky HlyC (R108 a R120) jsou tedy nezbytné pro interakci s proteinem ACP. Vzhledem k tomu, že ke zrušení interakce došlo substitucí nabitého argininového zbytku za neutrální alaninový, tento výsledek také naznačuje, že na interakci mezi HlyC a ACP by se skutečně mohly podílet elektrostatické interakce. Zbylé testované substituce R49A, K105A a K129A v acyltransferase HlyC téměř vůbec neovlivnily její interakci s ACP, což ukazuje, že žádný ze zbytků R49, K105 a K129 není pro interakci HlyC s ACP tak kritický jako předchozí dva (R108 a R120). V budoucnu budou proto všechny tři tyto bodové mutace vloženy do jedné molekuly HlyC-T25 zároveň a bude sledováno, zda trojitá mutace povede ke snížení interakce varianty HlyC<sub>3xMUT</sub>-T25 s T18-ACP.

Dále byly testovány interakce mutantních variant T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25, přičemž u všech mutantních variant došlo ke snížení příslušné interakce pod 75 % v porovnání s nemutovanými fúzními proteiny. Nejvyšší pokles interakce byl pozorován u substitucí E48A a D36A v ACP, přičemž substituce D36A tuto interakci téměř úplně zrušila a tento záporně nabitý zbytek kyseliny asparagové je tedy zcela kritický pro interakci ACP s HlyC. Substituce D57A a D39A snížily interakci ACP s HlyC přibližně na polovinu, což ukazuje, že zbytky D57 a D39 v ACP jsou pro interakci s HlyC také důležité, ale nedokáží ji zcela zrušit. Substituce E41A také snížila interakci ACP s HlyC, ale ne tak výrazně jako předchozí čtyři substituce.

Na základě získaných výsledků můžeme porovnat, jak substituce jednotlivých zbytků v predikovaných interakčních dvojicích proteinů HlyC a ACP ovlivnily jejich vzájemnou interakci. Naměřené aktivity  $\beta$ -galaktosidasy mutantních variant v procentech (vztažené ke stejné nemutované interakci HlyC-T25 s T18-ACP) jsou uvedeny vedle sebe v tabulce (Tab. 15).

Tab. 15: **Přehled aktivit  $\beta$ -galaktosidasy mezi HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP (levá polovina tabulky) a mezi T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25 (pravá polovina tabulky).** Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy naměřená při interakci nemutovaných fúzních proteinů T18-ACP a HlyC-T25 byla vzata jako 100 %. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné procentuální hodnoty naměřených aktivit  $\beta$ -galaktosidasy. V řádcích jsou vedle sebe substituce zbytků, které byly navrženy na základě interakčního modelu HlyC-ACP jako predikované interakční páry.

	<b>Mutace v HlyC</b>		<b>Mutace v ACP</b>	
	<b>Mutace</b>	<b>Míra interakce v %</b>	<b>Mutace</b>	<b>Míra interakce v %</b>
<b>Predikované interakční páry</b>	R49A	97	E61A	74
	K105A	94	D57A	51
	R108A	13	E48A	24
	R120A	17	D36A	14
	K129A	92	D39A	56

Z tabulky (Tab. 15) je patrné, že ve dvou případech interakci mezi HlyC a ACP výrazně snížily substituce zbytků, které byly vytipovány jako interakční páry mezi těmito dvěma proteiny. Jedná se o páry zbytků R108 s E48 a R120 s D36 (HlyC s ACP). Příslušné substituce (R108A, E48A, R120A a D36A) měly mezi testovanými substitucemi největší vliv na interakci HlyC s ACP. Jelikož byly tyto substituce testovány samostatně a v obou případech byla interakce mezi HlyC a ACP téměř kompletně zrušena, můžeme předpokládat, že právě interakční páry R108–E48 a R120–D36 jsou klíčové pro interakci acyltransferasy HlyC s donorem acylového zbytku ACP.

V budoucnu se plánují pomocí širšího spektra metod ověřit jednotlivé substituce, které testováním v BACTH systému zabránily interakci HlyC s ACP a tím teoreticky i následné acylaci protoxinu proHlyA na jeho aktivní formu. Protoxin proHlyA bude koexprimovaný s mutantními variantami acyltransferasy HlyC, varianty protoxinu budou purifikovány a následně bude měřena jejich vazebná a hemolytická aktivita na beraních erythrocytech. Pokud jednotlivé mutace v acyltransferase HlyC zabrání její interakci s ACP a tím následné acylaci přenesením acylového zbytku na proHlyA, neměly by mít

tyto neaktivní varianty toxinu schopnost vázat se na erytrocyty a způsobit jejich lýzu vytvořením membránových pórů.

Simultánně jsou v naší laboratoři testovány i interakce podílející se na aktivaci dalších RTX toxinů. Jsou to toxiny RtxA bakterie *Kingella kingae* a CyaA bakterie *Bordetella pertussis*. V obou případech již byly testovány interakce acyltransferasy RtxC, resp. CyaC s mutantními variantami ACP. Stejně jako v případě interakce HlyC s ACP, byl naměřen významný pokles interakce RtxC s ACP a CyaC s ACP, když byl zbytek D36 v ACP substituován za zbytek alaninu. Obdobně substituce D39A v ACP významně ovlivnila jeho interakci s RtxC a CyaC, dokonce více než jeho interakci s HlyC. Dále k signifikantnímu snížení interakce ACP s HlyC a CyaC přispěla substituce E48A v ACP, přičemž interakci s RtxC tato substituce vůbec neovlivnila. Substituce E61A v ACP nezpůsobila téměř žádný pokles interakce s HlyC a CyaC a jenom malý pokles při interakci s RtxC.

Všechny tyto výsledky naznačují, že interakce ACP s acyltransferasou HlyC, ale i s dalšími dvěma acyltransferasami (RtxC a CyaC) aktivujícími RTX toxiny, je založena na elektrostatických interakcích mezi několika interagujícími aminokyselinovými zbytky. Vzhledem k tomu, že v některých případech substituce stejných zbytků v proteinu ACP vedly ke snížení jeho interakce se všemi třemi acyltransferasami, je možné předpokládat, že interakce ACP s těmito acyltransferasami je velmi podobná.

## 7 Závěr

Předmětem této bakalářské práce bylo studium interakce proteinů HlyC s ACP a HlyC s proHlyA, které se podílejí na aktivaci protoxinu proHlyA uropatogenních bakterií *E. coli*. Pomocí BACTH systému byly testovány mutantní varianty HlyC a ACP nesoucí substituce zbytků, které by se mohly podílet na interakci těchto dvou proteinů. Získané výsledky lze shrnout následovně:

- i. Byly připraveny rekombinantní plasmidy pro BACTH systém exprimující testované proteiny HlyC, ACP a proHlyA fúzované s fragmenty T25 a T18 katalytické AC domény.
- ii. Testováním interakce různých kombinací mezi fúzními proteiny HlyC s T25 a ACP s T18 byla vybrána jako nejvhodnější kombinace HlyC-T25 a T18-ACP.
- iii. Pomocí cílené PCR mutagenese byly do genu *hlyC* zavedeny bodové mutace, které vedly k vnesení substitucí R49A, K105A, R108A, R120A a K129A do proteinu HlyC. Rovněž byly připraveny plasmidy pro BACTH systém exprimující fúzní proteiny HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s příslušnými substitucemi.
- iv. Testováním interakcí HlyC<sub>MUT</sub>-T25 s T18-ACP v BACTH systému byly zbytky R108 a R120 v HlyC identifikovány jako nezbytné pro interakci mezi HlyC a ACP. Zbylé substituce příslušnou interakci výrazně neovlivnily.
- v. Při testování interakcí T18-ACP<sub>MUT</sub> s HlyC-T25 v BACTH systému byly interakce výrazně sníženy u substitucí E48A a D36A v ACP. Substituce D57A a D39A v ACP pak interakci mezi HlyC a ACP snížily téměř na polovinu.
- vi. Testováním interakce různých kombinací mezi fúzními proteiny HlyC s T25 a fragmentu HlyA<sub>535-719</sub> s T18 byla vybrána jako nejvhodnější kombinace HlyC-T25 s HlyA<sub>535-719</sub>-T18.

## Seznam použitý literatury

- (1) Escherich, T. The Intestinal Bacteria of the Neonate and Breast-Fed Infant. *Clinical Infectious Diseases* **1988**, *10* (6), 1220–1225.
- (2) Tenaillon, O.; Skurnik, D.; Picard, B.; Denamur, E. The Population Genetics of Commensal *Escherichia Coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2010**, *8* (3), 207–217.
- (3) Friedmann, H. C. Escherich and *Escherichia*. *EcoSal Plus* **2014**, *6* (1), 10.
- (4) Votava, M. *Lékařská Mikrobiologie Speciální*. Brno, Neptun, **2003**. ISBN: 80-902896-6-5.
- (5) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Brock, T. D. *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed. New York, Pearson Prentice Hall, **2006**. ISBN 978-0131443297
- (6) Fotadar, U.; Zaveloff, P.; Terracio, L. Growth of *Escherichia Coli* at Elevated Temperatures. *Journal of Basic Microbiology* **2005**, *45* (5), 403–404.
- (7) Mossel, D. A. A.; Mengerink, W. H. J.; Scholts, H. H. Use of a Modified MacConkey Agar Medium for the Selective Growth and Enumeration of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Bacteriology* **1962**, *84* (2), 381.
- (8) Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmiecik, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiazczyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; Choroszy-Krol, I. Virulence Factors, Prevalence and Potential Transmission of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia Coli* Isolated from Different Sources: Recent Reports. *Gut Pathogens* **2019**, *11* (1), 10.
- (9) Kaper, J. B.; Nataro, J. P.; Mobley, H. L. T. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2004**, *2* (2), 123–140.
- (10) Saint, S.; Kowalski, C. P.; Kaufman, S. R.; Hofer, T. P.; Kauffman, C. A.; Olmsted, R. N.; Forman, J.; Banaszak-Holl, J.; Damschroder, L.; Krein, S. L. Preventing Hospital-Acquired Urinary Tract Infection in the United States: A National Study. *Clinical Infectious Diseases* **2008**, *46* (2), 243–250.
- (11) Mancuso, G.; Midiri, A.; Gerace, E.; Marra, M.; Zummo, S.; Biondo, C. Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. *Pathogens* **2023**, *12* (4), 623.
- (12) Terlizzi, M. E.; Gribaudo, G.; Maffei, M. E. UroPathogenic *Escherichia Coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-Antibiotic Antimicrobial Strategies. *Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1566.
- (13) Lüthje, P.; Brauner, A. Virulence Factors of Uropathogenic *E. Coli* and Their Interaction with the Host. *In Advances in Microbial Physiology* **2014**, *65*, 337–372.
- (14) Casadevall, A.; Pirofski, L. Virulence Factors and Their Mechanisms of Action: The View from a Damage–Response Framework. *Journal of Water and Health* **2009**, *7* (S1), S2–S18.
- (15) Garénaux, A.; Caza, M.; Dozois, C. M. The Ins and Outs of Siderophore Mediated Iron Uptake by Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli*. *Veterinary Microbiology* **2011**, *153* (1), 89–98.
- (16) Wang, X.; Quinn, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic Pathway and Structure Modification. *Progress in Lipid Research* **2010**, *49* (2), 97–107.

- (17) Wiles, T. J.; Mulvey, M. A. The RTX Pore-Forming Toxin  $\alpha$ -Hemolysin of Uropathogenic *Escherichia Coli*: Progress and Perspectives. *Future Microbiology* **2013**, *8* (1), 73–84.
- (18) Linhartová, I.; Bumba, L.; Mašín, J.; Basler, M.; Osička, R.; Kamanová, J.; Procházková, K.; Adkins, I.; Hejnová-Holubová, J.; Sadílková, L.; Morová, J.; Šebo, P. RTX Proteins: A Highly Diverse Family Secreted by a Common Mechanism. *FEMS Microbiol Reviews* **2010**, *34* (6), 1076–1112.
- (19) Welch, R. A. Pore-Forming Cytolysins of Gram-Negative Bacteria. *Molecular Microbiology* **1991**, *5* (3), 521–528.
- (20) Linhartova, I.; Osicka, R.; Bumba, L.; Masin, J.; Sebo, P. RTX Toxins: A Review. *Microbial Toxins* **2015**, 1–29.
- (21) Wagner, W.; Vogel, M.; Goebel, W. Transport of Hemolysin across the Outer Membrane of *Escherichia Coli* Requires Two Functions. *Journal of Bacteriology* **1983**, *154* (1), 200–210.
- (22) Aono, R.; Tsukagoshi, N.; Yamamoto, M. Involvement of Outer Membrane Protein TolC, a Possible Member of the Mar-Sox Regulon, in Maintenance and Improvement of Organic Solvent Tolerance of *Escherichia Coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **1998**, *180* (4), 938–944.
- (23) Filipi, K.; Rahman, W. U.; Osickova, A.; Osicka, R. Kingella Kingae RtxA Cytotoxin in the Context of Other RTX Toxins. *Microorganisms* **2022**, *10* (3), 518.
- (24) Bhakdi, S.; Mackman, N.; Nicaud, J. M.; Holland, I. B. *Escherichia Coli* Hemolysin May Damage Target Cell Membranes by Generating Transmembrane Pores. *Infection and Immunity* **1986**, *52* (1), 63–69.
- (25) Bakás, L.; Ostolaza, H.; Vaz, W. L.; Goñi, F. M. Reversible Adsorption and Nonreversible Insertion of *Escherichia Coli* Alpha-Hemolysin into Lipid Bilayers. *Biophysical Journal* **1996**, *71* (4), 1869–1876.
- (26) Cortajarena, A. L.; Goñi, F. M.; Ostolaza, H. Glycophorin as a Receptor for *Escherichia Coli* Alpha-Hemolysin in Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276* (16), 12513–12519.
- (27) Moayeri, M.; Welch, R. A. Prelytic and Lytic Conformations of Erythrocyte-Associated *Escherichia Coli* Hemolysin. *Infection and Immunity* **1997**, *65* (6), 2233–2239.
- (28) Benz, R.; Schmid, A.; Wagner, W.; Goebel, W. Pore Formation by the *Escherichia Coli* Hemolysin: Evidence for an Association-Dissociation Equilibrium of the Pore-Forming Aggregates. *Infection and Immunity* **1989**, *57* (3), 887–895.
- (29) Goebel, W.; Hedgpeth, J. Cloning and Functional Characterization of the Plasmid-Encoded Hemolysin Determinant of *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology* **1982**, *151* (3), 1290–1298.
- (30) Issartel, J.-P.; Koronakis, V.; Hughes, C. Activation of *Escherichia Coli* Prohaemolysin to the Mature Toxin by Acyl Carrier Protein-Dependent Fatty Acylation. *Nature* **1991**, *351* (6329), 759–761.
- (31) Stanley, P.; Packman, L. C.; Koronakis, V.; Hughes, C. Fatty Acylation of Two Internal Lysine Residues Required for the Toxic Activity of *Escherichia Coli* Hemolysin. *Science* **1994**, *266* (5193), 1992–1996.



- (32) Osickova, A.; Khaliq, H.; Masin, J.; Jurnecka, D.; Sukova, A.; Fiser, R.; Holubova, J.; Stanek, O.; Sebo, P.; Osicka, R. Acyltransferase-Mediated Selection of the Length of the Fatty Acyl Chain and of the Acylation Site Governs Activation of Bacterial RTX Toxins. *Journal of Biological Chemistry* **2020**, *295* (28), 9268–9280.
- (33) Greene, N. P.; Crow, A.; Hughes, C.; Koronakis, V. Structure of a Bacterial Toxin-Activating Acyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (23), E3058–E3066.
- (34) Baumann, U.; Wu, S.; Flaherty, K. M.; McKay, D. B. Three-Dimensional Structure of the Alkaline Protease of *Pseudomonas Aeruginosa*: A Two-Domain Protein with a Calcium Binding Parallel Beta Roll Motif. *The EMBO Journal* **1993**, *12* (9), 3357–3364.
- (35) Chenal, A.; Karst, J. C.; Pérez, A. C. S.; Wozniak, A. K.; Baron, B.; England, P.; Ladant, D. Calcium-Induced Folding and Stabilization of the Intrinsically Disordered RTX Domain of the CyaA Toxin. *Biophysical Journal* **2010**, *99* (11), 3744–3753.
- (36) Gentschev, I.; Hess, J.; Goebel, W. Change in the Cellular Localization of Alkaline Phosphatase by Alteration of Its Carboxy-Terminal Sequence. *Molecular Genetics and Genomics* **1990**, *222* (2–3), 211–216.
- (37) Delepelaire, P. Type I Secretion in Gram-Negative Bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2004**, *1694* (1), 149–161.
- (38) Balakrishnan, L.; Hughes, C.; Koronakis, V. Substrate-Triggered Recruitment of the TolC Channel-Tunnel during Type I Export of Hemolysin by *Escherichia Coli*. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *313* (3), 501–510.
- (39) Gangola, P.; Rosen, B. P. Maintenance of Intracellular Calcium in *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262* (26), 12570–12574.
- (40) Fields, S.; Song, O. A Novel Genetic System to Detect Protein–Protein Interactions. *Nature* **1989**, *340* (6230), 245–246.
- (41) Olson, M. G.; Goldammer, M.; Gauliard, E.; Ladant, D.; Ouellette, S. P. A Bacterial Adenylate Cyclase-Based Two-Hybrid System Compatible with Gateway® Cloning. *Methods in Molecular Biology* **2018**, *1794*, 75–96.
- (42) Karimova, G.; Pidoux, J.; Ullmann, A.; Ladant, D. A Bacterial Two-Hybrid System Based on a Reconstituted Signal Transduction Pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1998**, *95* (10), 5752–5756.
- (43) Karimova, G.; Ullmann, A.; Ladant, D. A Bacterial Two-Hybrid System That Exploits a cAMP Signaling Cascade in *Escherichia Coli*. *Methods in Enzymology* **2000**, *328*, 59–73.
- (44) EUROMEDEX: *Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit*. Dostupné z URL: <<https://static.igem.org/mediawiki/2019/c/c4/T--Grenoble-Alpes--improve-batch-system-kit.pdf>> [cit. 06. 03. 2024].
- (45) Glaser, P.; Ladant, D.; Sezer, O.; Pichot, F.; Ullmann, A.; Danchin, A. The Calmodulin-Sensitive Adenylate Cyclase of *Bordetella Pertussis*: Cloning and Expression in *Escherichia Coli*. *Molecular Microbiology* **1988**, *2* (1), 19–30.

- (46) Mattoo, S.; Cherry, J. D. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella Pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clinical Microbiology Reviews* **2005**, *18* (2), 326–382.
- (47) Dürvanger, Z.; Harmat, V. Structural Diversity in Calmodulin - Peptide Interactions. *Current Protein & Peptide Science* **2019**, *20* (11), 1102–1111.
- (48) Ladant, D.; Michelson, S.; Sarfati, R.; Gilles, A. M.; Predeleanu, R.; Bârză, O. Characterization of the Calmodulin-Binding and of the Catalytic Domains of *Bordetella Pertussis* Adenylate Cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (7), 4015–4020.
- (49) Ladant, D. A Bacterial Two-Hybrid System for In Vivo Assays of Protein-Protein Interactions and Drug Discovery. *Methods in Molecular Biology* **2022**, *2548*, 145–167.
- (50) Elazhary, M. A. S. Y.; Saheb, S. A.; Roy, R. S.; Lagacé, A. A Simple Procedure for the Preliminary Identification of Aerobic Gram Negative Intestinal Bacteria with Special Reference to the *Enterobacteriaceae*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **1973**, *37* (1), 43–46.
- (51) Lagier, J.-C.; Edouard, S.; Pagnier, I.; Mediannikov, O.; Drancourt, M.; Raoult, D. Current and Past Strategies for Bacterial Culture in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **2015**, *28* (1), 208–236.
- (52) MacConkey, A. Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *The Journal of Hygiene* **1905**, *5* (3), 333–379.
- (53) Ericson, M. N.; Shankar, S. K.; Chahine, L. M.; Omary, M. A.; Herbing, I. H. von; Marpu, S. B. Development of Neutral Red as a pH/pCO<sub>2</sub> Luminescent Sensor for Biological Systems. *Chemosensors* **2021**, *9* (8), 210.
- (54) Jung, B.; Hoilat, G. J. MacConkey Medium. *StatPearls*; **2024**.
- (55) Juers, D. H.; Matthews, B. W.; Huber, R. E. LacZ  $\beta$ -Galactosidase: Structure and Function of an Enzyme of Historical and Molecular Biological Importance. *Protein Science* **2012**, *21* (12), 1792–1807.
- (56) Uchil, P. D.; Nagarajan, A.; Kumar, P.  $\beta$ -Galactosidase. *Cold Spring Harbor Protocols* **2017**.
- (57) Lederberg, J. The Beta-d-Galactosidase of *Escherichia Coli*, Strain K-121. *Journal of Bacteriology* **1950**, *60* (4), 381–392.
- (58) Tenu, J. P.; Viratelle, O. M.; Garnier, J.; Yon, J. pH Dependence of the Activity of Beta-Galactosidase from *Escherichia Coli*. *European Journal of Biochemistry* **1971**, *20* (3), 363–370.
- (59) Herlax, V.; Bakás, L. Acyl Chains Are Responsible for the Irreversibility in the *Escherichia Coli* Alpha-Hemolysin Binding to Membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* **2003**, *122* (1–2), 185–190.
- (60) Herlax, V.; Maté, S.; Rimoldi, O.; Bakás, L. Relevance of Fatty Acid Covalently Bound to *Escherichia Coli* Alpha-Hemolysin and Membrane Microdomains in the Oligomerization Process. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, *284* (37), 25199–25210.